



**Universidad Popular Autónoma del Estado de  
Puebla**

---

Decanato de Ciencias Biológicas  
Facultad de Biotecnología

**Maestría en Biotecnología**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS  
EXTRACTOS DE *Azadirachta indica*, *Punica granatum*  
Y *Tagetes lucida* CONTRA PATÓGENOS  
RESISTENTES SOBRE SUPERFICIES**

Trabajo Práctico para obtener el grado de  
Maestra en Biotecnología

Presenta

**I.Q. LUZ DEL CARMEN PALMA RUANOVA**

Director

**M. BT. IVÁN MARTÍNEZ ESPINOZA**

Co-director

**M. FARM. LAURA CONTRERAS MIONI**

Puebla, México

Noviembre, 2016



**UPAEP – Secretaría General**

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

**Tesis Digitales Restricciones de uso:**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo titulado “**Actividad antimicrobiana de los extractos de *Azadirachta indica*, *Punica granatum* y *Tagetes lucida* contra patógenos resistentes sobre superficies**”, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular para obtener el grado de:

## **MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

I.Q. Luz del Carmen Palma Ruanova

### **CONSEJO PARTICULAR**

### **FIRMA**

**Director y coordinador de examen profesional**

M. BT. Iván Martínez Espinoza

---

**Co-director y secretario de examen profesional**

Mtra. Laura Contreras Mioni

---

**Vocal de examen profesional**

Dra. en C. Zaida Nelly Juárez

---

El presente trabajo forma parte del programa de maestría en Biotecnología de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla y fue llevado a cabo en el laboratorio de Investigación de Biotecnoambiental, de la misma institución, dicho posgrado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y UPAEP.

Puebla, México. Noviembre del 2016

## AGRADECIMIENTOS

A mi comité de tesis: Mtro. Iván Martínez Espinoza, Mtra. Laura Contreras Mioni y Dra. Zaida Nelly Juárez Mena, por su valioso apoyo para la realización de este proyecto, así como por su confianza y amistad.

A la Química Concepción Carrión Cruz, responsable del Laboratorio de investigación biotecnológica de la universidad, por su ayuda y acompañamiento durante la etapa de experimentación de este proyecto.

A CONACYT, por el apoyo económico brindado, el cual me permitió continuar con mis estudios y llevar a cabo esta maestría.

A la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, a mi coordinadora la Dra. Beatriz Pérez Armendáriz y a cada uno de mis profesores, por la formación académica impartida, así como por todos los conocimientos y experiencias compartidas, las cuales me permitieron crecer tanto profesional como personalmente.

## DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado, principalmente a Dios, por todas las cosas buenas que pone en mi camino, incluido el logro de finalizar esta maestría, porque sin su ayuda simplemente no hubiera sido posible.

A mis padres por su apoyo incondicional en cada uno de los retos que decido tomar, así como por su cariño, su ejemplo, sus consejos, su compañía y su comprensión.

A mi hermana por estar siempre a mi lado y darle una chispa de alegría a mi vida, por ser mi confidente y amiga, por entender mi falta de tiempo en muchas ocasiones y hacer más llevadera la realización de este proyecto.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT .....	9
I. INTRODUCCIÓN .....	10
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. OBJETIVOS.....	15
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	15
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	15
V. HIPÓTESIS .....	16
VI. ANTECEDENTES .....	17
ANTECEDENTES GENERALES.....	17
<b>6.1 Antimicrobianos</b> .....	17
<b>6.2 Plantas medicinales</b> .....	17
<b>6.3 Plantas medicinales con acción antimicrobiana</b> .....	18
<b>6.4 Fitoquímicos</b> .....	19
<b>6.5 Metabolitos secundarios presentes en las plantas</b> .....	19
<b>6.6 Principales metabolitos secundarios con efecto antimicrobiano</b> .....	23
<b>6.7 Infecciones nosocomiales</b> .....	26
<b>6.8 Microorganismos resistentes sobre superficies</b> .....	26
<b>6.9 Desinfectantes de superficies</b> .....	28
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	31
<b>6.10 <i>Azadirachta indica</i> (Neem)</b> .....	31
<b>6.11 <i>Punica granatum</i> (Granada)</b> .....	33
<b>6.12 <i>Tagetes lucida</i> (Pericón)</b> .....	36
<b>6.13 Microorganismos resistentes sobre superficies</b> .....	39
6.13.1 <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	39
6.13.2 <i>Escherichia coli</i> .....	40

6.13.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	40
6.13.4	<i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	41
6.13.5	<i>Salmonella typhimurium</i> .....	41
6.13.6	<i>Serratia marcescens</i> .....	41
6.13.7	<i>Shigella flexneri</i> .....	42
6.13.8	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	42
6.13.9	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	42
6.13.10	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	43
VII.	<b>METODOLOGÍA</b> .....	44
7.1	<b>Plantas de estudio</b> .....	44
7.2	<b>Microorganismos indicadores</b> .....	45
7.3	<b>Microorganismos multirresistentes</b> .....	46
7.5	<b>Secado y pulverizado</b> .....	47
7.4	<b>Preparación de los extractos vegetales</b> .....	47
7.6	<b>Maceración en frío</b> .....	48
7.7	<b>Secado en rotavapor</b> .....	50
7.8	<b>Liofilización</b> .....	50
7.9	<b>Resuspensión de los extractos</b> .....	51
7.15	<b>Infusión de plantas</b> .....	51
7.10	<b>Pruebas de sensibilidad microbiana</b> .....	52
7.11	<b>Preparación del inóculo</b> .....	52
7.12	<b>Preparación de estándar MacFarland 0.5</b> .....	53
7.13	<b>Inoculación de las placas</b> .....	53
7.14	<b>Dispensación de los discos</b> .....	53
VIII.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	55
8.1	<b>Análisis estadístico</b> .....	55
IX.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	93
X.	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	94
XI.	<b>REFERENCIAS</b> .....	95
XII.	<b>ANEXOS</b> .....	101
12.1	<b>Optimización del extracto obtenido</b> .....	101

<b>12.2 Extracción de compuestos fitoquímicos</b> .....	104
<b>12.3 Análisis estadístico de los extractos con su mismo solvente</b> .....	107
<b>12.4 Análisis estadístico de los extractos con diferente solvente</b> .....	109
<b>12.5 Análisis estadístico de los extractos con aplicación de calor</b> .....	111
<b>12.6 Ficha de identificación de las especies vegetales de estudio</b> .....	113
<b>12.7 Informe clínico de la cepa <i>E. coli</i> de origen clínico</b> .....	114
<b>12.8 Informe clínico de la cepa <i>K. pneumoniae</i> de origen clínico</b> .....	115
<b>12.9 Informe clínico de la cepa <i>S. marcescens</i> de origen clínico</b> .....	116
<b>12.10 Informe clínico de la cepa <i>S. aureus</i> de origen clínico</b> .....	117
<b>12.11 Informe clínico de la cepa <i>S. epidermidis</i> de origen clínico</b> .....	118

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Número de metabolitos secundarios reportados de plantas superiores. ....	21
<b>Tabla 2:</b> Tiempo de permanencia de microorganismos en las superficies inanimadas. ....	27
<b>Tabla 3:</b> Propiedades de un desinfectante ideal. ....	29
<b>Tabla 4:</b> Características de los desinfectantes de uso común. ....	30
<b>Tabla 5:</b> Identificación taxonómica de <i>A. indica</i> . ....	31
<b>Tabla 6:</b> Fitoquímicos de <i>A. indica</i> . ....	33
<b>Tabla 7:</b> Identificación taxonómica de <i>P. granatum</i> . ....	34
<b>Tabla 8:</b> Fitoquímicos de <i>P. granatum</i> . ....	36
<b>Tabla 9:</b> Identificación taxonómica de <i>T. lucida</i> . ....	37
<b>Tabla 10:</b> Fitoquímicos de <i>T. lucida</i> . ....	39
<b>Tabla 11:</b> Información de identificación de las plantas de estudio. ....	44
<b>Tabla 12:</b> Microorganismos indicadores para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. ....	45
<b>Tabla 13:</b> Microorganismos multirresistentes para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. ....	46
<b>Tabla 14:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>E. coli</i> ATCC 25922 .....	56
<b>Tabla 15:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>E. coli</i> Clínico 0405610450026611 .....	59
<b>Tabla 16:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 .....	62

<b>Tabla 17:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	65
<b>Tabla 18:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>S. aureus</i> Clínico 010402072763271 .....	68
<b>Tabla 19:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 .....	71
<b>Tabla 20:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>S. epidermidis</i> Clínico 030400076221211 .....	74
<b>Tabla 21:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>S. flexneri</i> ATCC 12022 .....	77
<b>Tabla 22:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>S. marcescens</i> Clínico 6425511451056230.....	80
<b>Tabla 23:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>S. typhimurium</i> Clínico .....	83
<b>Tabla 24:</b> Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 .....	86
<b>Tabla 25:</b> Comparación global de medias de Tukey de los microorganismos.....	89
<b>Tabla 26:</b> Comparación global de medias de Tukey de los diferentes extractos.....	90
<b>Tabla 27:</b> Resumen de resultados de inhibición por microorganismo y extracto.....	92
<b>Tabla 28:</b> Extractos obtenidos con diferentes tiempos de maceración.....	101
<b>Tabla 29:</b> Extractos obtenidos con diferentes proporciones Planta: Solvente.....	102
<b>Tabla 30:</b> Extractos obtenidos por maceración en frío de las plantas .....	103
<b>Tabla 31:</b> ANOVA de los extractos disueltos con su mismo solvente de maceración.....	107
<b>Tabla 32:</b> Comparación de medias de Tukey de los extractos disueltos con su mismo solvente de maceración .....	108
<b>Tabla 33:</b> ANOVA de los extractos disueltos con diferente solvente de maceración.....	109
<b>Tabla 34:</b> Comparación de medias de Tukey de los extractos disueltos con diferente solvente de maceración .....	110
<b>Tabla 35:</b> ANOVA de los extractos de las plantas preparados con aplicación de calor .....	111
<b>Tabla 36:</b> Comparación de medias de Tukey de los extractos preparados con aplicación de calor.....	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Relación del metabolismo primario con las rutas biosintéticas del metabolismo secundario. ....	22
<b>Figura 2:</b> Pasos generales para la preparación de los extractos vegetales, elaboración propia. ....	48
<b>Figura 3:</b> Secuencia de maceraciones por polaridad de los solventes, elaboración propia. ....	49
<b>Figura 4:</b> Disposición de los discos con los extractos y blancos en placa, elaboración propia. ....	54
<b>Figura 5:</b> Halos de inhibición A) Pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E), B) Infusión de pericón (TP), en <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	58
<b>Figura 6:</b> Halos de inhibición producidos por el extracto de pericón macerado en cloroformo y disuelto con acetato de etilo (P-C-Ac), en <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	58
<b>Figura 7:</b> Halos de inhibición A) Pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E), B) Infusión de pericón (TP), en <i>E. coli</i> Clínico 0405610450026611. ....	61
<b>Figura 8:</b> Placa de <i>E. coli</i> clínico 0405610450026611 con extractos de pericón disueltos en diferente solvente de maceración. ....	61
<b>Figura 9:</b> Halos de inhibición A) Infusión de pericón (TP), B) Pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac), en <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883. ....	64
<b>Figura 10:</b> Placa de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 con extractos de pericón disueltos en diferente solvente de maceración. ....	64
<b>Figura 11:</b> Halo de inhibición A) Granado macerado en etanol y disuelto con agua destilada (G-E-A), en <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853. ....	67
<b>Figura 12:</b> Halos de inhibición producidos por los extractos de granado macerado en etanol y disuelto con agua destilada (G-E-A), en <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853. ....	67
<b>Figura 13:</b> Halos de inhibición A) Neem macerado y disuelto con cloroformo (N-C-C), B) Granado macerado y disuelto con cloroformo (G-C-C), C) Pericón macerado en cloroformo y disuelto con acetato de etilo (P-C-Ac), C) Granado macerado y disuelto con agua, en <i>S. aureus</i> Clínico 010402072763271. ....	70
<b>Figura 14:</b> Halos de inhibición A) Pericón macerado en etanol y disuelto con agua destilada, B) Infusión de pericón (TP), en <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228. ....	73
<b>Figura 15:</b> Placa de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 con extractos de granado disueltos en diferente solvente de maceración. ....	73
<b>Figura 16:</b> Halos de inhibición A) Granado disuelto y macerado con etanol (G-E-E), B) Pericón macerado en etanol y disuelto con agua destilada (P-E-A), en <i>S. epidermidis</i> Clínico 030400076221211. ....	76

<b>Figura 17:</b> Placa de <i>S. epidermidis</i> clínico 030400076221211 con extractos de pericón disueltos en su mismo solvente de maceración.....	76
<b>Figura 18:</b> Halos de inhibición A) Infusión de granado (TG), B) Pericón macerado y disuelto con agua (P-A-A), en <i>S. flexneri</i> ATCC 12022.....	79
<b>Figura 19:</b> Placa de <i>S. flexneri</i> ATCC 12022 con extractos de granado disueltos en su mismo solvente de maceración. ....	79
<b>Figura 20:</b> Halos de inhibición A) Pericón macerado y disuelto con cloroformo (P-C-C), B) Pericón macerado en cloroformo y disuelto con acetato de etilo (P-C-Ac), en <i>S. marcescens</i> Clínico 6425511451056230.....	82
<b>Figura 21:</b> Placa de <i>S. marcescens</i> clínico 6425511451056230 con extractos de pericón disueltos en su mismo solvente de maceración. ....	82
<b>Figura 22:</b> Halos de inhibición A) Granado macerado y disuelto con etanol, (G-E-E), B) pericón macerado con etanol y disuelto en agua destilada (P-E-A), en <i>S. typhimurium</i> Clínico. ....	85
<b>Figura 23:</b> Placa de <i>S. typhimurium</i> clínico con extractos de granado disueltos en su mismo solvente de maceración. ....	85
<b>Figura 24:</b> Halos de inhibición A) Granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A), B) Neem macerado y disuelto con cloroformo (N-C-C), en <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802.....	88
<b>Figura 25:</b> Placa de <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 con extractos de granado disueltos en su mismo solvente de maceración. ....	88

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>E. coli</i> ATCC 25922 .....	57
<b>Gráfica 2:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>E. coli</i> Clínico 0405610450026611	60
<b>Gráfica 3:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 .....	63
<b>Gráfica 4:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	66
<b>Gráfica 5:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>S. aureus</i> Clínico 010402072763271 .....	69
<b>Gráfica 6:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	72
<b>Gráfica 7:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>S. epidermidis</i> Clínico 030400076221211 .....	75
<b>Gráfica 8:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>S. flexneri</i> ATCC 12022 .....	78
<b>Gráfica 9:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>S. marcescens</i> Clínico 6425511451056230.....	81
<b>Gráfica 10:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>S. typhimurium</i> Clínico.....	84
<b>Gráfica 11:</b> Halos de inhibición promedio de los extractos, en <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 1780287	
<b>Gráfica 12.</b> Comparación de espectros FTIR de los extractos etanólicos y su solvente .....	104
<b>Gráfica 13:</b> Comparación de espectros FTIR de los extractos clorofórmicos y su solvente.....	105
<b>Gráfica 14:</b> Comparación de espectros FTIR de los extractos acuosos y su solvente .....	106

## RESUMEN

Los microorganismos que se encuentran en las superficies han desarrollado resistencia a determinados antimicrobianos, causando un gran número de infecciones que van desde respiratorias, gastrointestinales y nosocomiales; por tal motivo se ha intensificado el estudio de plantas en la búsqueda de nuevas alternativas para combatirlos. Existe evidencia, en diversos estudios reportados, sobre la capacidad que presentan diferentes compuestos o extractos obtenidos de especies vegetales para inhibir el crecimiento microbiano, la cual se atribuye a las sustancias químicas que contienen y las protegen de los parásitos y patógenos. La investigación llevada a cabo en este estudio consistió en evaluar y comparar la actividad antimicrobiana, representada por halos de inhibición, de los extractos acuosos, clorofórmicos y etanólicos, obtenidos de *Azadirachta indica* (neem), *Punica granatum* (granado) y *Tagetes lucida* (pericón), mediante 3 preparaciones distintas: disueltos con su mismo solvente de maceración, con diferente solvente y por infusión, para determinar el de mayor acción contra bacterias patógenas, capaces de sobrevivir sobre superficies por semanas e incluso meses. Los extractos se prepararon con las hojas de las 3 plantas, mediante maceración en frío y secado en rotavapor o liofilizador. La actividad antimicrobiana se evaluó contra 10 bacterias de referencia American Type Culture Collection (ATCC) y 6 bacterias de aislamiento clínico, de las cepas *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Vibrio parahaemolyticus*; a través del método de Kirby Bauer o de difusión en disco. Los diámetros de los halos de inhibición formados, se midieron tras 18 y 24 horas de incubación a 37 °C y se compararon mediante un análisis estadístico ANOVA y una comparación múltiple de medias de Tukey. Los extractos clorofórmicos y etanólicos, disueltos en diferente solvente, de *T. lucida*, específicamente P-C-Ac y P-E-A, fueron los que más inhibición presentaron en *E. coli* clínico 0405610450026611, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *S. aureus* clínico 010402072763271, *S. epidermidis* ATCC 12228 y clínico 030400076221211, *S. flexneri* ATCC 12022, *S. marcescens* clínico 6425511451056230 y *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. El microorganismo que mostró mayor sensibilidad frente a los extractos probados fue *S. aureus* clínico 010402072763271; mientras que *E. aerogenes* ATCC 13048 junto con *S. marcescens* ATCC 13880 no fueron inhibidos por ningún extracto.

**Palabras clave:** Actividad antimicrobiana, *Azadirachta indica*, *Punica granatum*, *Tagetes lucida*

## ABSTRACT

Microorganisms found on surfaces have developed resistance to certain antimicrobials, causing a large number of infections ranging from respiratory to gastrointestinal and nosocomial; for this reason, it has intensified the study of plants in the search for new alternatives to combat them. There is evidence in several reported studies about the ability of different compounds or extracts obtained from medicinal plants to inhibit microbial growth, which is attributed to the chemicals they contain and protect them from parasites and pathogens.

The research carried out in this study consisted of evaluating and comparing the antimicrobial activity, represented by inhibition halos, of the aqueous, chloroformic and ethanolic extracts obtained from *Azadirachta indica* (neem), *Punica granatum* (pomegranate) and *Tagetes lucida* (pericón), by means of 3 different preparations: dissolved with the same solvent of maceration, with different solvent and by infusion, to determine the one of greater action against pathogenic bacteria, able to survive on surfaces for weeks or even months.

The extracts were prepared with the leaves of the 3 plants, through cold maceration and drying in rotary evaporator or lyophilizer. Antimicrobial activity was evaluated against 10 American Type Culture Collection (ATCC) strains and 6 bacterial clinical isolates from *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Vibrio parahaemolyticus*; using the Kirby Bauer method or disk diffusion. The formed diameters of inhibition halos were measured after 18 and 24 hours of incubation at 37 °C and were compared by ANOVA statistical analysis and a multiple comparison of Tukey's means.

The chloroformic and ethanolic extracts, dissolved in different solvents, of *T. lucida*, P-C-Ac and P-E-A specifically, were the most inhibitors on clinical *E. coli* 0405610450026611, *K. pneumoniae* ATCC 13883, clinical *S. aureus* 010402072763271, clinical *S. epidermidis* 030400076221211 and ATCC 12228, *S. flexneri* ATCC 12022, clinical *S. marcescens* 6425511451056230 and *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. The microorganism that showed the greatest sensitivity against the extracts tested was clinical *S. aureus* 010402072763271; while *E. aerogenes* ATCC 13048 together with *S. marcescens* ATCC 13880 were not inhibited by any extract.

**Key words:** Antimicrobial activity, *Azadirachta indica*, *Punica granatum*, *Tagetes lucida*

## I. INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de compuestos químicos contenidos en las plantas, de los cuales los metabolitos secundarios, son los responsables principales de las actividades terapéuticas que éstas poseen, entre las que destaca el efecto antimicrobiano producido en su propia defensa, contra el estrés biótico y abiótico a que son sometidas (Paiva, Gomes, Napoleao, Correia, & Coelho, 2010).

Compuestos cuya estructura, presencia y función en las plantas medicinales hasta ahora estudiadas, han sido identificadas gracias a las diversas investigaciones realizadas en el área de los productos naturales; por las cuales, hoy la fitoquímica reconoce más de 12,000 alcaloides, 8,000 compuestos fenólicos y 25,000 terpenoides diferentes de origen vegetal, muchos de los cuales poseen propiedades antimicrobianas (Hamuel, 2012) (Radulovic, Blagojevic, Stojanovic-Radic, & Stojanovic, Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action, 2013).

Hecho que los convierte en una importante área de estudio, dada su riqueza química y sus bondades para la salud que, de acuerdo a documentos y monumentos antiguos conservados, han sido aprovechadas por distintas civilizaciones y culturas desde hace ya algunos milenios, para el tratamiento de diferentes enfermedades, y cuya acción ha sido reconocida por la ciencia (Bauer, 2012).

Los metabolitos secundarios de las plantas constituyen, una alternativa prometedora para la búsqueda de agentes antimicrobianos, debido a que las infecciones microbianas continúan siendo una de las principales causas de mortalidad y dado que se estima que las especies microbianas comprenden cerca del 60% de la biomasa de la Tierra (Radulovic, Blagojevic, Stojanovic-Radic, & Stojanovic, Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action, 2013).

De las diferentes plantas medicinales capaces de inhibir microorganismos, 3 especies cultivadas en la zona centro del país, dentro de la cual se ubica Puebla, destacan por su

actividad antimicrobiana contra diferentes patógenos: *Punica granatum* mejor conocida como granado, *Tagetes lucida* cuyo nombre coloquial es pericón y *Azadirachta indica* o neem; de acuerdo con estudios como los publicados por Gajanan, M. (2012), Hossain, M. y colaboradores (2013), Dhamodhar, P. y Saravanan, R. (2012), Jananai, J. y Estherlydia, D. (2013), Barajas, J. y colaboradores (2011), Regalado, E. y colaboradores (2011).

Razón por la cual son objeto de estudio para este trabajo, para determinar *in vitro*, mediante el método Kirby Bauer o de difusión en disco, la susceptibilidad de las bacterias ante los agentes antimicrobianos presentes en los extractos preparados, por maceración en frío, a partir de hojas de estas 3 especies, usando los solventes: cloroformo, etanol y agua; de manera tal que pudimos observar el efecto inhibidor de los mismos. (Prat, 2004).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estadísticas publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2012, revelan que las infecciones de las vías respiratorias originan 8% de las muertes prematuras en hombres y mujeres a nivel mundial; mientras que, en 2015 las cifras mostraron que, en niños menores a 5 años, la neumonía constituía la segunda causa principal de su mortalidad, las enfermedades diarreicas la quinta, y la septicemia junto con las infecciones neonatales la séptima (OMS, 2016). Además, en 2013, la OMS determinó que el 11% de muertes de niños menores a 5 años en México, fueron causadas por infecciones respiratorias agudas, mientras que la diarrea fue responsable del 3%. Asimismo, las infecciones respiratorias bajas provocaron la muerte a poco más de 20 mil mexicanos en 2012 (OMS, 2015).

Las enfermedades infecciosas son provocadas, entre otras fuentes, por microorganismos patógenos presentes en superficies de trabajo o de cualquier tipo con las que tenemos contacto; por ejemplo, en hospitales, transportes y lugares públicos. Es indispensable romper la llamada *cadena de transmisión de infecciones*, la cual está integrada por el agente causal (parásitos, hongos, bacterias, virus y priones), el reservorio o lugar (animado e inanimado) donde los microbios pueden sobrevivir, la puerta de salida del agente (del reservorio al exterior), los modos de transmisión del agente (por contacto, vía aérea y digestiva), la puerta de entrada (del agente al huésped), así como el hospedero susceptible que puede ser un paciente inmunocomprometido (OPS, 2007).

La desinfección constante de las superficies proporciona un método de prevención y reducción de microorganismos patógenos como bacterias, hongos o virus resistentes, muchos de los cuales tienen la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo, principalmente en superficies con las que se está en mayor contacto. Diferentes especies de bacterias tanto Gram positivas (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*) como Gram negativas (*Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Shigella* spp.), pueden sobrevivir varios meses sobre superficies inanimadas. Otro ejemplo, lo encontramos en la levadura *Candida albicans*, la

cual es capaz de subsistir más de 4 meses en áreas inertes (Kramer, Schwebke, & Kampf, 2006).

Actualmente, entre los desinfectantes más utilizados, destacan el ortoftaldehído al 0.55%, glutaraldehído al 2%, cloro y sus derivados 0.05-0.5%, formaldehído 3-8%, peróxido de hidrógeno 3-25%, ácido peracético 0.001-0.2%, compuestos fenólicos 0.4-5% y amonios cuaternarios 0.4-1.6%; cada uno de los cuales genera cierto grado de irritabilidad y toxicidad en las personas (OPS, 2007).

En este sentido, la investigación sobre productos naturales, sustentada en la búsqueda de opciones menos tóxicas para combatir microorganismos patógenos, nos permite considerar como alternativa a las plantas medicinales, las cuales se sabe, son fuentes seguras y económicas de compuestos químicos y biológicamente activos, muchos de los cuales han demostrado actividad antimicrobiana (Bakht, Humaira, Madiha, & Ihsan, 2015). Diversos autores han reportado la actividad antimicrobiana de distintas plantas medicinales, de las cuales se seleccionaron 3 especies ubicadas en el centro del país: *A. indica* (Koono & Budida, 2011), (Gajanan, 2012), (Hossain, Al-Toubi, Weli, Al-Riyami, & Al-Sabahi, 2013), (Susmitha, Vidyamol, Ranganayaki, & Vijayaragavan, 2013) y (Tirumalasetty & Basavaraju, 2014); *P. granatum* (Dahham, Ali, Tabassum, & Khan, 2010), (Khan & Hanee, 2011), (Dhamodhar, 2012) y (Janani & Estherlydia, 2013); y *T. lucida* (Céspedes, y otros, 2006), (Regalado, Fernández, Pino, Mendiola, & Echemendia, 2011), (Barajas, Montes-Belmont, Catrejón, Flores-Moctezuma, & Serrato, 2011) y (Lim, 2014)

### III. JUSTIFICACIÓN

Ante el alarmante número de muertes ocasionadas por enfermedades de origen microbiano, tales como infecciones gastrointestinales, respiratorias y nosocomiales, que tienen lugar cada año en el mundo, muchas de las cuales, se sabe, se deben a la falta de prevención o escasez de hábitos de limpieza, pese a que hoy en día se cuenta con diferentes artículos para la desinfección constante de las superficies, en su mayoría tóxicos; resulta necesario el desarrollo de nuevos productos, que sean más económicos, menos tóxicos e igual o más efectivos que los actuales.

Razón por la cual en este proyecto se evalúa la actividad antimicrobiana de extractos de 3 plantas medicinales, sobre un grupo de patógenos resistentes que son comunes en superficies, y se selecciona con base en los resultados obtenidos, aquél que presentó mayor inhibición de los microorganismos analizados; a fin que pueda ser utilizado, tras estudios posteriores, como un desinfectante natural para zonas inanimadas. Lo anterior en atención, además, a la estrategia 4.10.4 del Plan nacional de desarrollo 2013-2018, que consiste en impulsar el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales del país, específicamente, mediante la línea de acción que exhorta a aprovechar el desarrollo de la biotecnología, cuidando el medio ambiente y la salud humana.

Además, el proyecto pretende explotar la búsqueda de nuevos recursos que permitan dar valor a un área como la fitoquímica, para ofrecer un mejor aprovechamiento de las miles de especies de plantas medicinales en México, y con ayuda de la biotecnología asegurar la pertinencia e innovación del mismo (Bakht et al, 2015).

Se busca identificar un extracto de planta que sea capaz de inhibir microorganismos patógenos, presentes en las superficies, el cual pueda ser obtenido de las hojas de una planta en particular, evaluando distintos solventes, diferentes métodos para estandarizar una técnica de extracción de sus compuestos orgánicos y probando contra diferentes patógenos a los ya valorados en los estudios desarrollados actualmente.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Seleccionar un extracto antimicrobiano capaz de inhibir microorganismos resistentes presentes en las superficies, a través del método de Kirby Bauer, usando extractos acuosos, clorofórmicos y etanólicos de *Azadirachta indica*, *Punica granatum* y *Tagetes lucida*; el cual pueda ser utilizado como alternativa para desinfectar áreas inertes, y a su vez, prevenir infecciones microbianas.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar la extracción de compuestos fitoquímicos, mediante comparación de diferentes proporciones planta-solvente y tiempos de maceración, así como de las técnicas de liofilizado y secado en rotavapor, con la finalidad de optimizar la cantidad de extracto obtenido.
2. Extraer los compuestos fitoquímicos de las plantas de estudio: *Tagetes lucida*, *Azadirachta indica* y *Punica granatum L.*, por medio de maceración en frío con solventes de diferente polaridad, para su análisis.
3. Evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos mezclados con su mismo solvente de maceración, sometiéndolos a pruebas de sensibilidad antimicrobiana de Kirby Bauer, sobre cepas ATCC y cepas aisladas de muestras clínicas, para identificar su inhibición.
4. Evaluar la actividad inhibitoria producida por los extractos, disueltos en diferentes solventes a los de su maceración, a través de pruebas de difusión en disco (Kirby Bauer), a fin de determinar las diferencias entre ambos grupos de extractos.
5. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias de interés, frente a extractos acuosos obtenidos por aplicación de calor, mediante ensayos de Kirby Bauer, a fin de analizar la influencia de temperatura en la extracción.
6. Analizar los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad microbiológica, realizando un análisis estadístico ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey, para determinar el extracto de planta con mejor acción antimicrobiana.

## V. HIPÓTESIS

**H<sub>i</sub>:** Los extractos clorofórmicos, etanólicos y acuosos de *Azadirachta indica* “Neem”, *Punica granatum* “Granado” y *Tagetes lucida* “Pericón”, presentan actividad antimicrobiana en 3 o más microorganismos patógenos, de forma *in vitro*, ya sean cepas ATCC o aisladas de muestras clínicas.

**H<sub>0</sub>:** Los extractos clorofórmicos, etanólicos y acuosos de *Azadirachta indica* “Neem”, *Punica granatum* “Granado” y *Tagetes lucida* “Pericón”, no tienen actividad antimicrobiana *in vitro* contra patógenos resistentes sobre superficies: cepas de referencia ATCC y aisladas de muestras clínicas.

## **VI. ANTECEDENTES**

### **ANTECEDENTES GENERALES**

#### **6.1 Antimicrobianos**

El término agente antimicrobiano, se utiliza para hacer referencia a sustancias químicas que en bajas concentraciones son capaces de inhibir e, incluso, destruir microorganismos sin producir efectos tóxicos. Éstas pueden ser producidas por microorganismos, provenir de fuentes naturales o ser sintetizadas químicamente y se clasifican en base a su estructura química, su espectro de acción, su efecto antimicrobiano o su mecanismo de acción (Gómez, Calvo, & Prieto, 2009).

Se dividen en agentes bacteriostáticos si inhiben el crecimiento y multiplicación de las bacterias; y en agentes bactericidas, cuando no sólo inhiben el crecimiento de los microorganismos, sino también desencadenan mecanismos dentro de la célula que conducen a su muerte. De forma que, los agentes bacteriostáticos son reversibles, porque si se retiran, las células vuelven a multiplicarse; mientras que los agentes bactericidas son irreversibles, ya que las células mueren, si se exponen a éstos (Cavalieri, y otros, 2005).

#### **6.2 Plantas medicinales**

Se definen como cualquier especie vegetal (silvestre o cultivada) que contiene sustancias que pueden ser empleadas con propósitos terapéuticos, o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos, según lo establece la OMS, quien a su vez estima que aproximadamente el 80% de las personas en las regiones menos desarrolladas, utilizan la medicina tradicional a base de plantas para el cuidado de su salud (Schlaepfer & Mendoza, 2010) (Islam, y otros, 2012).

Las plantas medicinales son un recurso biológico rico en una gran variedad de metabolitos secundarios como taninos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, etc., cuyas propiedades antimicrobianas pueden constituir una alternativa efectiva, barata y segura para el tratamiento de infecciones microbianas; ya que poseen alto potencial terapéutico y bajos efectos

colaterales, en comparación con los fármacos sintéticos, y también presentan menos posibilidad de desarrollar resistencia (Pandey & Kumar, 2013).

México es un país de gran riqueza y biodiversidad, que, en materia de plantas medicinales, se posiciona en el segundo lugar a nivel mundial con mayor número de éstas, dadas sus 4500 especies registradas de este tipo; ubicado sólo después de China que posee 5000, el tercer lugar lo ocupa Colombia con 2600 plantas, encabezando con ellos los primeros lugares mundiales en herbolaria (UNAM, 2009).

Además, y de manera particular, el Estado de Puebla se ha definido líder en exportación de plantas medicinales al extranjero, al vender a Alemania el 54% del total de plantas medicinales que produce, a EU el 13%, España y Francia 13%, Portugal 3%, Inglaterra 2% y al resto del mundo el 15% restante. Sobre ello, el diputado Alberto Jiménez Merino destacó que, de las 23 especies medicinales más comercializadas en el mundo, 21 están en México y principalmente en Puebla (Enfoque, 2011).

### **6.3 Plantas medicinales con acción antimicrobiana**

Diferentes estudios reportados en la literatura dan evidencia de la actividad antimicrobiana que poseen diversos compuestos o extractos obtenidos de plantas medicinales. Muestra de ello es la revisión realizada por Ríos JL y Recio MC, en 2005, en la que, tras una búsqueda, en la base de datos PubMed, de artículos publicados sobre investigaciones acerca de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales, identifican 115 de estos correspondientes al periodo de 1966 a 1994 y 307, de la década de 1995 a 2004; cantidad que, seguramente, excedería en mucho la cifra actual de estas publicaciones, de tenerse un estudio similar más reciente.

En otro ejemplo, los autores Silva NCC y Fernandes Junior A. (2010), hicieron una recopilación de distintos estudios con el mismo enfoque: evaluación de la capacidad de las plantas medicinales para inhibir microorganismos patógenos; en él, realizan una breve remembranza de 28 investigaciones que reportan un efecto antimicrobiano en diversas

plantas medicinales, alrededor del mundo, contra distintos patógenos (Silva & Fernandes, 2010).

También Paiva, P.M.G. y colaboradores publican en 2010, una revisión sobre la acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios en plantas, de la que destaca una tabla, en la cual resumen el efecto inhibitor de bacterias Gram + y Gram - de 70 plantas agrupadas por su uso medicinal; así como una segunda tabla en la que expone los microorganismos afectados por distintos compuestos aislados de dichas plantas.

#### **6.4 Fitoquímicos**

Son una serie de sustancias químicas presentes en las plantas, que, aunque no se consideran esenciales para el metabolismo, sí son benéficas a largo plazo para la salud y hacen alusión a compuestos bioactivos sin valor nutricional (Aponte, y otros, 2008). Existen más de 2000 fitoquímicos en las plantas, agrupados en clases de acuerdo a su función y estructura, entre los que se encuentran los alcaloides, glicósidos, terpenos, fenoles y tioles (Aponte, y otros, 2008).

#### **6.5 Metabolitos secundarios presentes en las plantas**

Las plantas sintetizan sustancias que son esenciales para su metabolismo, como producto de las reacciones enzimáticas que ocurren naturalmente dentro de sus células, denominadas metabolitos, los cuales se dividen en primarios y secundarios (Harris, 2003; Irchhaiya et al., 2014). Los primarios comprenden los azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos, así como los polímeros derivados de estos compuestos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos) que son necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Irchhaiya et al., 2014; Méndez, Zañudo, Castruita, Meza y Gómez, 2014).

Los secundarios, en cambio, son compuestos biosintéticos derivados de los metabolitos primarios que no participan en tales funciones; pero sí contribuyen a largo plazo a la supervivencia de las plantas, ya que juegan un papel importante en su mecanismo de defensa, por el cual se les atribuye, generalmente, la actividad antimicrobiana de éstas (Agostini-Costa, Vieira, Bizzo, & Gimenes, 2012).

En el reino vegetal, su presencia se encuentra limitada a cada grupo taxonómico particular, género, especie o familia, es decir no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas; ya que su biosíntesis suele estar restringida a estadios específicos del desarrollo de la planta, a ciertos órganos o células especializadas, así como a periodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o el ataque de microorganismos, lo que dificulta su purificación y extracción. Por dichas características, constituyen moléculas pequeñas que se sintetizan en bajas concentraciones (menores que las de los metabolitos primarios) y de forma no generalizada en la planta (Irchhaiya, R. et al, 2014; Méndez, L et al., 2014).

En la siguiente tabla se muestra el número de metabolitos secundarios reportados en plantas superiores, por grupo fitoquímico:

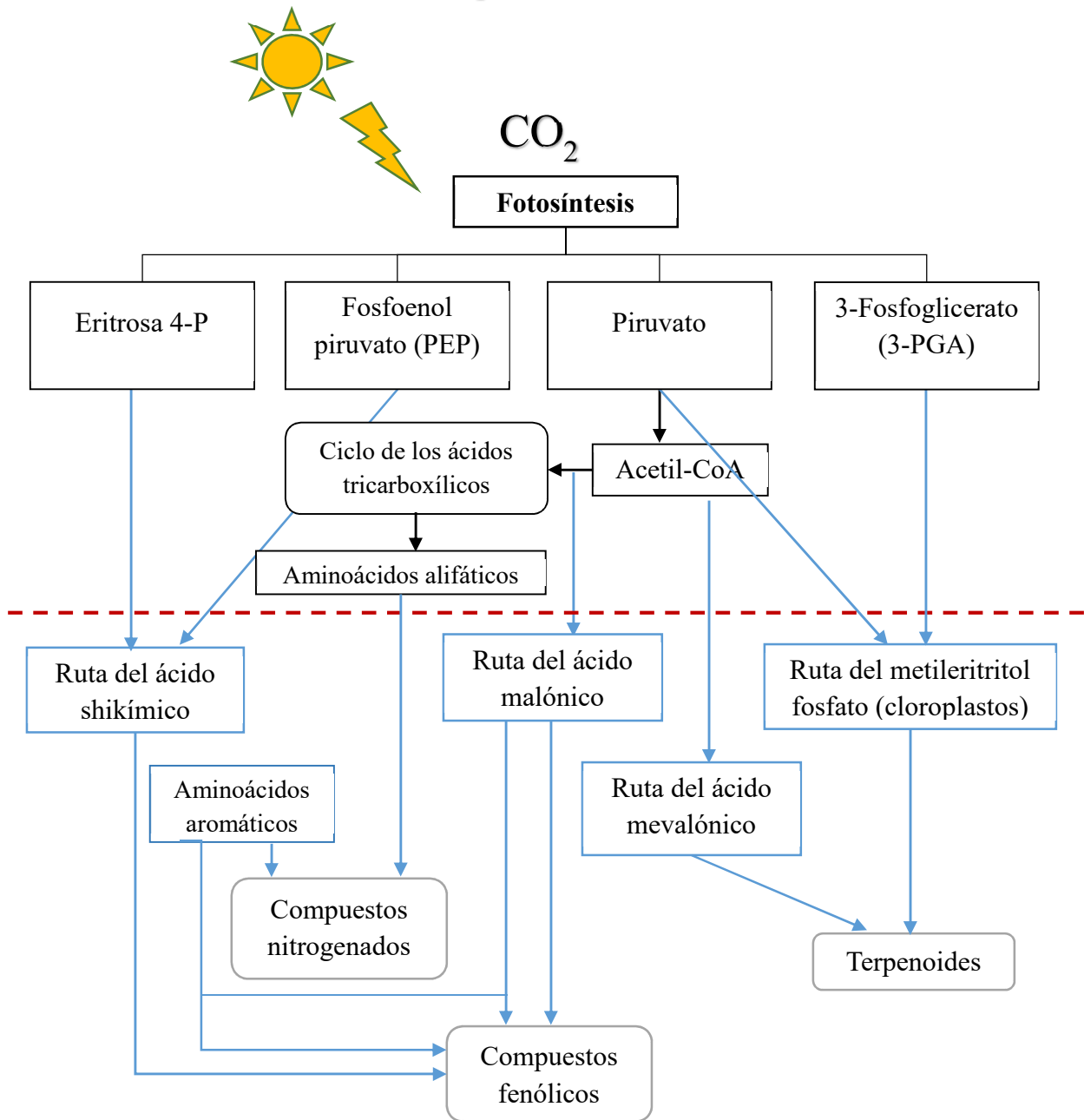
**Tabla 1:** Número de metabolitos secundarios reportados de plantas superiores.

<b>Grupo de metabolito secundario</b>	<b>Número aproximado</b>
<b>METABOLITOS SECUNDARIOS QUE CONTIENEN NITRÓGENO</b>	
Alcaloides	21 000
Aminoácidos no proteínicos	700
Aminas	100
Glicósidos cianogénicos	60
Glucosinolatos	100
Alcamidas	150
Lectinas, péptidos, polipéptidos	2000
<b>METABOLITOS SECUNDARIOS SIN NITRÓGENO</b>	
Monoterpenos incluyendo iridoides	2500
Sesquiterpenos	5000
Diterpenos	2500
Triterpenos, esteroides, saponinas	5000
Tetraterpenos	500
Flavonoides, taninos	5000
Fenilpropanoides, lignina, cumarinos, lignanos	2000
Poliacetilenos, ácidos grasos, ceras	1500
Antraquinonas y otros policétidos	750
Carbohidratos, ácidos orgánicos	200

Nota: Traducción de “Metabolites in plants and its classification”, Fuente: (Irchhaiya, y otros, 2014).

Las principales rutas de biosíntesis de productos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono y son: ruta del ácido shikímico, ruta del ácido malónico, ruta del ácido mevalónico y ruta del metileritritol fosfato (Méndez, Zañudo, Castruita, Meza, & Gómez, 2014).

# Metabolismo primario del Carbono



# Metabolismo secundario del Carbono

**Figura 1:** Relación del metabolismo primario con las rutas biosintéticas del metabolismo secundario, obtenida de Fuente: (Méndez et al, 2014).

## **6.6 Principales metabolitos secundarios con efecto antimicrobiano**

Gran parte de los efectos medicinales, incluyendo la actividad antimicrobiana de algunas plantas, provienen por lo general de sus metabolitos secundarios, tales como alcaloides, esteroides, taninos y compuestos fenólicos que se sintetizan y depositan de forma aislada o en conjunto, en partes específicas de la planta (Pandey & Kumar, 2013). A continuación, se describen las características estructurales y actividades biológicas de los grupos fitoquímicos que tienen capacidad de inhibir microorganismos:

### **Fenoles, compuestos fenólicos o polifenólicos**

Componentes químicos que contienen en su estructura uno o más anillos de benceno unidos a un grupo hidroxilo (OH) y funcionan como pigmentos naturales responsables del color de los frutos de las plantas. Son compuestos importantes para las plantas, porque desempeñan múltiples funciones, entre las que destacan la defensa de la planta frente a patógenos y depredadores herbívoros, por lo que se aplican en el control de infecciones patógenas en humanos (Hamuel, 2012).

De acuerdo a Hamuel (2012), se clasifican en: ácidos fenólicos, flavonoides polifenólicos (flavonoides, flavonas, xantonas y catequinas) y compuestos polifenólicos no flavonoides. Sus mecanismos de toxicidad contra los microorganismos, los cuales están relacionados con el número y sitio de sus grupos hidroxilo, incluyen inhibición enzimática por parte de los compuestos oxidados, posiblemente debido a una reacción con grupos sulfhidrilos o por interacciones menos específicas con las proteínas. Los compuestos fenólicos que poseen una cadena lateral C<sub>3</sub> en un nivel bajo de oxidación y no contienen oxígeno, se clasifican como aceites esenciales y constantemente son referidos como antimicrobianos. Por ejemplo, el eugenol, presente en el aceite de clavo, es considerado un bacteriostático contra hongos y bacterias. (Pandey & Kumar, 2013).

### **Quinonas**

Compuestos cuya estructura química está formada por un anillo aromático con 2 grupos carbonilo, altamente reactivos, son los responsables del oscurecimiento en frutas y vegetales cortados o maltratados. Poseen gran potencial antimicrobiano, puesto que constituyen una

fuerza de radicales libres estables y forman complejos, irreversiblemente, con aminoácidos nucleofílicos de las proteínas, lo que a menudo conduce a la inactivación de la proteína y a la pérdida de su función (Pandey & Kumar, 2013). En las células microbianas, se dirigen a las adhesinas expuestas de la superficie, a polipéptidos de la pared celular y a enzimas unidas a la membrana. También pueden hacer no disponibles los sustratos para los microorganismos (Pandey & Kumar, 2013).

### **Flavonas, flavonoides y flavonoles**

Grupo de compuestos polifenólicos, formados por más de un anillo aromático, que contienen un grupo carbonilo, a diferencia de las quinonas que presentan dos. Son también componentes fenólicos hidroxilados, pero existen como una unidad C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> vinculada a un benceno. Se conocen más de 4000 flavonoides, algunos de los cuales son pigmentos de plantas superiores (Pandey & Kumar, 2013).

Se ha reportado su uso como antioxidantes o redes de radicales libres y se sabe que son sintetizados por las plantas en respuesta a una infección microbiana. Dicha actividad se debe a su capacidad para formar complejos con proteínas solubles y extracelulares, y con paredes celulares bacterianas, como en el caso de las quinonas. También algunos flavonoides, muestran un efecto inhibitorio contra múltiples virus (Pandey & Kumar, 2013).

### **Taninos**

Son sustancias fenólicas poliméricas, con propiedad astringente que se encuentran en casi todas las partes de la planta (raíz, corteza, tallo y capas exteriores del tejido vegetal). Se dividen en dos grupos: hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables tienen ácido gálico y, usualmente, múltiples ésteres con D-glucosa; mientras que los taninos condensados o proantocianidinas, se derivan de monómeros flavonoides (Pandey & Kumar, 2013). Favorecen diferentes acciones fisiológicas en los humanos para combatir enfermedades infecciosas, por ejemplo, estimulan las células fagocíticas, la actividad tumoral mediada por un huésped, entre otras, y pueden ser tóxicos para hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Su actividad antimicrobiana se debe a la presencia del grupo fenólico, así como a su habilidad de inactivar adhesinas microbianas, proteínas de transporte de la envoltura celular con

enzimas, etc. Los taninos condensados, por su parte, unen las paredes celulares de las bacterias ruminales, evitando su crecimiento y actividad de la proteasa (Pandey & Kumar, 2013).

### **Cumarinos**

Constituyen sustancias fenólicas compuestas por la fusión de un anillo bencénico y una  $\alpha$ -pirona, que presentan diferentes actividades biológicas como antimicrobianos, antitrombóticos, antiinflamatorios y vasodilatadores, y cuyos estudios in vitro han demostrado que inhiben *Candida albicans* (Pandey & Kumar, 2013).

### **Terpenoides**

Compuestos basados en una estructura de isopreno, con fórmula química general  $C_{10}H_{16}$ , se llaman terpenos y existen como diterpenos, triterpenos y tetraterpenos ( $C_{20}$ ,  $C_{30}$  y  $C_{40}$ ), así como hemiterpenos ( $C_5$ ) y sesquiterpenos ( $C_{15}$ ). Cuando éstos contienen elementos adicionales, usualmente oxígeno, se denominan terpenoides. Se encuentran formando parte de la fracción de aceites esenciales de las plantas, y tanto los terpenos como los terpenoides son activos contra bacterias, hongos, virus y protozoos (Pandey & Kumar, 2013).

### **Lectinas y polipéptidos**

Se ha determinado que algunos péptidos son capaces de inhibir microorganismos, tal es el caso de las tioninas que consisten de 47 residuos de aminoácidos, se encuentran en la cebada y el trigo, y son tóxicas para las levaduras y bacterias Gram negativas y Gram positivas (Pandey & Kumar, 2013).

### **Alcaloides**

Constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de plantas, están formados, en gran medida, por compuestos de amonio y comprenden básicamente bases nitrogenadas, sintetizadas a partir de la construcción de bloques de aminoácidos con diversos radicales que sustituyen uno o más hidrógenos del anillo peptídico, la mayoría contiene oxígeno y tienen carácter básico dada su composición de nitrógeno (Hamuel, 2012).

## **6.7 Infecciones nosocomiales**

Los centros de atención médica constituyen un foco de infección, por ser entornos donde se congregan personas infectadas y expuestas a un mayor riesgo de infección; ya que las condiciones de limpieza dentro de un hospital, el traslado frecuente de pacientes de una unidad a otra y la concentración de personas muy vulnerables a una infección (recién nacidos, pacientes con quemaduras, cuidados intensivos, etc.) propician la aparición de infecciones nosocomiales, como se les conoce a las enfermedades contraídas en centros de salud (OMS, Prevención de las infecciones nosocomiales, 2003). Las infecciones intrahospitalarias, como también se les denomina, se definen como aquéllas infecciones adquiridas, después de 48 horas de estancia en un hospital, que los pacientes no presentaban a su ingreso (Ministerio de salud de Perú, 2004).

## **6.8 Microorganismos resistentes sobre superficies**

Comprende a aquellos patógenos capaces de sobrevivir o persistir sobre superficies inertes por semanas e incluso meses, representando una fuente continua de transmisión de enfermedades, si no se lleva a cabo una desinfección preventiva regular de las superficies. Dentro de este grupo se incluyen a los microorganismos nosocomiales más comunes, responsables de la mayoría de infecciones intrahospitalarias y enfermedades contraídas en centros de salud (Kramer, Schwebke, & Kampf, 2006).

Es cierto que el ser humano se encuentra en contacto, en todo momento, con bacterias, virus, hongos y parásitos, contra los cuales desarrolla mecanismo para defenderse; sin embargo, cuando estos gérmenes habitan las superficies inanimadas como las áreas de trabajo, pueden ocasionar enfermedades graves en las personas, que se deban a sus defensas bajas o a la resistencia que desarrollan estos patógenos. Además, el tiempo que permanece un agente infeccioso sobre una superficie influye en la contracción de enfermedades, aumentando el riesgo potencial de transmisibilidad (Castañeda & Ordoñez, 2014).

Una revisión sistemática de la literatura en Med Line, realizada por Kramer y sus colaboradores en 2006, reveló que la mayoría de bacterias Gram positivas como *Enterococcus* spp., *S. aureus* y *S. pyogenes* pueden sobrevivir algunos meses en superficies

secas. Muchas especies Gram negativas, como *Acinetobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* o *Shigella* spp. Pueden también sobrevivir varios meses. Otras, como *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus vulgaris* o *Vibrio cholerae* sólo sobreviven unos días (Kramer, Schwebke, & Kampf, 2006).

Finalmente, dentro del grupo de hongos patógenos podemos encontrar a *Candida albicans*, el cual puede sobrevivir más de 4 meses en superficies y *Turolopsis glabrata*, que subsiste 5 meses. En la siguiente tabla se muestran estos y otros microorganismos con alto tiempo de supervivencia sobre superficies.

**Tabla 2:** Tiempo de permanencia de microorganismos en las superficies inanimadas.

<b>Tipo de bacteria</b>	<b>Tiempo viable en medio ambiente</b>
<i>Acinetobacter</i>	3 días a 5 meses
<i>Clostridium difficile</i> (esporas)	5 meses
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	7 días a 6 meses
<i>Escherichia coli</i>	1.5 horas a 16 meses
<i>Enterococcus</i> spp.	5 días a 4 meses
<i>Klebsiella</i> spp.	2 horas a más de 30 meses
<i>Listeria</i> spp.	1 día a meses
<i>Mycobacterium bovis</i>	> 2 meses
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1 día a 4 meses
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 horas a 16 meses; en superficies secas: 5 semanas
<i>Salmonella typhimurium</i>	10 días a 4.2 años
<i>Serratia marcescens</i>	3 días a 2 meses; en superficies secas: 5 semanas
<i>Shigella</i> spp.	2 días a 5 meses
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 días a 7 meses
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3 días a 6.5 meses
<b>Tipo de hongo</b>	<b>Tiempo viable en medio ambiente</b>
<i>Candida</i>	1 a 120 días
<i>Candida glabrata</i>	120 a 150 días

Nota: Transcripción y adaptación de “La supervivencia de los gérmenes intrahospitalarios en superficies inanimadas”, Fuente: (Castañeda & Ordoñez, 2014).

En general, se encontró que las bacterias Gram negativas persisten más tiempo que las Gram positivas y que la humedad aumenta la supervivencia de la mayoría de ellas, como: *Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*; la baja humedad, por su parte, permite la supervivencia de *S. aureus*. Por otro lado, la temperatura es también un factor importante para el desarrollo de un microorganismo, ya que la mayoría de bacterias, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *MRSA*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* y *Neisseria gonorrhoeae* pueden incrementar su tasa de supervivencia a bajas temperaturas (Castañeda & Ordoñez, 2014).

## 6.9 Desinfectantes de superficies

Los desinfectantes de superficies son soluciones capaces de destruir o inactivar microorganismos, pero no tienen la capacidad de eliminar la mayoría de esporas que expulsan los hongos; estas sustancias son clasificadas, de acuerdo a la Agencia de Protección del Medioambiente de E.U. (EPA por sus siglas en inglés), de la siguiente manera:

- **Desinfectante limitado.** Efectivo sólo contra algunas bacterias Gram positivas, como *S. aureus*, o Gram negativas, como *Salmonella C*.
- **Desinfectante de hospital.** Efectivo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- **Detergente desinfectante.** Combinación de desinfectante y detergente químico, como detergentes alcalinos formulados con compuestos que liberan cloro, detergentes alcalinos formulados con amonios cuaternarios o surfactantes no iónicos y detergentes ácidos formulados con yodóforos.
- **Sanitizante.** Compuesto que reduce, pero no necesariamente elimina los microorganismos de la superficie inanimada.

Por otro lado, en la siguiente clasificación podemos encontrar a los desinfectantes divididos por su potencialidad contra patógenos:

- **Desinfectantes de alto nivel (DAN).** Inactivan bacterias vegetativas, hongos, virus, micobacterias y, en periodos más prolongados, esporas.

- **Desinfectantes de nivel intermedio (DNI).** Inactivan bacterias vegetativas, hongos, virus y, en periodos y concentraciones mayores, micobacterias.

- **Desinfectantes de bajo nivel (DBN).** Eliminan bacterias vegetativas, algunos virus y hongos (Maimone & Castilla, 2013).

Es importante considerar ciertas características al seleccionar un desinfectante, de las cuales, se muestra en la siguiente tabla, algunos atributos:

**Tabla 3:** Propiedades de un desinfectante ideal.

<b>Propiedades</b>	<b>Características</b>
Amplio espectro	Debe tener amplio espectro antimicrobiano.
Rápida acción	Debe producir una muerte rápida.
No ser afectado por factores del medio ambiente	Debe ser activo en presencia de materia orgánica (sangre, heces, etc.) y compatible con detergentes, jabones y otros agentes químicos en uso.
No tóxico	No debe ser irritante para el usuario.
Compatible con las superficies	No debe corroer metales ni deteriorar plásticos, gomas, etc.
Sin olor	Debe tener un olor suave o ser inodoro.
Económico	El costo se debe evaluar en relación con la dilución, el rendimiento y la seguridad.
Estable	En su uso concentrado y diluido.
Limpieza	Debe tener buenas propiedades de limpieza.
Fácil de usar	La complejidad en su preparación, concentraciones, diluciones y tiempo de exposición del producto puede confundir al usuario.
Efecto residual no tóxico sobre las superficies	Muchos desinfectantes tienen acción residual sobre las superficies, pero el contacto de las mismas puede provocar irritación de piel, mucosas u otros efectos no deseables.
Soluble en agua	Para descartar que sea tóxico o nocivo para el medioambiente.

Nota: Transcripción de “Desinfectantes de uso hospitalario”, Fuente: (Maimone & Castilla, 2013).

Un desinfectante debe ser seguro, no tóxico, no corrosivo, estable, sin efectos residuales nocivos para las superficies sobre las que se aplica ni para el medio ambiente; sin embargo, los productos químicos usados con ese fin no cumplen tales requerimientos. En la tabla siguiente se resumen algunos de estos y sus efectos tóxicos.

**Tabla 4:** Características de los desinfectantes de uso común.

Agente	Acción	Corrosivo	Efecto residual	Irritante	Toxicidad	Observaciones
<b>Alcohol</b>	Rápida	Sí	No	No	Seca la piel	Volátil e inflamable, reduce rápidamente la flora de la piel.
<b>Formaldehído</b>	Lenta	No	Sí	Sí	Sí	Su uso está limitado por ser irritante y tóxico, su exposición debe ser controlada.
<b>Amonios cuaternarios</b>	Intermedia	No	No	Sí	Sí	No se recomienda para desinfección de equipos. Su uso se limita al aseo.
<b>Cloro y derivados</b>	Rápida	Sí	Sí	Sí	Irrita piel y mucosas	Corrosivo en metales y se evapora con facilidad.
<b>Yodóforos</b>	Intermedia	Sí	Si	Sí	Irrita la piel en menores	Se absorben por la piel y mucosa, por lo que no deben usarse en neonatos para evitar hipotiroidismo.
<b>Glutaraldehído</b>	Rápida	Sí	Sí	Sí	Sí	Se han encontrado diferencias en su actividad a concentraciones distintas al 2%.

Nota: Transcripción y adaptación de “Norma técnica de prevención y control de infecciones intrahospitalarias”, Fuente: (Ministerio de Salud de Perú, 2004).

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### 6.10 *Azadirachta indica* (Neem)

De acuerdo al sistema de clasificación de plantas florales, de Cronquist (1981), determinado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

**Tabla 5:** Identificación taxonómica de *A. indica*.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta (Plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Familia	Meliaceae
Género	<i>Azadirachta</i>
Especie	<i>Azadirachta indica</i> Juss
Nombre coloquial	Neem
Sinonimia coloquial	Nim, margosa, lila india.
Sinonimia científica	<i>Azadirachta indica</i> var. <i>minor</i> Valetton, <i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i> Valetton, <i>Melia azadirachta</i> L., <i>Melia indica</i> Brandis.

Nota: Elaboración propia con base en (CONABIO, 2013)

El neem es un árbol de rápido crecimiento que puede alcanzar 15 a 20 m de altura y bajo condiciones muy favorables hasta 30 a 35 m. Su ramaje es amplio y puede alcanzar de 15 a 20 m de diámetro, una vez desarrollado; pero en condiciones severas se deshoja. Su tronco es corto, recto y puede alcanzar 120 cm de diámetro, la corteza es dura, agrietada y de color gris claro hasta castaño rojizo, la savia es blanca grisácea y el corazón del tronco, rojo (Foundation, 2014). Sus raíces consisten de una robusta raíz principal y muy desarrolladas raíces laterales, las cuales pueden alcanzar más de 18 m (CONABIO, 2013) (Foundation, 2014).

Sus tallos miden de 20 a 40 cm de longitud y tienen 20 a 31 hojas verde oscuras de 3 a 8 cm de longitud con márgenes dentados, de las cuales la hoja terminal a menudo está ausente. Sus flores son blancas y fragantes, y su fruto, de sabor dulce pero desagradable al gusto, es parecido a la aceituna en forma, entre ovalado elongado y redondo, que cuando madura mide 14 a 28 mm de longitud y 10 a 15 mm de ancho, es de color verde a verde amarillento de joven, y rara vez rojizo cuando está maduro (CONABIO, 2013) (Foundation, 2014).

Es originario de la India y Birmania, pero fue introducido para cultivo a otros países de Asia a África, América, Australia y las islas del sur del Pacífico. Se le encuentra en el bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, así como en zonas áridas. En México esta especie se cultiva y se ha llevado a cabo su adaptación, introduciéndose en Baja California Sur, Oaxaca, entre otros estados (CONABIO, 2013) (CONAFOR). Es perennifolia, sólo pierde sus hojas en condiciones muy extremas, florece de abril a mayo, aunque varía según la sequía del sitio y fructifica desde mayo hasta agosto (CONAFOR).

El neem se ha utilizado con fines medicinales durante siglos, gracias a sus acciones como: abortivo, analgésico, antihelmíntico, antibacteriano, antilevaduras, antiúlceras, antifilárico, antifúngico, antidiabético, antiinflamatorio, antiviral, antimalárico, diurético, antinematodos, antipirético, antiespasmódico, insecticida, antiespermatogénico, antitumoral, hipoglucémico e inmunomodulador (Hashmat, Hussain, & Ahmed, 2012).

Las hojas se emplean para tratar varicela, problemas oftálmicos y anorexia, aumentar la inmunidad del cuerpo, reducir la fiebre causada por malaria, combatir diversos hongos del pie, contra las termitas y gusanos intestinales, y para curar dolores neuromusculares. La corteza y las semillas permiten controlar las pulgas y garrapatas en animales domésticos, combatir infecciones de la piel como acné, psoriasis, sarna, lepra, eczemas, etc., tratar diabetes, SIDA, cáncer, enfermedades del corazón, herpes, alergias, úlceras, hepatitis, entre otras. (Hashmat, Hussain, & Ahmed, 2012) (Pankaj, Lokeshwar, Mukesh, & Vishnu, 2011).

Las frutas se usan para tratar desordenes urinarios, diabetes, heridas y lepra. Las ramas se utilizan para aliviar tos, asma, hemorroides, espermatorrea, gusanos intestinales, etc.

(Hashmat, Hussain, & Ahmed, 2012) (Pankaj, Lokeshwar, Mukesh, & Vishnu, 2011). Está formada por numerosos constituyentes, 100 de los cuales han sido aislados de diferentes partes del árbol, entre los que destacan: alcaloides, flavonoides, fenoles, carotenos, esteroides, cetonas y terpenoides como los principales activos biológicos identificados (Pankaj, Lokeshwar, Mukesh, & Vishnu, 2011). En la tabla a continuación se muestran los fitoquímicos presentes en cada parte de la planta.

**Tabla 6:** Fitoquímicos de *A. indica*.

<b>Componentes de la planta</b>	<b>Constituyentes</b>
<b>Hojas</b>	Nimbina, nimbanene, 6-desacetilnimbinene, nimbandiol, nimbolide, ácido ascórbico, n-hexaonasol y aminoácidos, 7-desacetil-benzoylazadiradione, 7-desacetil-7-benzoylgedunin, 17-hidroxiiazadiradione y nimbiol; flavonoides: quercetina; trisulfuro cíclico y tetrasulfuro cíclico.
Flores	Nimboesterol, flavonoides: kaempferol, melicitrin, ácidos grasos: behénico, araquídico, esteárico, palmítico, oleico y linoleico.
Corteza	Taninos condensados: ácido gálico, galocatequina (+), epicatequina (-), catequina (+) y epigalocatequina; diterpenoides tricíclicos: margolone, margolonone, isomargolonone; polisacáridos: GIA, GIB, GIIA, GIIIA; peptidoglicano: NB-2.
Semillas	Triterpenos o limonoides: Azadiractina, meliacina, meliantriol, gedunina, nimbina, nimbidina, nimbolide, salanin, valassin, mahmoodin; ácido tignico,

Nota: Elaboración propia con base en (Pankaj, Lokeshwar, Mukesh, & Vishnu, 2011) (Hashmat, Hussain, & Ahmed, 2012) (Foundation, 2014) (Hossain, Al-Toubi, Weli, Al-Riyami, & Al-Sabahi, 2013).

### **6.11 *Punica granatum* (Granada)**

De acuerdo al sistema de clasificación de plantas florales, de Cronquist (1981), determinado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

**Tabla 7:** Identificación taxonómica de *P. granatum*.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta (Plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Subclase	Rosidae
Orden	Myrtales
Familia	Punicaceae
Género	<i>Punica</i>
Especie	<i>Punica granatum</i> L.
Nombre coloquial	Granado
Sinonimia coloquial	Agrauz, almegrans, balaustra, granao, graná, magrano, manglano, milgrano, mingranera, mollar.
Sinonimia científica	<i>Punica florida</i> Salisb, <i>Punica grandiflora</i> hort. ex Steud, <i>Punica nana</i> L., <i>Punica spinosa</i> Lam., <i>Rhoea púnica</i> St. Lag. y <i>Granatum puniceum</i> St. Lag.

Nota: Elaboración propia con base en (CONABIO, 2013).

Es un arbusto frutal caducifolio que puede alcanzar de 5 a 8 m de altura, más o menos espinoso, muy ramificado, cuyo fruto es la granada. Su tronco es recto con la corteza resquebrajada y ramas opuestas. Sus hojas de 1.5 a 7 cm de longitud por 0.8 a 2 cm de ancho, también son opuestas o subopuestas, lustrosas por el haz, de un verde amarillento (CONABIO, 2013) (EcuRed, 2012). Sus flores son de color rojo brillante, de 3 a 4 cm de diámetro, con 5 pétalos, solitarias o reunidas con hasta 5 flores. Los pétalos de 2 a 2.5 por 1 a 1.5 cm, son corrugados, caedizos, de color rojo intenso y dobles. (CONABIO, 2013; Flora Ibérica, s.f.). Su fruto, conocido como granada y denominado en botánica balausta, es una baya globular de 5 a 12 cm de diámetro, de pulpa roja anaranjada, carnosa y jugosa, comestible, ligeramente dulce a ácida, y separada por telillas membranosas. Sus semillas tienen unos 12 a 15 por 5 a 7 mm (CONABIO, 2013) (EcuRed, 2012).

Es nativa, probablemente, de la región que abarca desde Irán hasta el norte de los Himalayas en la India; se cultiva con éxito en todos los lugares tropicales y subtropicales del mundo; ha sido introducida también en México, donde se le puede encontrar en los estados de Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, San Luis Potosí y Veracruz principalmente (CONABIO, Catálogo taxonómico de especies de México, 2009) (EcuRed, 2012) (CONABIO, 2013)

(Miguel, Neves, & Antunes, 2010). Su periodo de crecimiento activo es en primavera y verano, y florece de abril a junio (EcuRed, 2012) (CONABIO, 2013).

La granada se usa en la medicina tradicional, principalmente contra la tos persistente, es eficaz en caso de fiebre, diarreas y cólicos, tiene ligeras propiedades diuréticas y antihipertensivas, es beneficiosa para la salud cardiovascular y para prevenir ciertos tipos de cáncer, por ejemplo, se usa como terapia alternativa contra el cáncer de próstata (EcuRed, 2012) (CONABIO, 2013). El jugo de granada posee actividad antioxidante y es útil para el tratamiento de la aterosclerosis y la hiperlipidemia (Miguel, Neves, & Antunes, 2010).

Además, ha mostrado ser efectivo contra la hipertensión, la diabetes, la enfermedad periodontal y la estomatitis protésica. Otros beneficios incluyen el combate de algunas infecciones bacterianas, la disfunción eréctil, infertilidad en hombres, enfermedad de Alzheimer y obesidad (Miguel, Neves, & Antunes, 2010).

La hoja y flor de *P. granatum* contienen polifenoles (flavonoides y taninos), algunos de los cuales son únicos; la cáscara del fruto posee complejos polisacáridos, además de taninos hidrolizables, y el aceite presente en las semillas está compuesto por triacilgliceroles con alto contenido de ácido punícico, así como por esteroides, esteroides y cerebrósido en muy pequeñas cantidades (Miguel, Neves, & Antunes, 2010). Dentro de los polifenoles contenidos en la granada se incluyen flavonoides (flavonoles y antocianinas), taninos condensados (proantocianidinas) y taninos hidrolizables (elagitaninos y galotaninos). En la siguiente tabla se enlistan los diferentes tipos de fitoquímicos que han sido identificados en varias partes del árbol de granada, en el fruto y sus semillas (Dahham, Ali, Tabassum, & Khan, 2010).

**Tabla 8:** Fitoquímicos de *P. granatum*.

<b>Componente de la planta</b>	<b>Constituyentes</b>
Jugo de granada	Antocianinas, glucosa, ácido ascórbico, ácido elágico, ácido gálico; ácido cafeico; catequina, EGCG, quercetina, rutina; numerosos minerales, particularmente hierro; aminoácidos.
Aceite de semilla	Ácido púnicico 95%; otros constituyentes, incluyendo ácido elágico; otros ácidos grasos; esteroides.
Cáscara, corteza	Punicalaginas fenólicas; ácido gálico y otros ácidos grasos; catequina, EGCG; quercetina, rutina y otros flavonoles; flavonas, flavononas; antocianidinas.
<b>Hojas de granado</b>	Taninos (punicalina, punicefolia); glucósidos flavona, incluyendo luteolina y apigenina.
Flores de granado	Ácido gálico, ácido ursólico; triterpenoides, incluyendo ácido Asiático y maslínico; otros constituyentes no identificados.
Raíces y corteza	Elagitaninos, incluyendo punicalina y punicalagina; numerosos alcaloides piperidina.

Nota: Elaboración propia con base en (Dahham, Ali, Tabassum, & Khan, 2010).

### **6.12 *Tagetes lucida* (Pericón)**

De acuerdo al sistema de clasificación de plantas florales, de Cronquist (1981), determinado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

**Tabla 9:** Identificación taxonómica de *T. lucida*.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta (Plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Tagetes</i>
Especie	<i>Tagetes lucida</i> Cav.
Nombre coloquial	Pericón
Sinonimia coloquial	Jolomocox, ucá, i'yá (Guatemala), anisillo, curucumín, hierba anís, hierba de San Juan, periquillo, yiauthli (México) y estragón de invierno” (Colombia).
Sinonimia científica	<i>Tagetes florida</i> Sweet, <i>Tagetes gillettii</i> De Wild, <i>Tagetes pineda</i> La Llave, <i>Tagetes schiedeana</i> Less

Nota: Elaboración propia con base en (Vibrans, 2009) y (Martínez, Bettucci, Gatusso, & Cortadi, 2013).

Es una planta herbácea, perenne, erecta, que crece de 46 a 76 cm de alto y 48 cm de ancho, espesa con muchos tallos lisos, rectos, poco ramificados que parten de la base; sus hojas son opuestas, lineares, elípticas, de 2 a 10 cm de largo y 0.5 a 2 cm de ancho, finamente aserradas. Sus flores son de casi 1.5 cm de diámetro, bisexuales, con corolas amarillas a amarillo naranjas, de 4 a 6 mm de largo y presenta olor a anís al estrujarse (Vibrans, 2009) (Martínez, Bettucci, Gatusso, & Cortadi, 2013).

Nativa de América tropical, desde México hasta Honduras. Los estados de la República Mexicana en los que crece son: Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas. (Vibrans, 2009) (Martínez, Bettucci, Gatusso, & Cortadi, 2013). En la región del bajío, florece durante los meses de julio a diciembre (Vibrans, 2009).

En México, la infusión de sus hojas, tallos y flores se emplea como tónico para combatir la tos, dolores de cabeza, fiebres, trastornos gastrointestinales, dolor corporal y emenagoga. En Guatemala sus extractos se venden como infusión, tintura y elixir. Además, se ha demostrado su actividad antimicrobiana y antifúngica, así como gastrointestinal y espasmolítica. (Martínez, Bettucci, Gatusso, & Cortadi, 2013).

Dentro de sus componentes, se ha reportado que contiene metil eugenol (80%) y estragol (12%), principalmente, en el aceite obtenido de esta planta en México, estragol (45%) y metil eugenol (20%) en Hungría; así como anetol (23.8%), eugenol (24.3%) y estragol (33.9%) en Guatemala, y sólo estragol (95-97%) en Costa Rica (Regalado, Fernández, Pino, Mendiola, & Echemendia, 2011).

En otro estudio, se aislaron 4 cumarinos de un extracto metanólico de la planta completa colectada en México, también 3 bitieniles fueron aislados de sus raíces. El aceite esencial de sus hojas, por su parte, contiene 40 compuestos volátiles, de los cuales el estragol (96.8%) es el de mayor proporción (Lim, 2014). En la tabla siguiente se resumen los fitoquímicos identificados en las diferentes partes de la planta, de acuerdo a los resultados obtenidos en estudios previos, reportados en la literatura.

**Tabla 10:** Fitoquímicos de *T. lucida*.

Componentes de la planta	Constituyentes
Hojas	Estragol, mirceno, (E)- $\beta$ -ocimeno, linalool, $\beta$ -cariofileno, germacreno-D, (E,E)- $\alpha$ -farneseno y trazas de etil 2-metil butanoato, (Z)-3-hexenol, (Z)-3-hexenil acetato, (Z)- $\beta$ -ocimeno, carvona, chavicol, (E)-anetol, $\alpha$ -cubebeno, eugenol, $\beta$ -bourboneno, $\beta$ -elemeno, $\beta$ -copaeno, trans- $\alpha$ -bergamoteno, aromadendreno, (E)- $\beta$ -farneseno, (Z,E)- $\alpha$ -farneseno, biciclogermacreno, $\alpha$ -muuroleno, $\delta$ -cadineno, elemol, 1,10-di-epi-cubenol, epi- $\alpha$ -muurolol, $\alpha$ -muurolol, $\alpha$ -cadinol, 14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno, n-octadecano, n-nonadecano, n-eicosano, n-heneicosano, fitol, n-docosano, n-tricosano, hexahidrofarnesilacetona.
Flores	Bifenilos: 5'-metil-5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bifenilo, 5-(3-penten.1-inil)-2,2'-bifenilo n-heneicosano; $\delta$ -cadineno
Raíces	Cumarinos, 3 bifenilos: 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bifenilo (BBT), 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bifenilo (BBTOH), 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bifenilo (BBTOAc) y $\alpha$ -tertiofeno; tiofeno: 2,2':5',2''-tertienil (alfa-T).
Partes aéreas (hojas, flores, tallos)	Estragol, monoterpenos, $\beta$ -mirceno, (E)- $\beta$ -ocimeno, linaool, hidrocarburos sesquiterpenos, $\beta$ -cariofileno, (E)- $\beta$ -farneseno, germacreno-D y (E,E)- $\alpha$ -farneseno; cumarinos: 7,8-dihidroxicumarino, umbeliferona, escoparona, esculetina, 6-hidroxi-7-metoxicumarino, herniarina, escopoletina; flavonoides: patuletina, quercetina y quercetagina.

Nota: Elaboración propia con base en Fuente: (Lim, 2014) (Regalado, Fernández, Pino, Mendiola, & Echemendia, 2011).

## 6.13 Microorganismos resistentes sobre superficies

### 6.13.1 *Enterobacter aerogenes*

Bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no formador de esporas, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que ha sido reportado como un importante patógeno oportunista multiresistente, durante las últimas 3 décadas en salas hospitalarias. Posee una amplia

habilidad para desarrollar mecanismos de resistencia a antibióticos como las cefalosporinas, y presenta cascadas reguladoras redundantes que controlan eficazmente la permeabilidad de las membranas, asegurando la protección bacteriana y la expresión de enzimas desintoxicantes, implicadas en la degradación o inactivación de antibióticos; características que le permiten colonizar diversos ambientes hostiles y adaptar rápidamente su metabolismo y fisiología a éstos (Davin-Regli & Pagés, 2015).

### **6.13.2 *Escherichia coli***

Es un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo, que no tiene la capacidad de formar esporas, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Escherichia* y forma parte de la flora intestinal, aunque es conocido como un enteropatógeno. Posee flagelos, por lo cual es móvil, tiene fimbrias y pilis. Puede causar enfermedades, como infección de vías urinarias, sepsis, bacteriemia y meningitis, así como diarrea, la cual es su manifestación clínica más representativa. Su información genética se encuentra en los plásmidos, los cuales producen sus toxinas y son la causa de la resistencia a antibióticos (Murray, 2013).

Se puede clasificar en varios tipos, de acuerdo con diferentes factores de virulencia: *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxígena (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (OMS, Hojas de información microbiológica, 2008).

### **6.13.3 *Klebsiella pneumoniae***

Bacilo Gram negativo, inmóvil, con cápsula de gran tamaño que impide su fagocitosis, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Forma parte de la flora habitual intestinal y de la cavidad oral e infecta principalmente el aparato respiratorio, causando neumonías, aunque también puede infectar el tracto urinario. Es conocido como un microorganismo intrahospitalario, dado que casi todas las infecciones por su causa se adquieren en el hospital u ocurren en pacientes debilitados por enfermedades subyacentes (Murray, 2013) (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010).

#### **6.13.4 *Pseudomona aeruginosa***

Bacteria Gram negativa perteneciente a la rama  $\gamma$  de las proteobacterias, a la que pertenecen también las enterobacterias; potencialmente patógena para el ser humano, capaz de crecer en lugares con escasos nutrimentos, utilizando gran variedad de compuestos orgánicos como sustrato. Constituye un importante problema de salud en centros hospitalarios, porque produce infecciones (especialmente en pacientes con cáncer y quemados) y genera compuestos tóxicos que causan daño tisular extenso e interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Además, algunas proteínas que intervienen en la infección de esta cepa, como las exotoxinas A y S, y las enzimas hidrolíticas degradan las membranas y tejidos conjuntivos de diversos órganos. Es un microorganismo de muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y desinfectantes (Soberón, 2002).

#### **6.13.5 *Salmonella typhimurium***

Bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, no formadora de esporas, anaerobia facultativa y móvil, que predomina en la flora intestinal y suele ser de alta toxicidad debido a los polisacáridos que la conforman, los cuales también la protegen del ambiente intestinal. Produce, típicamente, 4 manifestaciones clínicas: gastroenteritis, que se caracteriza por la aparición de diarrea leve a fulminante, náuseas, vómito y afectación de las microvellosidades del intestino, 6 a 72 h después de la infección; bacteriemia o septicemia, fiebre tifoidea o paratifoidea, la cual consiste en fiebre progresiva asociada a estreñimiento o diarrea profusa de carácter inflamatorio, y la condición de portadoras de personas infectadas (OMS, Hojas de información microbiológica, 2008) (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010) (Murray, 2013).

#### **6.13.6 *Serratia marcescens***

Bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae* que causa serias infecciones de las vías urinarias, neumonías, septicemias, meningitis, bacteriemias, endocarditis, peritonitis, osteomielitis, así como brotes nosocomiales en pacientes inmunosuprimidos. Su adquisición tiene lugar principalmente en hospitales, por lo que se considera un patógeno oportunista. Presenta una compleja envoltura compuesta por 2 membranas distintas: una externa y otra interna, las cuales están formadas por proteínas y

fosfolípidos; la membrana externa contiene lipopolisacáridos, es asimétrica y funciona como barrera semipermeable de moléculas hidrofílicas (Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014).

#### **6.13.7 *Shigella flexneri***

Bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y al serotipo B de *Shigella*, es no esporulante, aerobio facultativo e inmóvil. Agente patógeno entérico que se transmite predominantemente por vía fecal-oral y puede ocasionar enfermedades intestinales graves, incluida la disentería bacilar. Algunos de sus factores de virulencias son toxina tipo shiga, enterotoxinas y factor de adherencia intestinal, su periodo de incubación es de 24 a 72 h, generando inicialmente cólicos, fiebre y diarrea acuosa (OMS, Hojas de información microbiológica, 2008) (Murray, 2013).

#### **6.13.8 *Staphylococcus aureus***

Coco Gram positivo que, generalmente, se dispone en forma de racimo, puede ser aerobio o anaerobio, no es esporulante, no tiene flagelos, es inmóvil, con actividad coagulasa y catalasa. Posee diferentes enterotoxinas, responsables de la diarrea e incluso el vómito. Se encuentra relativamente extendido en el medio ambiente, pero se halla principalmente en la piel y las mucosas de los animales. Forma parte de la microflora humana y puede producir enfermedad mediante 2 mecanismos, uno se basa en su capacidad para proliferar y propagarse por los tejidos y otro en su capacidad para producir toxinas y enzimas extracelulares. Cuando se multiplica en los tejidos puede producir manifestaciones como forúnculos, infecciones cutáneas, postoperatorias de heridas e intestinales, septicemia, endocarditis, osteomielitis y neumonía (OMS, Hojas de información microbiológica, 2008).

#### **6.13.9 *Staphylococcus epidermidis***

Coco Gram positivo, organizado en forma de racimos de uvas que, a diferencia de *S. aureus*, no produce enzima coagulasa. Se le encuentra en la microflora de la piel y mucosas de los mamíferos y es generalmente inocuo; pero puede generar infecciones en pacientes inmunocomprometidos o en quienes se han implantado dispositivos médicos como catéteres intravasculares, válvulas cardíacas o prótesis articulares, debido a su capacidad para formar

biopelícula en distintas superficies y materiales, razón por la cual se le considera una bacteria oportunista (Ortega-Peña & Franco-Cendejas, 2014).

#### **6.13.10 *Vibrio parahaemolyticus***

Bacteria halofílica Gram negativa, miembro de la familia *Vibrionaceae* que está presente en ambientes estuarinos, marinos y costeros. Responsable de la gastroenteritis aguda humana, así como de infecciones en heridas, oído o septicemia en individuos con condiciones médicas preexistentes. Posee 2 factores de virulencia: la hemolisina directa termoestable, una proteína formadora de poros que contribuye a la colonización de la bacteria en humanos y la hemolisina relacionada con TDH, con una función similar (Letchumanan, Chan, & Lee, 2014).

## VII. METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Biotecnoambiental de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), de la Facultad de Biotecnología, las plantas que se usaron para el presente proyecto, provienen de regiones diferentes del estado de Puebla y Morelos, por otro lado, los microorganismos que se emplearon para dicho proyecto fueron ATTC y clínicos provenientes proporcionados por el Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla.

### 7.1 Plantas de estudio

Se seleccionaron 3 especies de plantas medicinales, *A. indica*, *P. granatum* y *T. lucida*, las cuales se eligieron, mediante una revisión extensa en diversas bases de datos sobre plantas medicinales con efecto antimicrobiano; estas plantas son ampliamente distribuidas y cultivadas en diferentes estados del país, incluyendo Puebla. Sus datos de identificación y recolección se enlistan en la tabla 11; fueron cuidadosamente evaluadas para la extracción de sus compuestos, para ello se probaron tres diferentes solventes hasta obtener condiciones las condiciones óptimas de extracción.

Una de las consideraciones al respecto fue que las plantas fueran de fácil acceso, ya que no se contaba con los medios para mantenerlas bajo condiciones de cuidado controlado, por lo que se realizó una recolección de acuerdo al estado de la planta, por otro lado, se hizo la identificación a través del jardín botánico de la BUAP, la cual hizo una valoración cuidadosa de las plantas.

**Tabla 11:** Información de identificación de las plantas de estudio.

<b>Especie vegetal</b>	<b>Lugar</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>ID BUAP</b>
<i>A. indica</i>	Tlaquiltenango, Morelos	Latitud: 18.63337, longitud: -99.161208, altitud: 921 m	Huap 64049
<i>P. granatum</i>	Puebla, Pue,	Latitud: 19.09384, longitud: -98.214357, altitud: 2168 m	Huap 64051
<i>T. lucida</i>	Atlixco. Pue.	Latitud: 18.913123, longitud: -98.429389, altitud: 1841 m	Huap 64050

Nota: Ubicación geográfica de las plantas medicinales seleccionadas.

La recolección se realizó durante los meses de julio a septiembre, y de cada una de las plantas, se seleccionaron las hojas verdes, estas debían cumplir los criterios siguientes: las hojas deben observarse sanas y sin síntomas de infecciones ni daños hechos por insectos, patógenos o las inclemencias del tiempo, una vez realizado este proceso de selección, se lavaron cuidadosamente para eliminar residuos como el polvo, posteriormente se secaron durante 2 semanas hasta que fueran fáciles de triturar de forma manual con ayuda de un mortero, para este proceso fue necesario usar un tamiz para eliminar residuos sólidos que no se pueden triturar, finalmente se almacenaron en frascos de vidrio estériles con tapa hermética.

## 7.2 Microorganismos indicadores

En este estudio se incluyeron 10 géneros de bacterias ATCC, las cuales sirvieron de referencia para comparar el efecto inhibitor de los extractos debido a que entre sus características no presentan una resistencia específica, ya que estos microorganismos son identificados y controlados minuciosamente, lo que nos permite usarlos como modelos para este trabajo. Otra razón por la cual se seleccionaron estos géneros, es por ser bacterias de largos periodos de supervivencia sobre superficies inertes, algunas de ellas oportunistas causantes de infecciones nosocomiales.

**Tabla 12:** Microorganismos indicadores para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

<b>Especie</b>	<b>No. ATCC</b>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	27853
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028
<i>Serratia marcescens</i>	13880
<i>Shigella flexneri</i>	12022
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802

Nota: Números ATCC de los microorganismos obtenidos por el Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla.

### 7.3 Microorganismos multirresistentes

Se usaron también los siguientes 6 géneros de bacterias los cuales a diferencia de las ATCC, presentan una resistencia específica a antibióticos; éstas provienen de aislamientos clínicos, es decir, fueron obtenidas mediante análisis que llevó a cabo el laboratorio estatal de salud pública, en ensayos clínicos de pacientes que presentaron una infección intermitente de acuerdo a su estancia en hospitales, los datos de estos pacientes son anónimos y con fines del trabajo no se hará una evaluación al respecto. Uno de los criterios más importantes a destacar de este grupo de estudio es que estos microorganismos multirresistentes de aislamiento clínico, están bien caracterizados y presentan una resistencia y sensibilidad específica ante antibióticos, por lo que para fines de esta investigación resulta conveniente su uso.

**Tabla 13:** Microorganismos multirresistentes para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Especie	Bionúmero	Resistencia
<i>Escherichia coli</i>	0405610450026611	Ciprofloxacino
<i>Klebsiella spp.</i>	6605734673564210	Ampicilina, Tigeciclina, Nitrofurantoína
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	6425511451056230	Piperacilina/Tazobactam, Cefazolina, Ceftriaxona, Aztreonam, Nitrofurantoína
<i>Staphylococcus aureus</i>	010402072763271	Bencilpenicilina, Oxacilina, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Moxifloxacino, Eritromicina, Clindamicina
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	030400076221211	Belcilpenicilina, Oxacilina, Gentamicina, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Eritromicina, Clindamicina, Trimetoprima/Sulfametoxazol

Nota: Microorganismos de origen clínico obtenidas por el Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla.

## **7.5 Secado y pulverizado**

Previo a la preparación de los extractos fue necesario un lavado, secado y molienda del material vegetal, a fin de evitar la contaminación de la planta, homogenizar la muestra e incrementar el área superficial de contacto entre ésta y el solvente, debido a la reducción de tamaño del material vegetal que se logra con la molienda, la cual, a su vez, mejora la cinética de la extracción analítica, reduce el periodo de extracción y aumenta su eficiencia.

Se lavaron con agua estéril las hojas de *A. indica*, *P. granatum* y *T. lucida*; se extendieron sobre papel, en un cuarto a temperatura ambiente, y se dejaron reposando durante un periodo de 2 semanas para eliminar progresivamente su humedad, hasta una cantidad menor al 10 % (aproximadamente); volteando todo el material dos veces al día para obtener un secado uniforme y evitar que la humedad fuera una fuente para el crecimiento de bacterias, que en su mayoría requieren más del 40 % de humedad para poder reproducirse y especímenes de hongos que crecen en un 15 a 20 % de humedad; la finalidad de este proceso fue estabilizar y conservar en estas especies sus propiedades físicas.

Para comprobar que las hojas estuvieran lo suficientemente secas, se doblaron y cuando éstas se fragmentaron, se procedió a triturarlas con ayuda de un mortero hasta convertirlas en fino polvo, separando únicamente hojas de las demás partes de cada planta. Se removieron escombros del material granulado, haciendo pasar la molienda a través de un tamiz de 250  $\mu\text{m}$ .

## **7.4 Preparación de los extractos vegetales**

Existen diferentes técnicas utilizadas para la elaboración de extractos de plantas medicinales, las cuales se pueden clasificar por su selectividad a determinados grupos de compuestos y otras más generales, que utilizan un arreglo de pasos consecutivos con solventes que van de no polares a muy polares; algunos de los principales métodos usados con este fin son soxhlet, sonicación, maceración y percolación.

La técnica que se seleccionó para extraer los componentes de las plantas en este estudio, consistió en una maceración en frío de los extractos, para no aplicar calor y, de esta manera, evitar pérdidas de compuestos termolábiles importantes que pudieran estar presentes en éstas; debido a que los extractos se obtuvieron como una mezcla de sus componentes y no como metabolitos aislados, por no contar con los medios necesarios para la purificación e identificación de cada uno de ellos.

En el proceso se concentraron los extractos clorofórmicos y etanólicos en rotavapor, y los acuosos mediante liofilización; se evaluó la acción de 3 solventes: cloroformo para los compuestos menos polares, etanol para los de polaridad intermedia y agua destilada para los completamente polares, y se realizó la preparación por triplicado para calcular un promedio del extracto seco obtenido.



**Figura 2:** Pasos generales para la preparación de los extractos vegetales, elaboración propia.

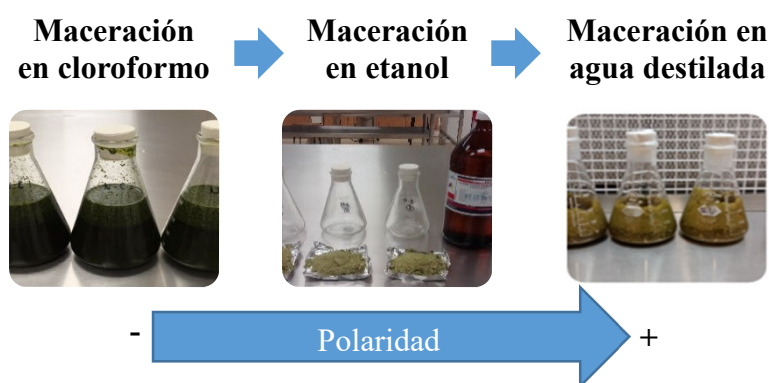
Se probaron, además, 3 preparaciones finales para los extractos: resuspenderlos con su mismo solvente de maceración, con diferente solvente y aplicando calor por infusión de las plantas para determinar el método que extrae componentes de mayor acción contra microorganismos patógenos.

## 7.6 Maceración en frío

Este método, el cual consiste en colocar el material vegetal en un frasco cerrado con el disolvente y dejarlo reposar a temperatura ambiente durante un periodo de al menos 3 días con agitación frecuente, hasta que la materia soluble se disuelva; por lo que para este proceso se probó con diferentes condiciones de extracción así como distintas proporciones planta:solvente y tiempos de maceración.

Se determinó pesar 20 g del material triturado de cada planta, en matraces volumétricos de 250 mL, se colocó cada porción y se le añadió 200 mL de cloroformo a cada uno (proporción 1:10 vegetal:solvente), de manera que se generaron 9 extractos en total en esta primer etapa. Se taparon y sellaron todos los matraces para evitar la evaporación del solvente, se cubrieron con papel aluminio para proteger los extractos de la luz y se dejaron reposar durante 5 días, agitando 2 veces al día.

Después, las mezclas se colaron y clarificaron por filtración al vacío, utilizando papel filtro Whatman No. 1 para separar el polvo de las plantas de la solución líquida, al cual se dejó evaporar los restos de solvente y una vez seco se pesó nuevamente, y se mezcló con 200 mL de etanol, repitiendo el procedimiento descrito para los extractos clorofórmicos. Finalmente, el pulverizado vegetal es recuperado en este paso, tras el filtrado de los extractos etanólicos, se pesó y se mezcló con 200 mL de agua destilada estéril, repitiendo por 3° ocasión el procedimiento anterior. En total se obtuvieron 3 tipos de extractos por cada planta.



**Figura 3:** Secuencia de maceraciones por polaridad de los solventes, elaboración propia.

Se concentraron en rotavapor los extractos filtrados de cloroformo y etanol, mientras que los acuosos se dividieron en 2 porciones, de las cuales se liofilizó una parte y se secó en rotavapor la otra. Posteriormente, y como primera prueba, se hidrataron los extractos secos con el mismo solvente con el que se maceraron, se esterilizaron a través de filtración por membrana, utilizando filtros Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  y se almacenaron en tubos de vidrio estériles, cubiertos con papel aluminio, a 4 °C hasta su uso para determinar su actividad antimicrobiana. En una segunda etapa, se repitió la preparación de los extractos, pero

hidratando con agua destilada estéril, los extractos macerados en etanol y agua, y con acetato de etilo los macerados en cloroformo y se almacenaron de la misma manera para evaluar también su efecto inhibidor.

### **7.7 Secado en rotavapor**

Se llevó a cabo una destilación al vacío de los extractos filtrados de cloroformo y etanol, en un evaporador rotatorio o rotavapor, para separar su fracción más volátil (los solventes), a una temperatura menor a la de su punto de ebullición, gracias a la presión de vacío con la que trabaja el equipo y con la cual se evitó la aplicación de temperaturas altas, para respetar las características del producto original.

El equipo utilizado fue un rotavapor Hahnvapor, marca Hahnshin Scientific CO, modelo HS-2001NS, el cual se operó a presión reducida, 80 revoluciones por minuto (rpm) y temperatura no mayor a 40 °C hasta evaporación total de los solventes, condiciones que fueron determinadas seleccionando la menor temperatura y velocidad a la que los solventes fueran capaces de evaporarse. Se pesaron los matraces vacíos y los matraces con los sedimentos obtenidos al final de la destilación al vacío, para conocer el rendimiento de la extracción y la concentración de los extractos a evaluar sobre las bacterias.

### **7.8 Liofilización**

Los extractos acuosos, por su parte, no se filtraron al vacío sino a través de gasas para quitar el exceso de materia vegetal, después se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min, en un equipo marca Thermo modelo HNS II, y se recuperaron los sobrenadantes, los cuales fueron congelados a -15 °C para su conservación hasta su uso.

Para secar los extractos acuosos, se descongelaron las muestras colocándolas a 4 °C, a fin de evitar choques térmicos que pudieran afectar su composición y se dividieron en 2 porciones, una de las cuales se expuso a una mezcla de CO<sub>2</sub> y acetona para su congelación. Posteriormente, se pusieron en una liofilizadora marca Scientz modelo SC-10N a -40 °C y 15 Pa durante aproximadamente 8 horas, para la sublimación de su contenido acuoso, generando un cambio del estado sólido a vapor del agua sin pasar por el líquido, el cual

permite estabilizar y conservar los productos, así como reducir las pérdidas de compuestos lábiles. Característica que depende de 2 puntos críticos: la transferencia térmica y másica que se produce en la sublimación, para la cual es necesario alcanzar un equilibrio.

El material resultante fue recolectado y resguardado en frascos estériles, cubiertos con papel aluminio para protegerlos de la luz, y se guardaron en un desecador para su conservación hasta su empleo.

## **7.9 Resuspensión de los extractos**

Los extractos, una vez secos, se disolvieron en su mismo solvente de maceración a una concentración de 1 g/ml, así como en acetato de etilo (los extractos clorofórmicos) y en agua destilada estéril (los etanólicos y acuosos), a la misma concentración, como parte de una segunda etapa del proyecto, para evaluar la influencia del solvente sobre la acción antimicrobiana de los mismos.

## **7.15 Infusión de plantas**

Se prepararon infusiones con cada una de las 3 plantas, para evaluar también su efecto antimicrobiano sobre las bacterias de estudio y comparar la influencia de la temperatura en la extracción de componentes activos; para ello, se disolvieron 5 g del material vegetal previamente triturado de las plantas, en 250 ml de agua destilada estéril en punto de burbuja y se dejó hervir durante 20 minutos, hasta que el color de las mezclas se intensificó. Después se dejaron reposar, a temperatura ambiente, por 30 minutos se volvieron a calentar, cuidando que esta vez no ebullean.

Las infusiones resultantes se vertieron, en condiciones de esterilidad (entre la flama de 2 mecheros), en frascos de vidrio estériles, los cuales se cerraron, se rotularon y almacenaron a una temperatura de 4 °C, dejándose macerando con el triturado de las plantas durante 3 semanas. Transcurrido ese tiempo, las infusiones fueron filtradas a través de gasas, centrifugadas, concentradas en rotavapor e hidratadas bajo las mismas condiciones que los extractos acuosos anteriores, obteniéndose una concentración final de 1 g/ml en cada una.

## **7.10 Pruebas de sensibilidad microbiana**

La actividad antimicrobiana de los extractos se evaluó mediante el método de Kirby Bauer (difusión en disco), por ser el método oficial usado en muchos laboratorios de microbiología clínica para la realización de ensayos rutinarios de susceptibilidad antimicrobiana, que ha sido recomendado por el NCCLS, anteriormente Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos, para determinar *in vitro* la inhibición de bacterias, de rápido crecimiento y algunas patógenas fastidiosas, ante nuevos agentes antimicrobianos.

Los resultados obtenidos con esta técnica son de tipo cualitativo, pero permiten clasificar a la bacteria como susceptible, intermedia o resistente. Este método ofrece ventajas como sencillez, bajo costo, capacidad para evaluar gran cantidad de microorganismos y agentes antimicrobianos, y facilidad para interpretar los resultados (Prat, 2004) (Balouiri, Sadiki, & Ibnsouda, 2016).

Se realizaron 3 repeticiones de cada prueba de sensibilidad antimicrobiana, las cuales se dividieron por tipo de planta, colocando por triplicado los discos con los extractos de una misma especie vegetal.

## **7.11 Preparación del inóculo**

Previo a la prueba de difusión en disco, se realizó, siguiendo el método de suspensión directa de colonias, una solución con las bacterias a analizar; se tomaron 3 a 5 colonias con un asa, a partir de placas de cultivo, sembradas con anterioridad en base agar, con crecimientos de 18 a 24 h, se depositaron en 5 ml de suero fisiológico y se ajustaron los inóculos a una turbidez equivalente a la del estándar MacFarland 0.5 con ayuda de un espectrofotómetro UV Vis marca HACH modelo DR 2800, a una longitud de onda de 625 nm, lo que resultó en una suspensión con  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  UCF/mL que se homogenizó en un agitador "vortex" durante 15-20 segundos.

### **7.12 Preparación de estándar MacFarland 0.5**

Se utilizó un estándar de turbidez de BaSO<sub>4</sub>, equivalente a un estándar MacFarland 0.5 o su equivalente óptico para estandarizar la densidad de los inóculos usados en las pruebas de susceptibilidad. Para prepararlo se mezcló 0.5 ml de 0.048 M de BaCl<sub>2</sub> (1,175% BaCl<sub>2</sub>+2H<sub>2</sub>O) en 99,5 ml de 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v/v) con agitación constante y se verificó que su absorción a 625 nm estuviera entre 0.08 y 0.10. Se distribuyeron alícuotas de 4 a 6 ml en tubos con tapón de rosca y se guardaron en la oscuridad a temperatura ambiente.

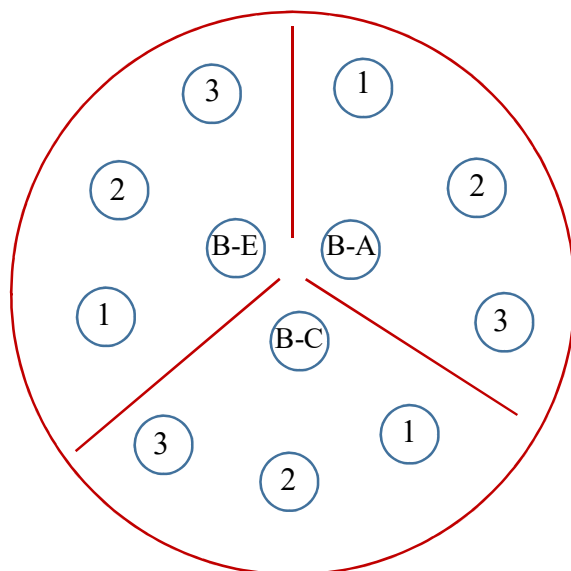
### **7.13 Inoculación de las placas**

Antes de transcurridos 15 minutos de haber ajustado los inóculos, se colocaron 100 µL de las suspensiones en placas de 100 x 15 mm con agar Mueller-Hinton, distribuyéndolos de manera uniforme sobre toda la superficie de la placa, sin dejar ninguna zona libre, con ayuda de perlas de ebullición, rotando la placa unos 60° y moviendo en todas direcciones; se dejaron entreabiertas las tapas de las placas, por 3 a 5 minutos, sin exceder de los 15, para permitir que el exceso de humedad en la superficie se absorbiera antes de aplicar el disco con el extracto.

### **7.14 Dispensación de los discos**

Se prepararon los discos con los extractos vegetales, colocando 20 µL de cada uno de estos y de los solventes de extracción, utilizados como controles negativos, sobre discos de papel filtro (Whatman No. 1) de 6 mm de diámetro, previamente esterilizados, y se dejaron secar completamente en la campana de flujo laminar. La masa final obtenida en cada disco fue de 10 mg.

Una vez seca la superficie del medio de cultivo y los solventes evaporados, se colocaron 12 discos en cada caja por cepa probada, como se muestra en el siguiente diagrama.



**Figura 4:** Disposición de los discos con los extractos y blancos en placa, elaboración propia.

Después se incubaron las placas invertidas a 37 °C en atmósfera aeróbica, dentro de una incubadora marca ECOSHEL modelo 9165. Se realizaron evaluaciones a las 18 horas y después a las 24 horas. Como controles negativos se utilizaron los solventes empleados en la preparación de los extractos. Una vez finalizados los periodos de incubación, se midieron los halos de inhibición, incluyendo los diámetros de los discos (Prat, 2004).

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico multifactorial con un nivel de confianza del 95%, con los halos de inhibición obtenidos de cada extracto, utilizando como variable independiente los diámetros en mm de dichos halos y como factores los tipos de extractos y los microorganismos. Se aplicó, además, una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, al obtenerse una diferencia significativa en el análisis ANOVA, para determinar los extractos más efectivos. Se llevaron a cabo análisis estadísticos individuales, por tipo de preparación de los extractos (Ver anexos), así como uno global y se utilizó, para ello, el software IBM SPSS Statistics.

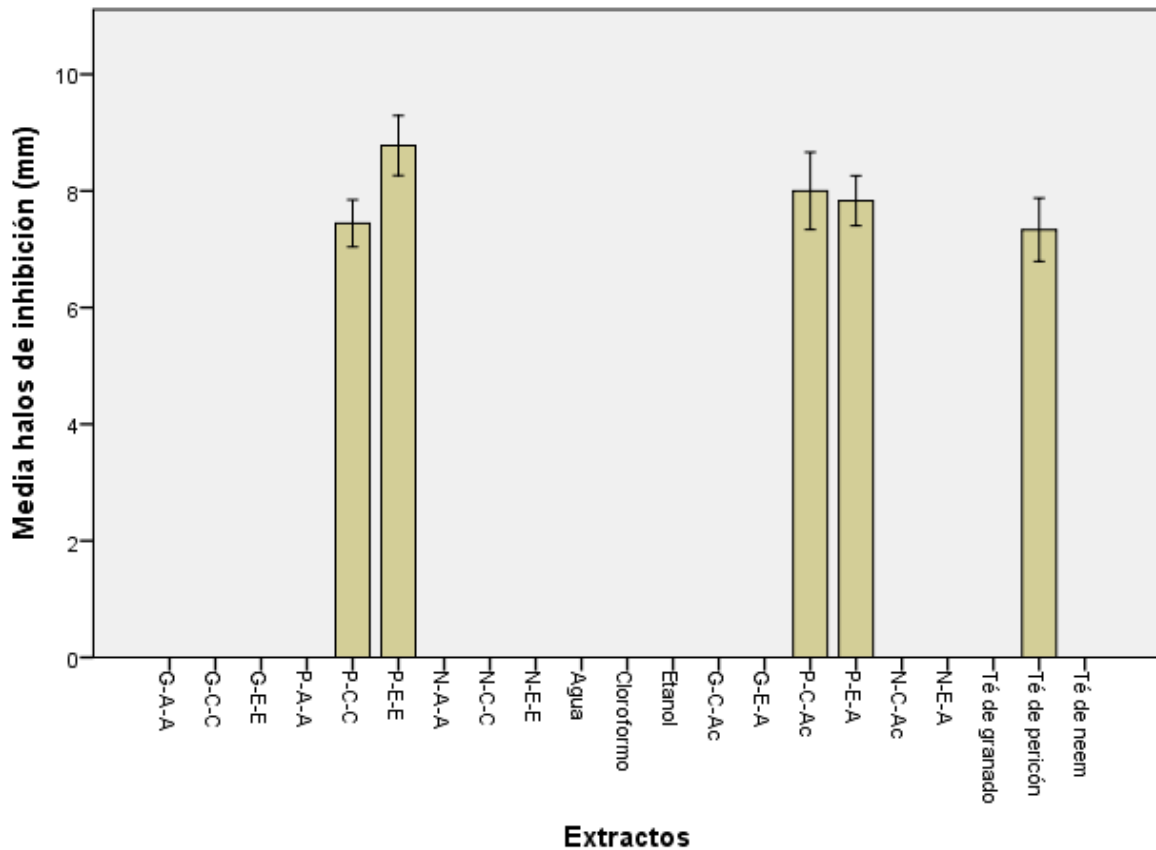
Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana mostraron inhibición en varias de las bacterias de estudio, producida principalmente por extractos de *T. lucida* y en algunos casos por *P. granatum*; *A. indica*, por su parte, presentó mínima acción antibacteriana. A continuación se exponen los análisis de varianza y de comparación de medias de Tukey, así como los gráficos y algunas imágenes de los halos inhibición obtenidos en cada microorganismo evaluado.

**Tabla 14:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *E. coli* ATCC 25922

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	Σ
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
<b>G-A-A</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>G-C-C</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>G-E-E</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>P-A-A</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>P-C-C</b>	8.0	7.0	7.3	7.4	0.5
<b>P-E-E</b>	8.0	9.3	9.0	8.8	0.7
<b>N-A-A</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>N-C-C</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>N-E-E</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
<b>G-C-Ac</b>	0.0	0.0	-	0.0	0.0
<b>G-E-A</b>	0.0	0.0	-	0.0	0.0
<b>P-C-Ac</b>	7.7	8.3	-	8.0	0.5
<b>P-E-A</b>	8.0	7.7	-	7.8	0.2
<b>N-C-Ac</b>	0.0	0.0	-	0.0	0.0
<b>N-E-A</b>	0.0	0.0	-	0.0	0.0
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
<b>TG</b>	0.0	0.0	-	0.0	0.0
<b>TP</b>	7.3	7.3	-	7.3	0.0
<b>TN</b>	0.0	0.0	-	0.0	0.0

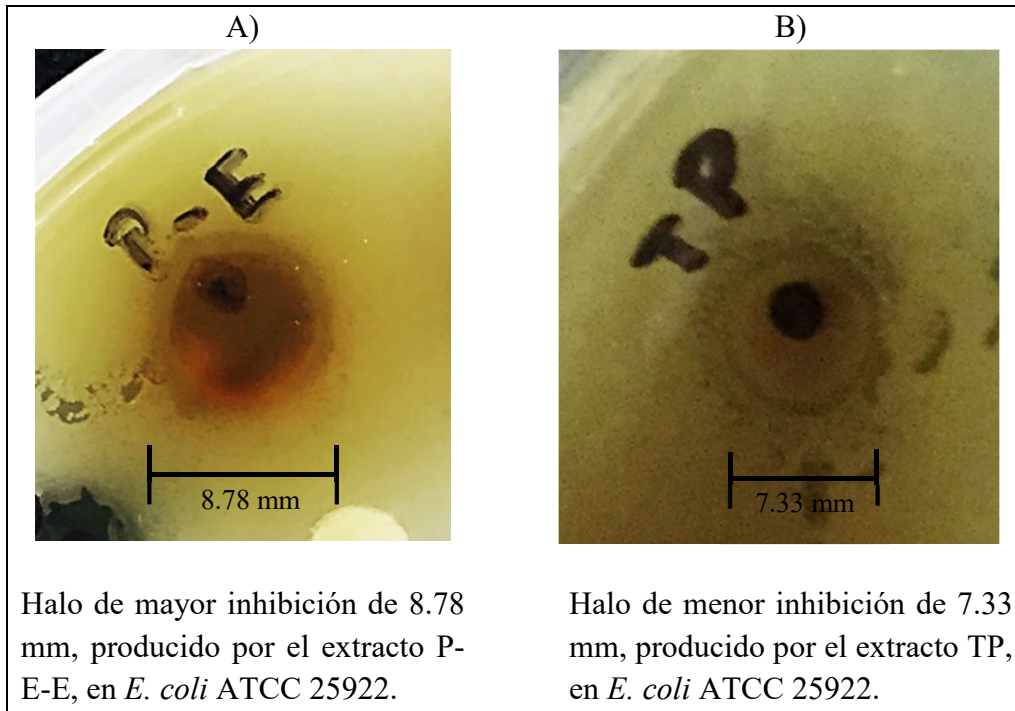
Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

**Gráfica 1:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *E. coli* ATCC 25922



Nota: Barras de error 95% IC.

La gráfica 1 muestra que el diámetro del halo de inhibición de mayor tamaño (8.78 mm) en presencia de *E. coli* ATCC 25922, fue producido por el extracto de pericón macerado y disuelto con etanol (P-E-E), seguido por los halos generados por los extractos de pericón macerado en cloroformo y disuelto con acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado en etanol y disuelto con agua (P-E-A) e infusión de pericón. Los extractos de las demás plantas no presentaron efecto de inhibición sobre el microorganismo; sin embargo, los diámetros obtenidos con los extractos de pericón son pequeños.



**Figura 5:** Halos de inhibición A) Pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E), B) Infusión de pericón (TP), en *E. coli* ATCC 25922.



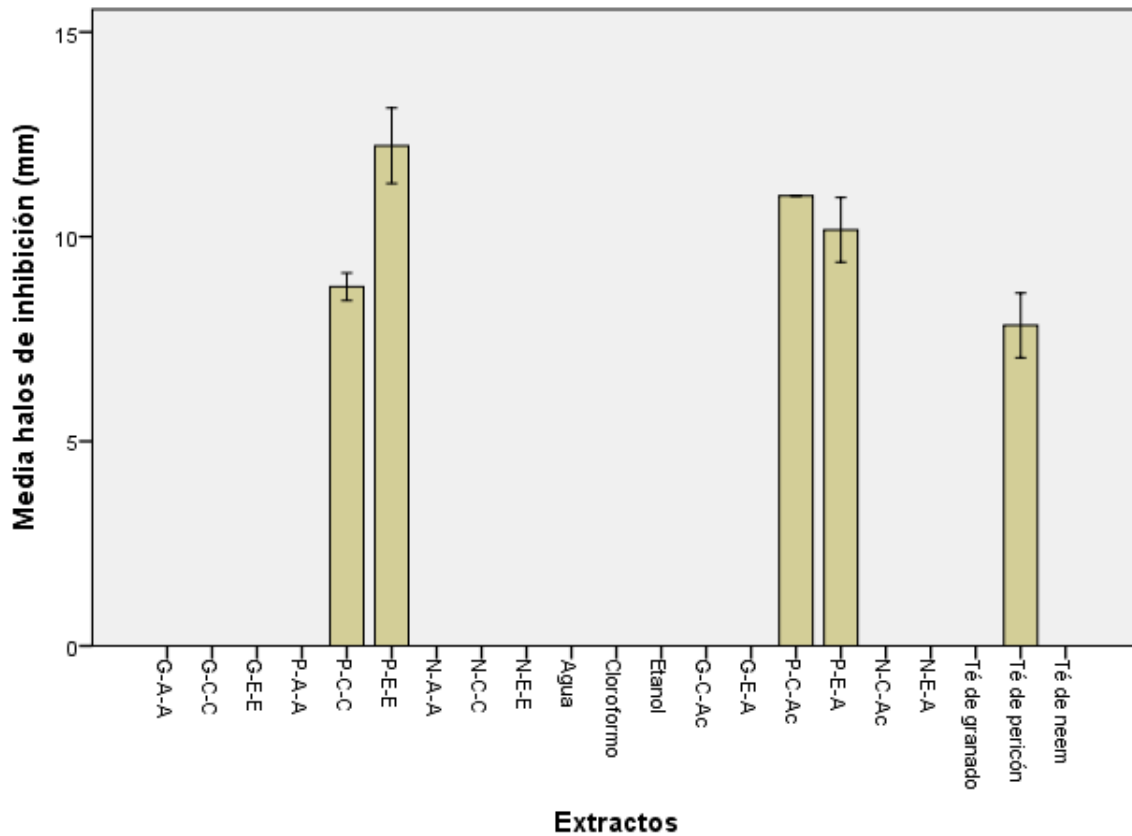
**Figura 6:** Halos de inhibición producidos por el extracto de pericón macerado en cloroformo y disuelto con acetato de etilo (P-C-Ac), en *E. coli* ATCC 25922.

**Tabla 15:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *E. coli* Clínico 0405610450026611

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	Σ
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
<b>G-A-A</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>G-C-C</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>G-E-E</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>P-A-A</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>P-C-C</b>	8.67	8.67	9.00	8.78	0.19
<b>P-E-E</b>	11.67	13.67	11.33	12.22	1.26
<b>N-A-A</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>N-C-C</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>N-E-E</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
<b>G-C-Ac</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>G-E-A</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>P-C-Ac</b>	11.00	11.00	-	11.00	0.00
<b>P-E-A</b>	10.67	9.67	-	10.17	0.71
<b>N-C-Ac</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>N-E-A</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
<b>TG</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>TP</b>	8.33	7.33	-	7.83	0.71
<b>TN</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00

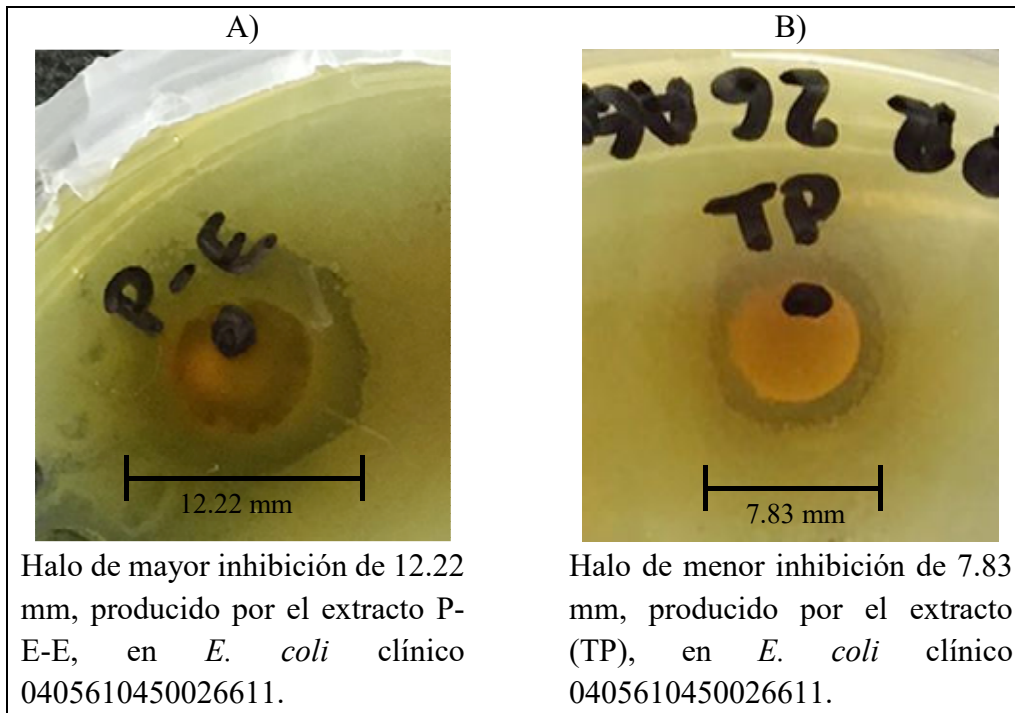
Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

**Gráfica 2:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *E. coli* Clínico 0405610450026611



Nota: Barras de error 95% IC.

En la gráfica 2 se observa que el diámetro del halo de inhibición de mayor tamaño (12.22 mm) en presencia de *E. coli* Clínico 0405610450026611, fue producido por el extracto de pericón, macerado y disuelto con etanol (P-E-E), seguido por los halos generados por los extractos de pericón, macerado en cloroformo y disuelto con acetato de etilo (P-C-Ac); pericón, macerado en etanol y disuelto con agua (P-E-A); pericón, macerado y disuelto con cloroformo (P-C-C) e infusión de pericón. Los extractos de las demás plantas no presentaron efecto de inhibición sobre el microorganismo, resultados que coinciden con los de *E. coli* ATCC 25922, excepto por el tamaño de los diámetros.



**Figura 7:** Halos de inhibición A) Pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E), B) Infusión de pericón (TP), en *E. coli* Clínico 0405610450026611.



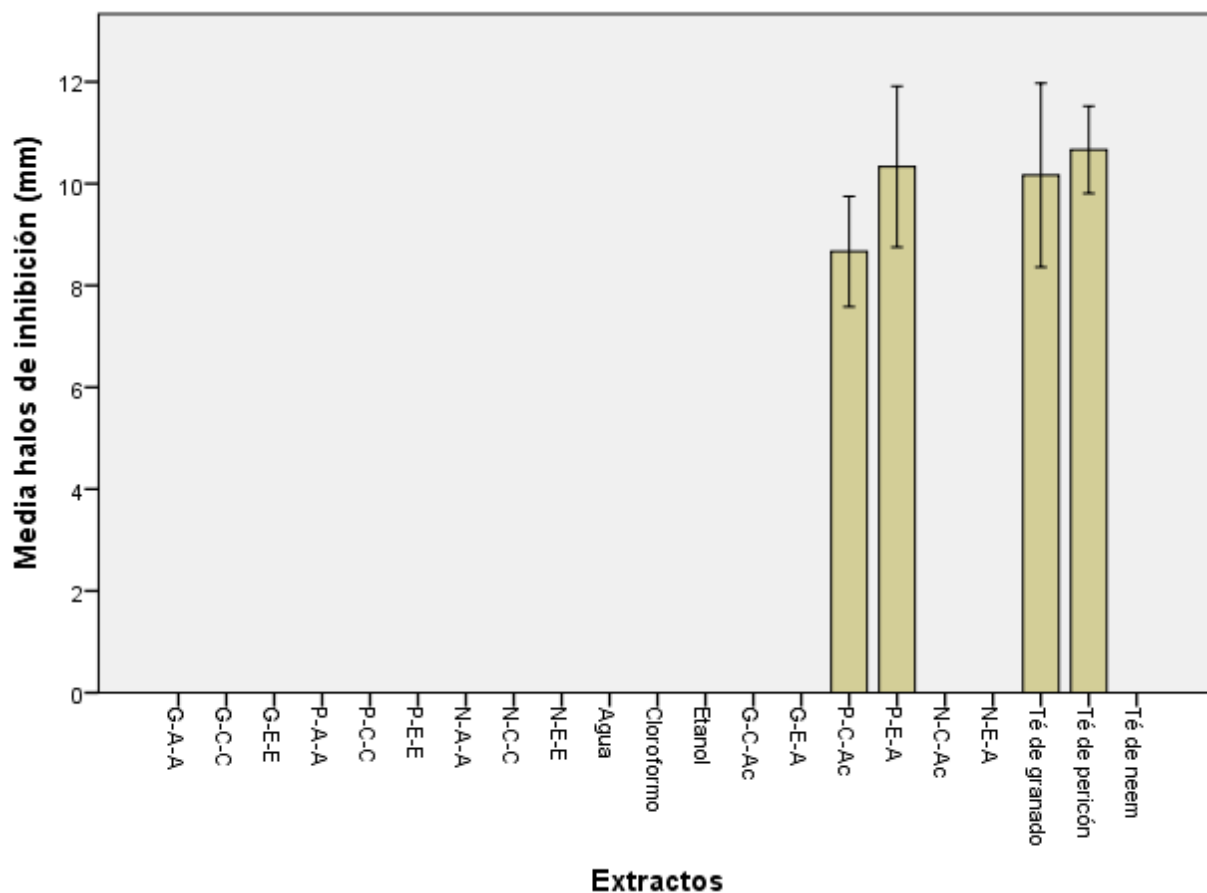
**Figura 8:** Placa de *E. coli* clínico 0405610450026611 con extractos de pericón disueltos en diferente solvente de maceración.

**Tabla 16:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883

Extracto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	Σ
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
G-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
G-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
G-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
P-C-Ac	8.00	9.33	-	8.67	0.94
P-E-A	9.33	11.33	-	10.33	1.41
N-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
N-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
TG	11.67	8.67	-	10.17	2.12
TP	11.33	10.00	-	10.67	0.94
TN	0.00	0.00	-	0.00	0.00

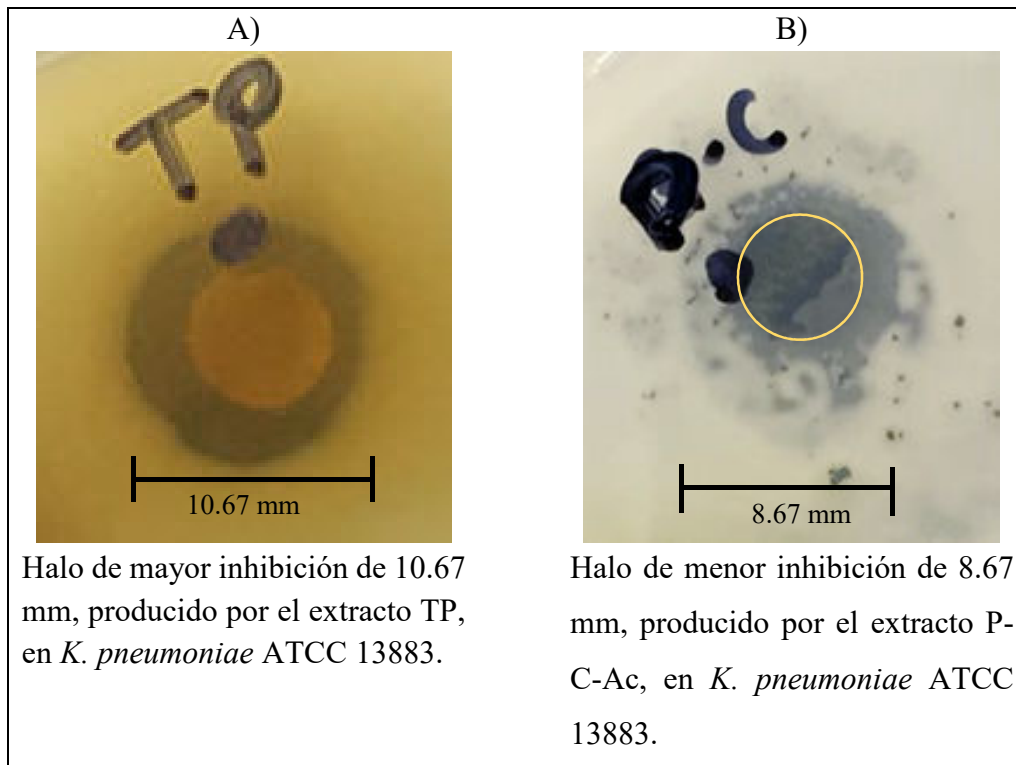
Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

**Gráfica 3:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *K. pneumoniae* ATCC 13883



Nota: Barras de error 95% IC.

La mayor inhibición obtenida en *K. pneumoniae* ATCC 13883, como se aprecia en la gráfica 3, fue generada por la infusión de pericón (10.67 mm), muy similar al halo producido por el extracto de pericón macerado en etanol y disuelto con agua destilada (P-E-A) y la infusión de granado; seguidos por pericón macerado en cloroforno y disuelto con acetato de etilo (P-C-Ac). Los extractos de las demás plantas no presentaron efecto de inhibición sobre el microorganismo. Cabe mencionar, que de los diferentes extractos de granado sólo el preparado con calor pudo inhibir esta bacteria, lo que sugiere que la aplicación de temperatura puede influir en la extracción de compuestos activos.



**Figura 9:** Halos de inhibición A) Infusión de pericón (TP), B) Pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac), en *K. pneumoniae* ATCC 13883.



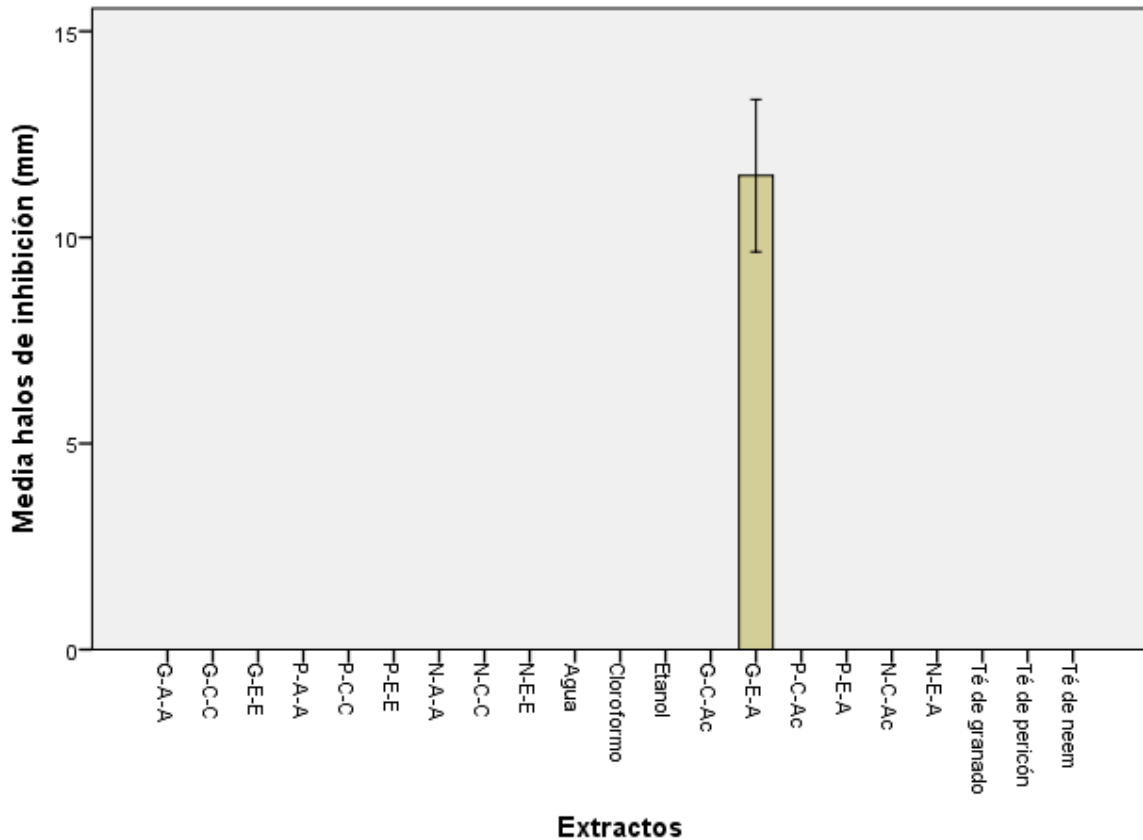
**Figura 10:** Placa de *K. pneumoniae* ATCC 13883 con extractos de pericón disueltos en diferente solvente de maceración.

**Tabla 17:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853

Extracto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	Σ
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
G-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
G-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
G-E-A	13.00	10.00	-	11.50	2.12
P-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
P-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
N-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
N-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
TG	0.00	0.00	-	0.00	0.00
TP	0.00	0.00	-	0.00	0.00
TN	0.00	0.00	-	0.00	0.00

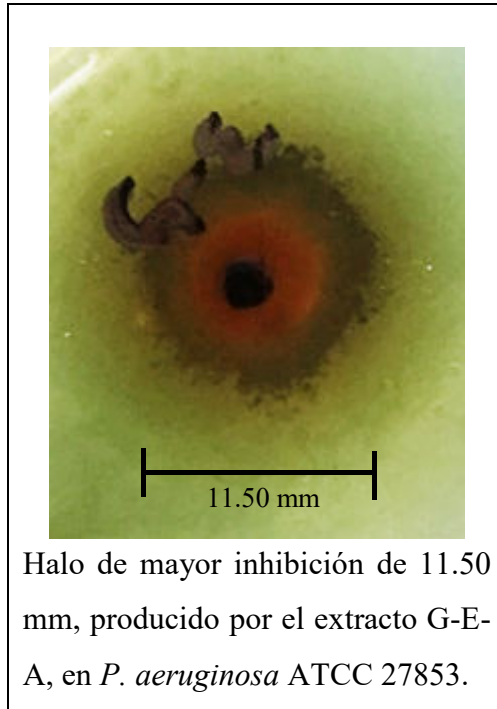
Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

**Gráfica 4:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *P. aeruginosa* ATCC 27853



Nota: Barras de error 95% IC.

Los resultados obtenidos sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853, muestran inhibición, al menos por uno de los extractos: granado macerado en etanol y disuelto con agua destilada (G-E-A), lo cual es relevante considerando que *P. aeruginosa* constituye un problema serio para la salud, entre otras cosas, porque presenta muy alta resistencia natural a diferentes antibióticos y desinfectantes, además que es capaz de colonizar diversas superficies, incluso en los ambientes más inhóspitos, por lo que se le puede encontrar en hospitales y es causa de diversas infecciones nosocomiales. Los datos muestran, además, que el solvente en el que se disuelven los extractos influye en el efecto antibacteriano.



**Figura 11:** Halo de inhibición A) Granado macerado en etanol y disuelto con agua destilada (G-E-A), en *P. aeruginosa* ATCC 27853.



**Figura 12:** Halos de inhibición producidos por los extractos de granado macerado en etanol y disuelto con agua destilada (G-E-A), en *P. aeruginosa* ATCC 27853.

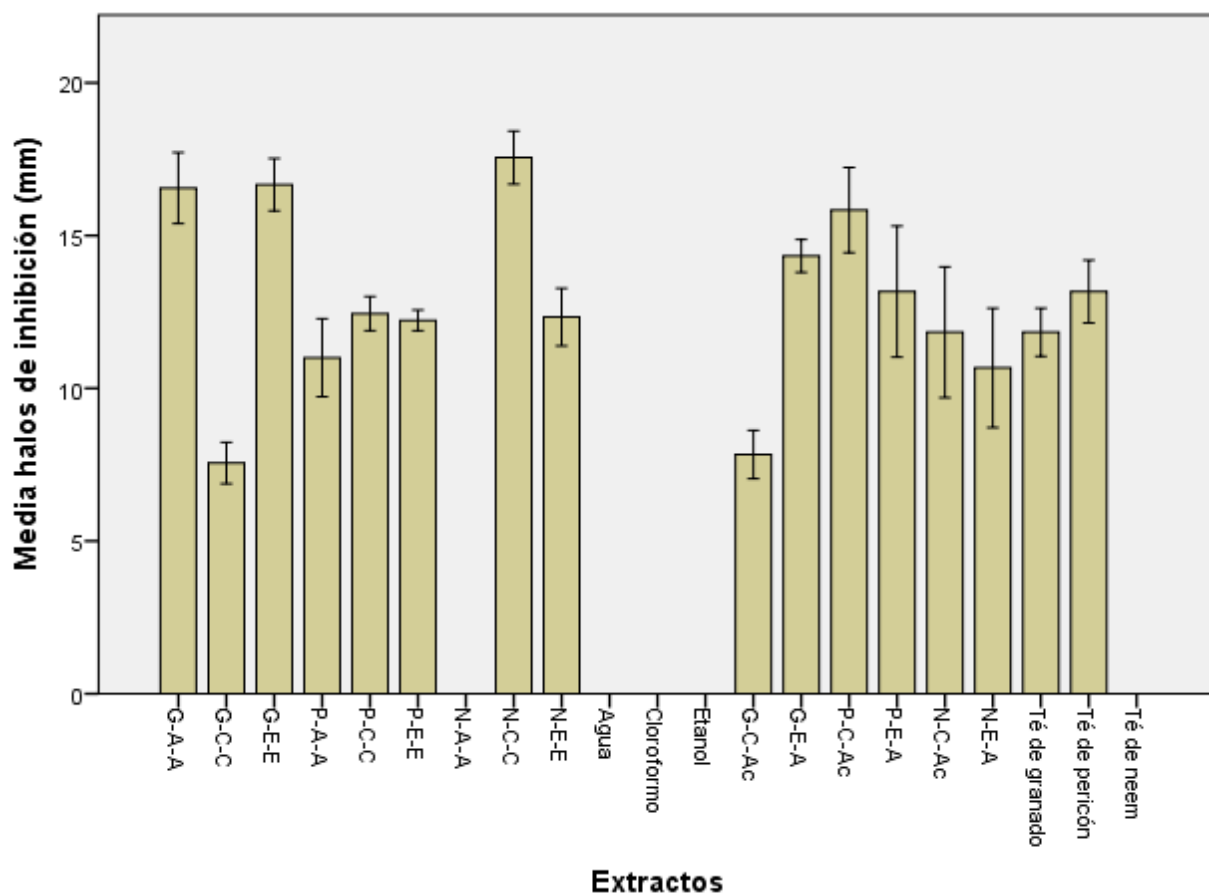
**Tabla 18:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *S. aureus* Clínico 010402072763271

Extracto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	Σ
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
<b>G-A-A</b>	17.33	17.67	14.67	16.56	1.64
<b>G-C-C</b>	7.00	8.67	7.00	7.56	0.96
<b>G-E-E</b>	15.67	18.00	16.33	16.67	1.20
<b>P-A-A</b>	9.00	12.00	12.00	11.00	1.73
<b>P-C-C</b>	12.00	13.33	12.00	12.44	0.77
<b>P-E-E</b>	12.00	12.67	12.00	12.22	0.39
<b>N-A-A</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>N-C-C</b>	16.33	17.67	18.67	17.56	1.17
<b>N-E-E</b>	12.00	11.33	13.67	12.33	1.21
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
<b>G-C-Ac</b>	8.00	7.67	-	7.84	0.23
<b>G-E-A</b>	14.33	14.33	-	14.33	0.00
<b>P-C-Ac</b>	14.67	17.00	-	15.84	1.65
<b>P-E-A</b>	15.00	11.33	-	13.17	2.60
<b>N-C-Ac</b>	10.00	13.67	-	11.84	2.60
<b>N-E-A</b>	9.00	12.33	-	10.67	2.35
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
<b>TG</b>	12.33	11.33	-	11.83	0.71
<b>TP</b>	14.00	12.33	-	13.17	1.18
<b>TN</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00

Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

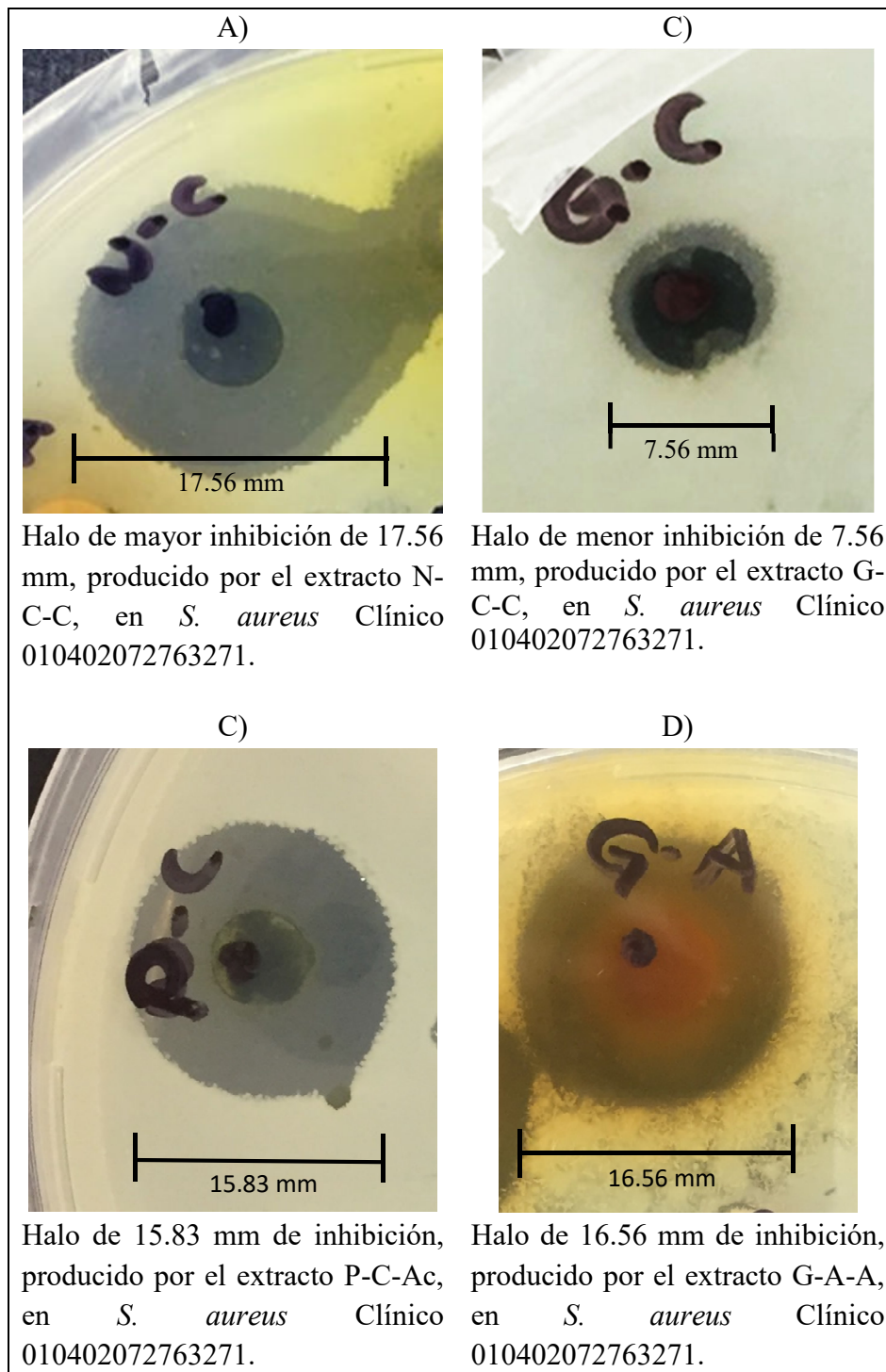
**Gráfica 5:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *S. aureus* Clínico

010402072763271



Nota: Barras de error 95% IC.

Como se observa en la gráfica 5, este microorganismo presentó mayor sensibilidad a los compuestos de las plantas, en comparación con los demás, al ser inhibido por la mayoría de los extractos, de los cuales el mayor halo de inhibición corresponde al extracto de neem macerado y disuelto con cloroformo (N-C-C) y el menor, al extracto de granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); sólo el extracto acuoso de neem y su infusión no fueron capaces de inhibir a *S. aureus* Clínico 010402072763271.



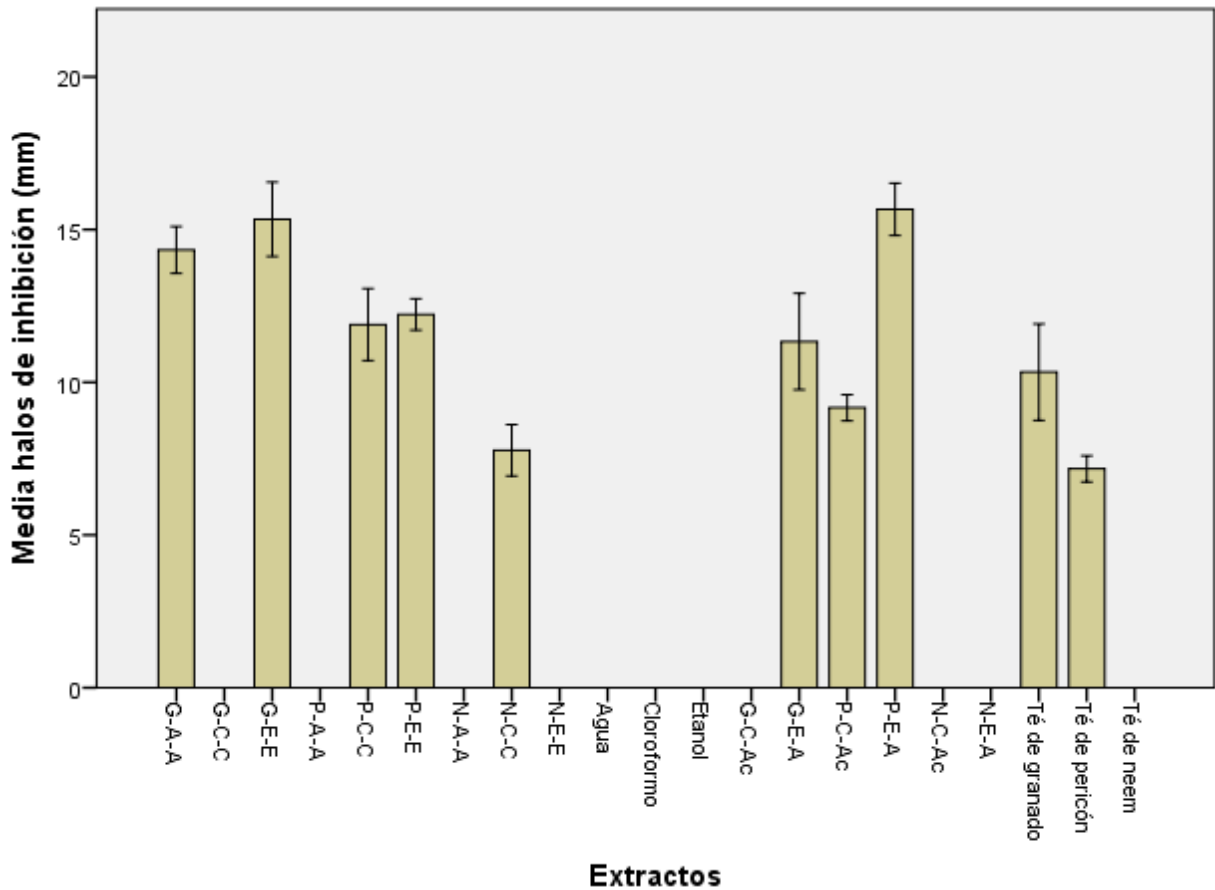
**Figura 13:** Halos de inhibición A) Neem macerado y disuelto con cloroformo (N-C-C), B) Granado macerado y disuelto con cloroformo (G-C-C), C) Pericón macerado en cloroformo y disuelto con acetato de etilo (P-C-Ac), C) Granado macerado y disuelto con agua, en *S. aureus* Clínico 010402072763271.

**Tabla 19:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *S. epidermidis* ATCC 12228

Extracto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	Σ
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
G-A-A	13.33	14.33	15.33	14.33	1.00
G-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-E-E	14.33	17.33	14.33	15.33	1.73
P-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-C-C	13.33	10.00	12.33	11.89	1.71
P-E-E	12.33	12.67	11.67	12.22	0.51
N-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-C-C	7.00	7.33	9.00	7.78	1.07
N-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
G-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
G-E-A	12.67	10.00	-	11.34	1.89
P-C-Ac	9.33	9.00	-	9.17	0.23
P-E-A	15.00	16.33	-	15.67	0.94
N-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
N-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
TG	11.67	9.00	-	10.34	1.89
TP	7.33	7.00	-	7.17	0.23
TN	0.00	0.00	-	0.00	0.00

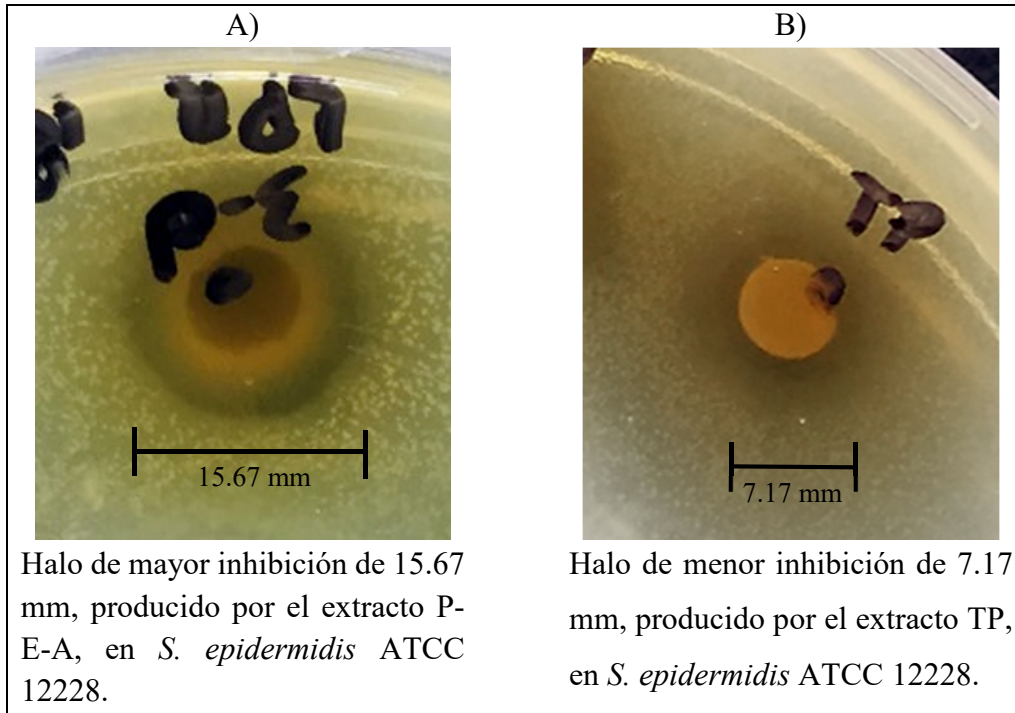
Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

**Gráfica 6:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *S. epidermidis* ATCC 12228

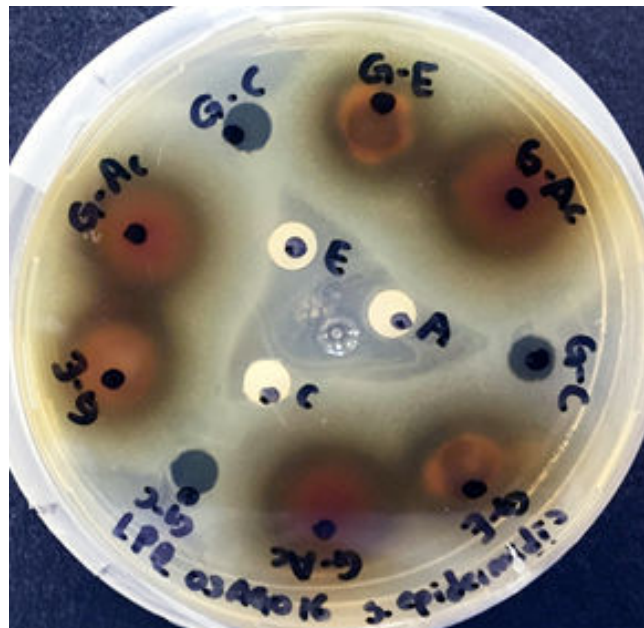


Nota: Barras de error 95% IC.

El *S. epidermidis* ATCC 12228 presentó, de manera similar al *S. aureus* clínico, sensibilidad ante la mayoría de extractos pero en menor medida; su mayor inhibición se obtuvo con el extracto de pericón macerado en etanol y disuelto con agua (P-E-A), mientras que su menor inhibición corresponde a la infusión de pericón. De la gráfica 6 podemos resaltar, que las 2 plantas que más inhiben esta bacteria son granado y pericón, neem sólo lo inhibe un poco cuando es macerado y disuelto en cloroformo.



**Figura 14:** Halos de inhibición A) Pericón macerado en etanol y disuelto con agua destilada, B) Infusión de pericón (TP), en *S. epidermidis* ATCC 12228.



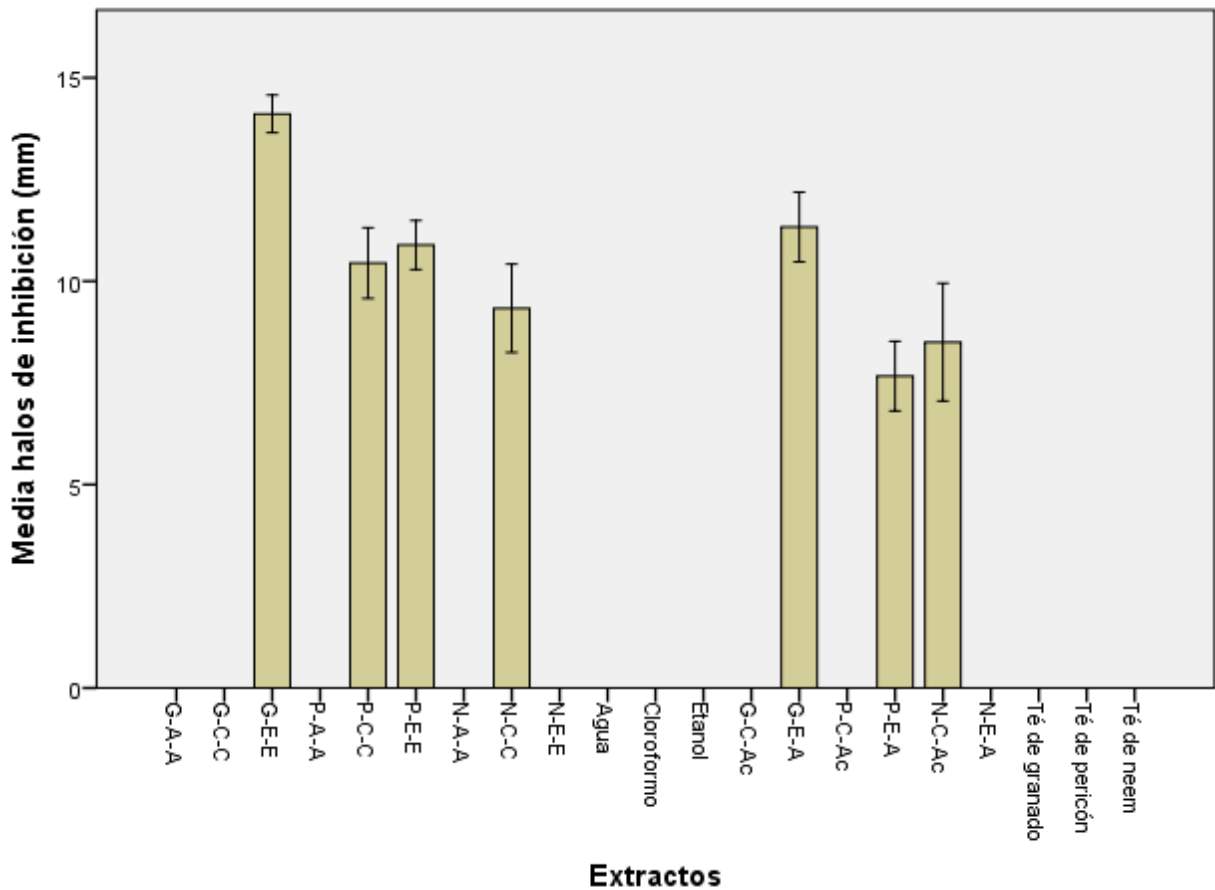
**Figura 15:** Placa de *S. epidermidis* ATCC 12228 con extractos de granado disueltos en diferente solvente de maceración.

**Tabla 20:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *S. epidermidis* Clínico 030400076221211

Extracto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	Σ
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
<b>G-A-A</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>G-C-C</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>G-E-E</b>	13.67	14.33	14.33	14.11	0.38
<b>P-A-A</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>P-C-C</b>	11.67	9.33	10.33	10.44	1.17
<b>P-E-E</b>	11.67	11.00	10.00	10.89	0.84
<b>N-A-A</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>N-C-C</b>	8.67	11.00	8.33	9.33	1.45
<b>N-E-E</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
<b>G-C-Ac</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>G-E-A</b>	12.00	10.67	-	11.34	0.94
<b>P-C-Ac</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>P-E-A</b>	8.33	7.00	-	7.67	0.94
<b>N-C-Ac</b>	7.33	9.67	-	8.50	1.65
<b>N-E-A</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
<b>TG</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>TP</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>TN</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00

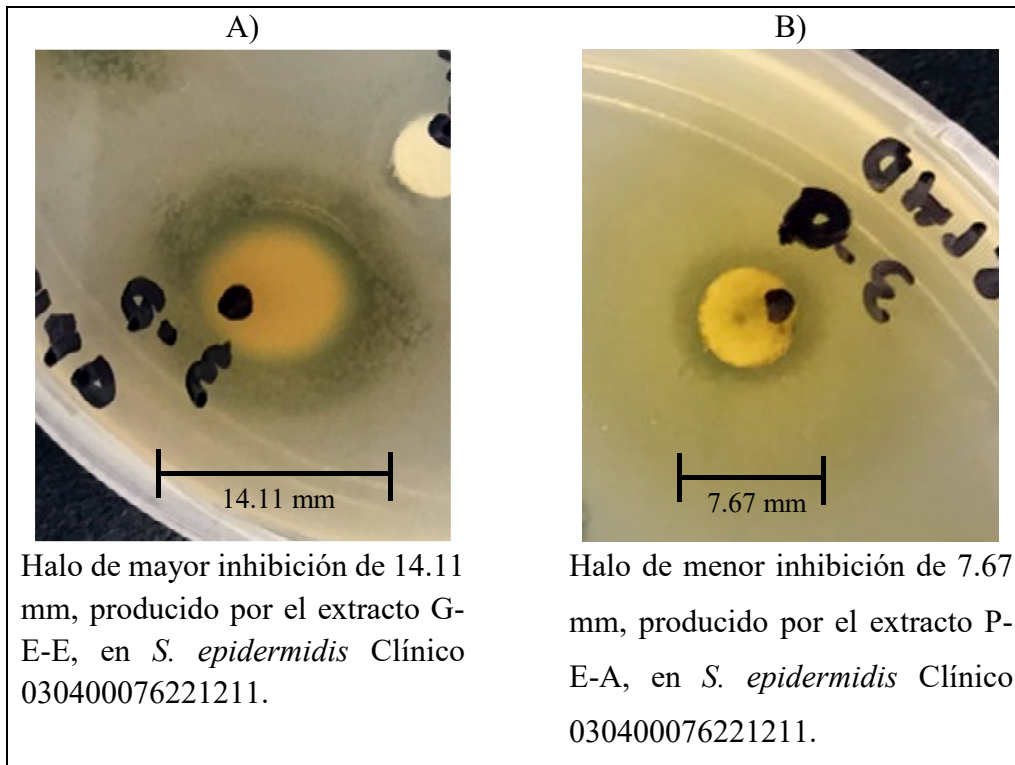
Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

**Gráfica 7:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *S. epidermidis* Clínico 030400076221211

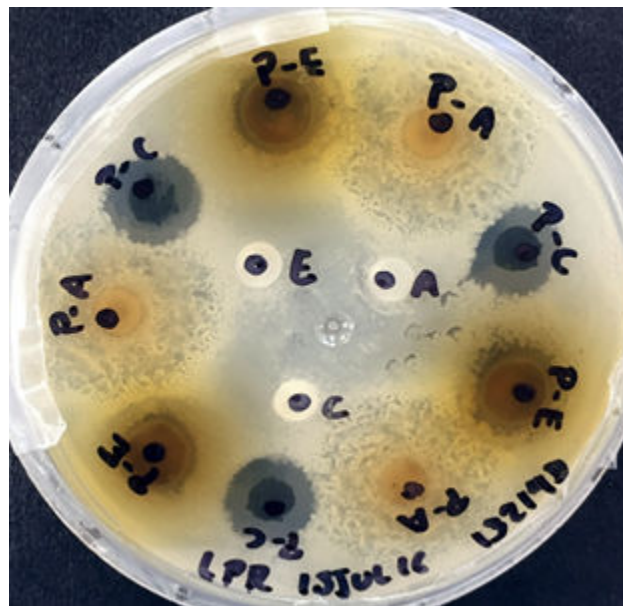


Nota: Barras de error 95% IC.

La gráfica 7 muestra los extractos capaces de inhibir a *S. epidermidis* clínico 030400076221211 y sus respectivos diámetros de inhibición promedio, en ella podemos apreciar que también son el pericón y el granado, las plantas que mejor impiden su crecimiento, siendo el extracto de granado macerado y disuelto en etanol el que mayor inhibición produce, y contrario a la cepa anterior, el extracto de pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A), el de menor. Por otra parte, comparando esta gráfica y la anterior, podemos observar diferencias entre ambos microorganismos, aun siendo de la misma especie; por ejemplo los extractos de granado macerado y disuelto en agua (G-A-A), pericón macerado en cloroformo y disuelto con acetato de etilo (P-C-Ac) y las infusiones de pericón y granado, inhiben sólo a *S. epidermidis* ATCC 12228.



**Figura 16:** Halos de inhibición A) Granado disuelto y macerado con etanol (G-E-E), B) Pericón macerado en etanol y disuelto con agua destilada (P-E-A), en *S. epidermidis* Clínico 030400076221211.



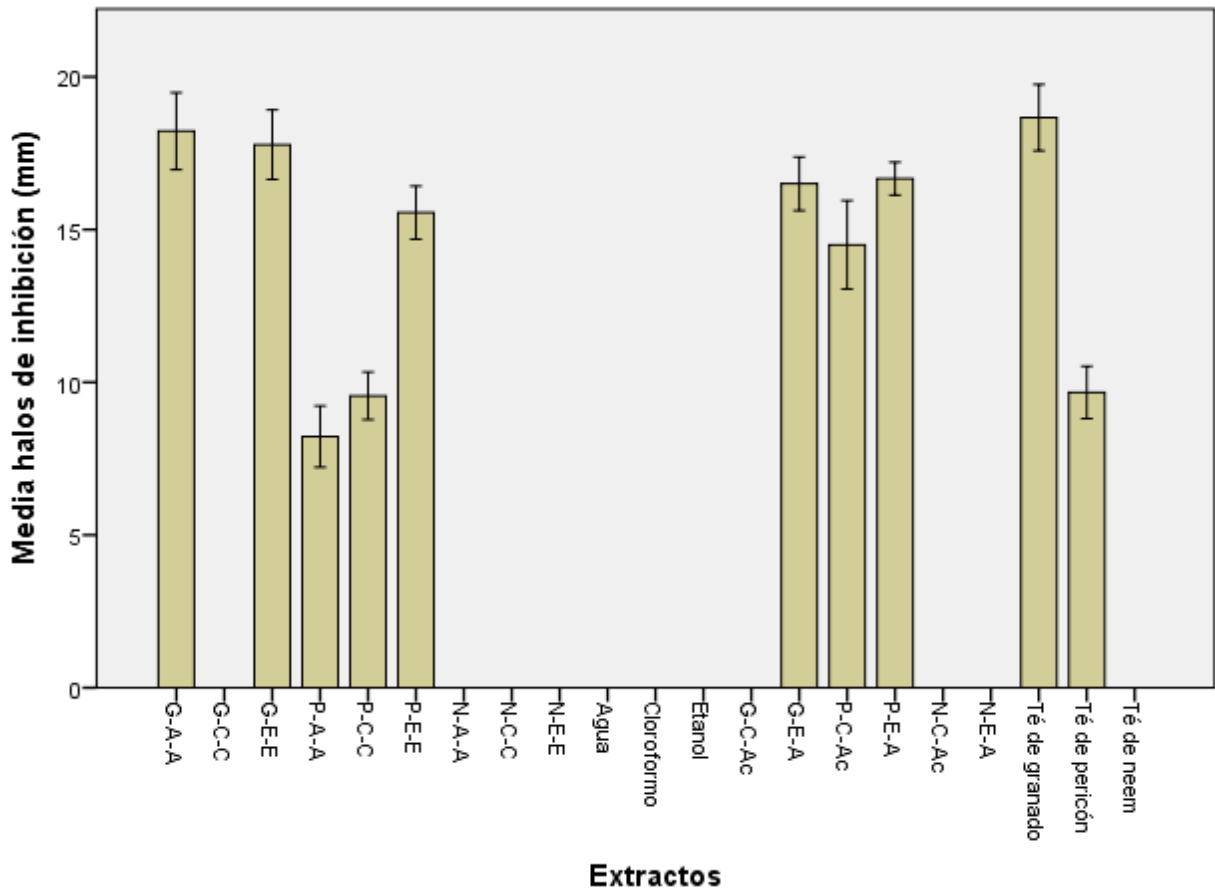
**Figura 17:** Placa de *S. epidermidis* clínico 030400076221211 con extractos de pericón disueltos en su mismo solvente de maceración.

**Tabla 21:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *S. flexneri* ATCC 12022

Extracto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	Σ
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
G-A-A	19.33	16.67	18.67	18.22	1.39
G-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-E-E	16.00	18.00	19.33	17.78	1.68
P-A-A	8.00	9.67	7.00	8.22	1.35
P-C-C	8.33	10.00	10.33	9.55	1.07
P-E-E	14.33	16.67	15.67	15.56	1.17
N-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
G-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
G-E-A	16.67	16.33	-	16.50	0.24
P-C-Ac	13.33	15.67	-	14.50	1.65
P-E-A	17.00	16.33	-	16.67	0.47
N-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
N-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
TG	19.33	18.00	-	18.67	0.94
TP	10.33	9.00	-	9.67	0.94
TN	0.00	0.00	-	0.00	0.00

Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

**Gráfica 8:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *S. flexneri* ATCC 12022



Nota: Barras de error 95% IC.

En el caso de *S. flexneri* ATCC 12022, la inhibición principal estuvo dada por los extractos de granado, seguidos por los extractos de pericón; neem no presentó acción antimicrobiana sobre esta cepa. El halo de inhibición más grande, detectado en esta especie, fue producido por la infusión de granado, cuyo diámetro, muy cercano al del extracto acuoso de la misma planta, permite suponer que no hay diferencias en los compuestos extraídos con y sin temperatura. El efecto antimicrobiano encontrado sobre este microorganismo constituye un resultado favorable, considerando que se trata de una bacteria Gram negativa, cuya estructura le confiere una resistencia innata a diversos activos, por las enzimas hidrolíticas, enzimas inactivadoras de antibióticos y proteínas de transporte presentes en el espacio periplásmico entre su membrana citoplasmática y su pared celular (Radulovic, Blagojevic, Stojanovic-Radic, & Stojanovic, 2013).

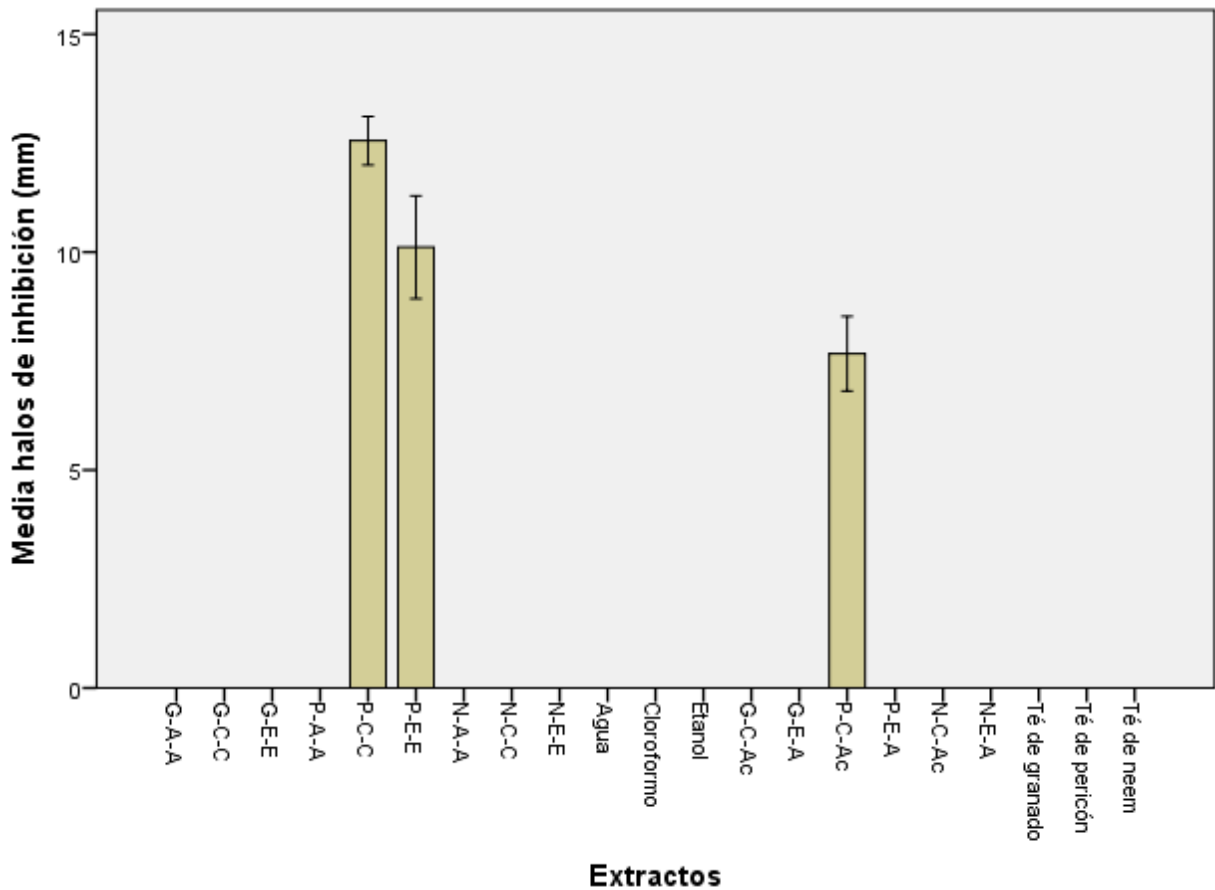


**Tabla 22:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *S. marcescens* Clínico 6425511451056230

Extracto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	Σ
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
G-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-C-C	12.33	13.33	12.00	12.55	0.69
P-E-E	11.67	8.33	10.33	10.11	1.68
N-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
G-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
G-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
P-C-Ac	7.00	8.33	-	7.67	0.94
P-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
N-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
N-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
TG	0.00	0.00	-	0.00	0.00
TP	0.00	0.00	-	0.00	0.00
TN	0.00	0.00	-	0.00	0.00

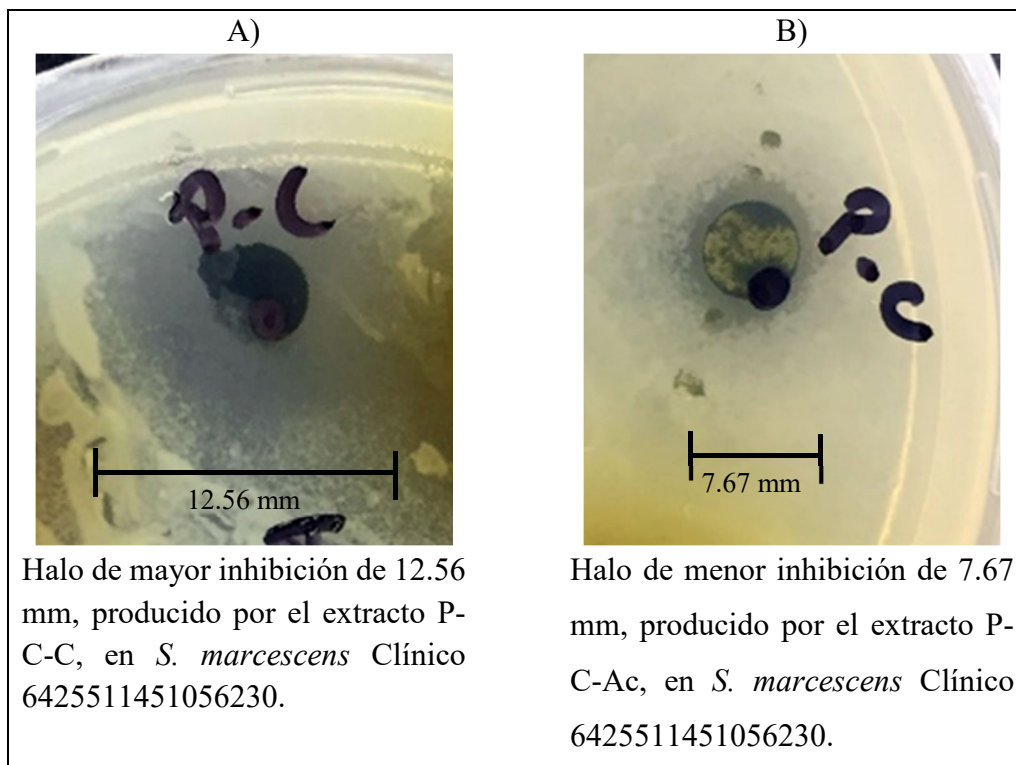
Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

**Gráfica 9:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *S. marcescens* Clínico  
6425511451056230

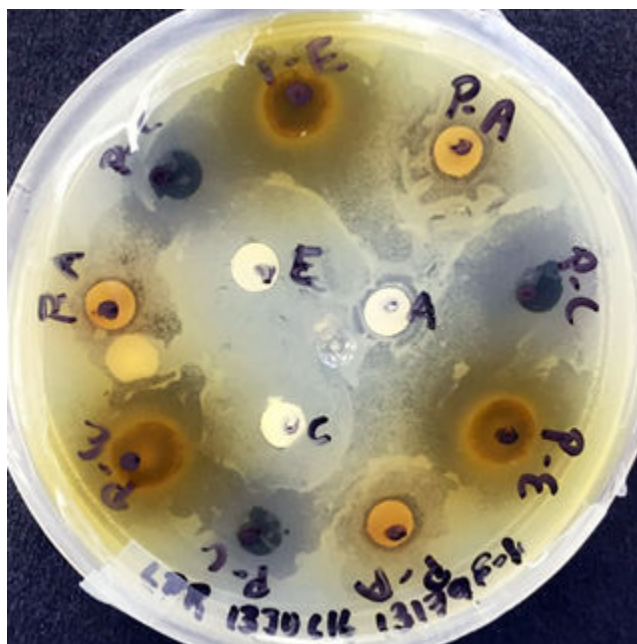


Nota: Barras de error 95% IC.

Este microorganismo es también una bacteria Gram negativa, que además por provenir de un aislamiento clínico y presentar resistencia a determinados antibióticos, constituye un patógeno difícil de inhibir; por lo que al menos la inhibición obtenida es un resultado positivo que puede mejorarse, aislando e identificando el compuesto químico responsable de la acción antimicrobiana de los extractos de pericón, se espera que dichos componentes sean no polares por la base cloroformica con la que se extrajeron. Los extractos de granado y neem, por su parte, no tienen efecto antibacteriano sobre esta cepa.



**Figura 20:** Halos de inhibición A) Pericón macerado y disuelto con cloroformo (P-C-C), B) Pericón macerado en cloroformo y disuelto con acetato de etilo (P-C-Ac), en *S. marcescens* Clínico 6425511451056230.



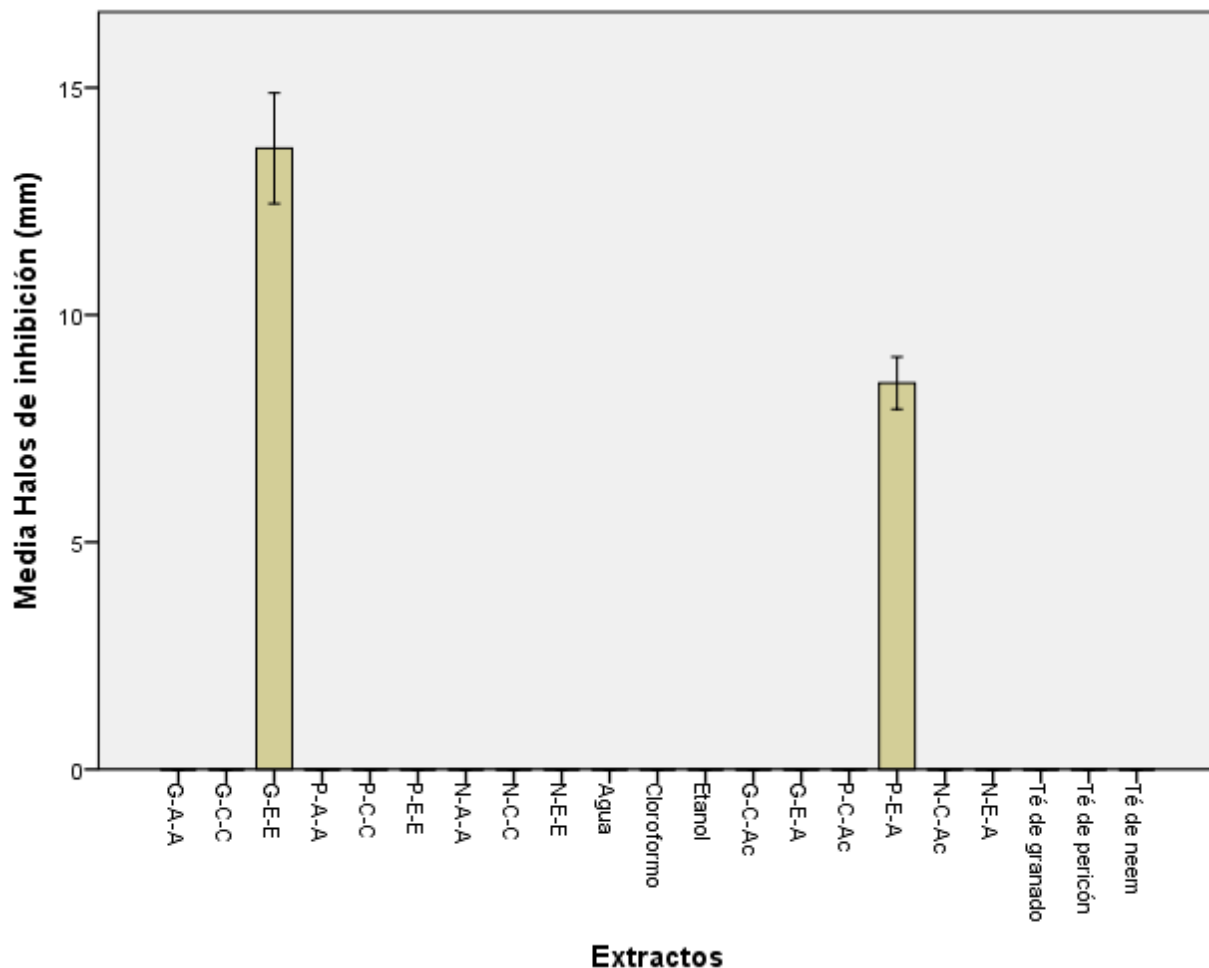
**Figura 21:** Placa de *S. marcescens* clínico 6425511451056230 con extractos de pericón disueltos en su mismo solvente de maceración.

**Tabla 23:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *S. typhimurium* Clínico

Extracto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	Σ
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
G-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-E-E	14.67	11.67	14.67	13.67	1.73
P-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-A-A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-C-C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-E-E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
G-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
G-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
P-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
P-E-A	8.67	8.33	-	8.50	0.24
N-C-Ac	0.00	0.00	-	0.00	0.00
N-E-A	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
TG	0.00	0.00	-	0.00	0.00
TP	0.00	0.00	-	0.00	0.00
TN	0.00	0.00	-	0.00	0.00

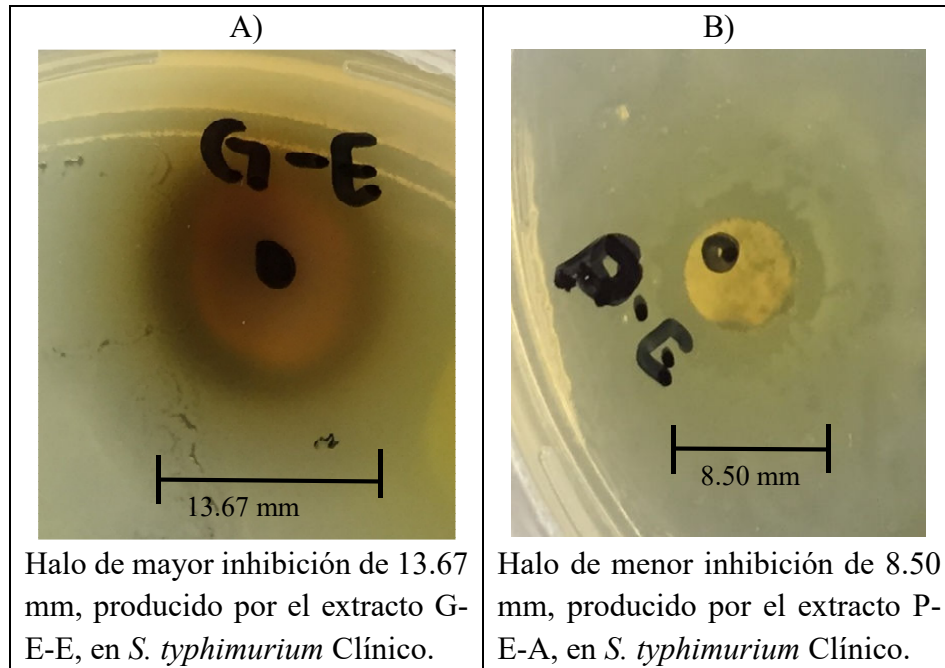
Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

**Gráfica 10:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *S. typhimurium* Clínico

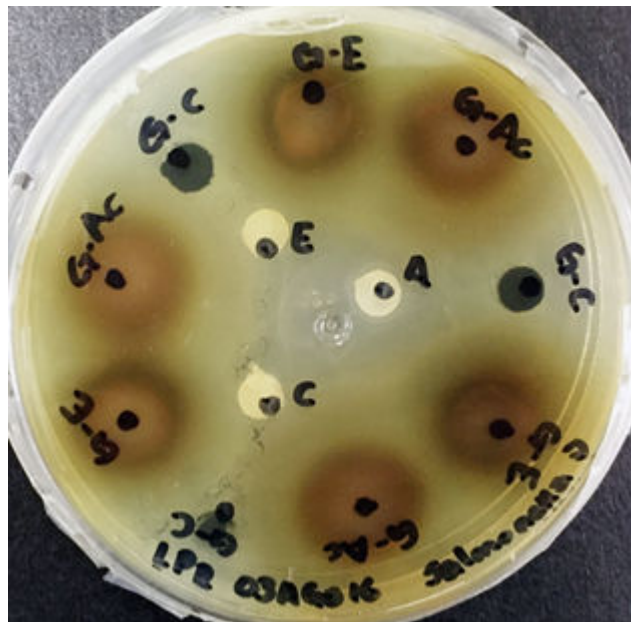


Nota: Barras de error 95% IC.

Como se muestra en la gráfica 10, sólo 2 extractos fueron capaces de inhibir este microorganismo, uno de granado y otro de pericón, pero ambos macerados con etanol, de modo que sus componentes deben ser medianamente polares; sin embargo los halos obtenidos no son muy claros.



**Figura 22:** Halos de inhibición A) Granado macerado y disuelto con etanol, (G-E-E), B) pericón macerado con etanol y disuelto en agua destilada (P-E-A), en *S. typhimurium* Clínico.



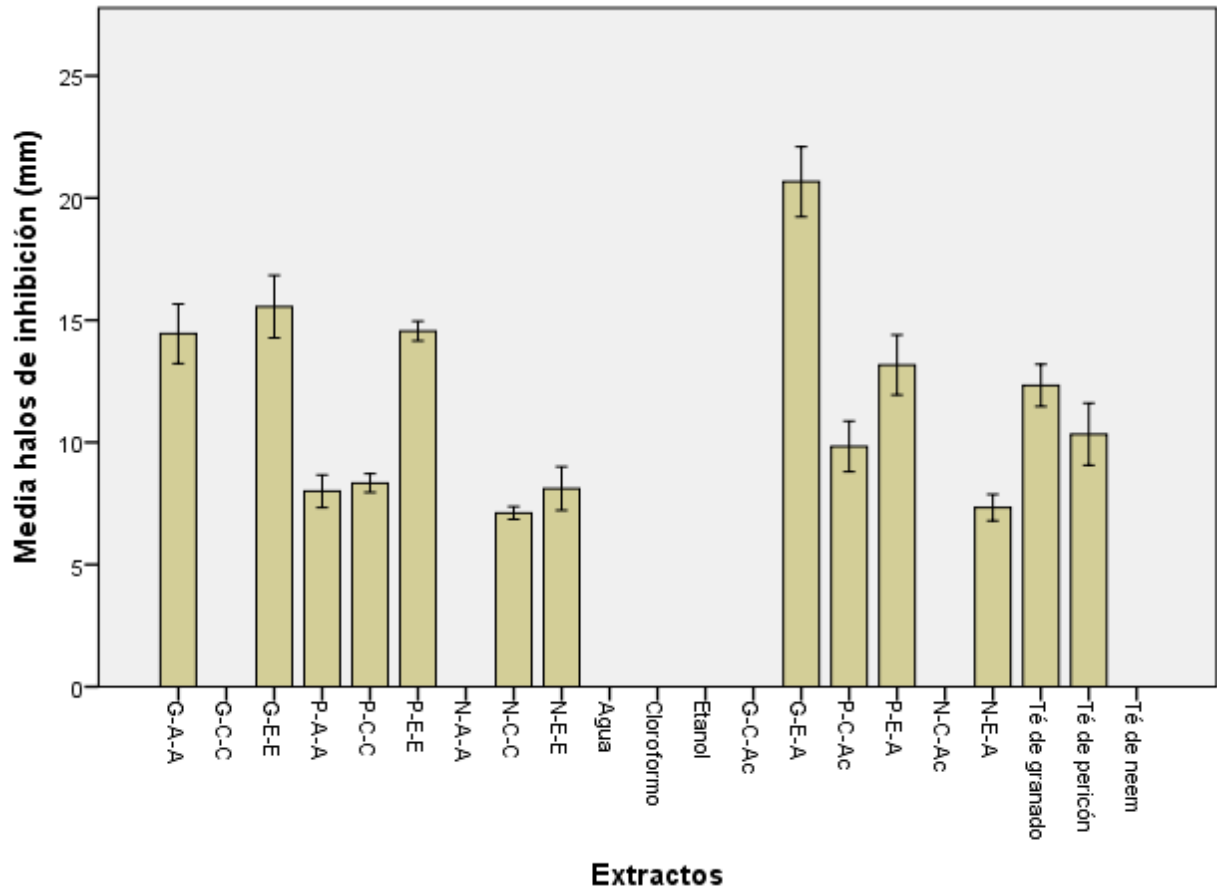
**Figura 23:** Placa de *S. typhimurium* clínico con extractos de granado disueltos en su mismo solvente de maceración.

**Tabla 24:** Halos de inhibición promedio obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre *V. parahaemolyticus* ATCC 17802

Extracto	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	X	$\Sigma$
<b>Extractos con el mismo solvente</b>					
<b>G-A-A</b>	14.67	16.00	12.67	14.45	1.68
<b>G-C-C</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>G-E-E</b>	14.33	17.67	14.67	15.56	1.84
<b>P-A-A</b>	7.00	9.00	8.00	8.00	1.00
<b>P-C-C</b>	8.00	8.00	9.00	8.33	0.58
<b>P-E-E</b>	15.00	14.67	14.00	14.56	0.51
<b>N-A-A</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>N-C-C</b>	7.00	7.33	7.00	7.11	0.19
<b>N-E-E</b>	9.00	7.00	8.33	8.11	1.02
<b>Extractos con diferente solvente</b>					
<b>G-C-Ac</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>G-E-A</b>	19.67	21.67	-	20.67	1.41
<b>P-C-Ac</b>	10.67	9.00	-	9.84	1.18
<b>P-E-A</b>	14.00	12.33	-	13.17	1.18
<b>N-C-Ac</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00
<b>N-E-A</b>	7.00	7.67	-	7.34	0.47
<b>Extractos con aplicación de calor</b>					
<b>TG</b>	13.00	11.67	-	12.34	0.94
<b>TP</b>	11.33	9.33	-	10.33	1.41
<b>TN</b>	0.00	0.00	-	0.00	0.00

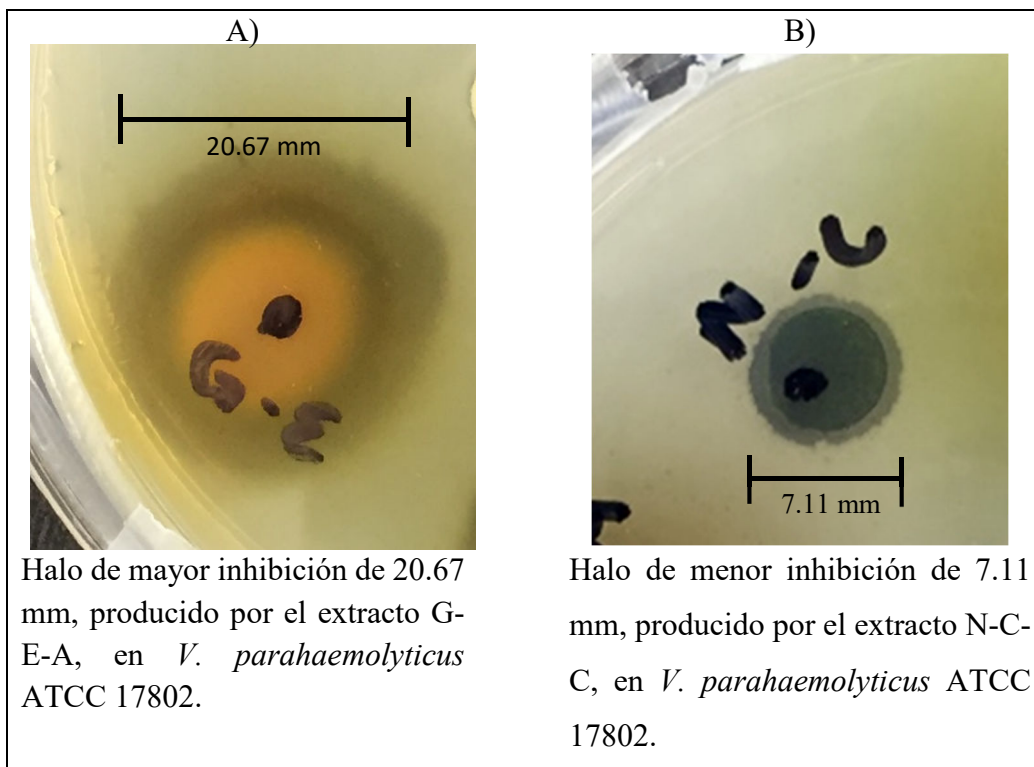
Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

**Gráfica 11:** Halos de inhibición promedio de los extractos, en *V. parahaemolyticus* ATCC 17802

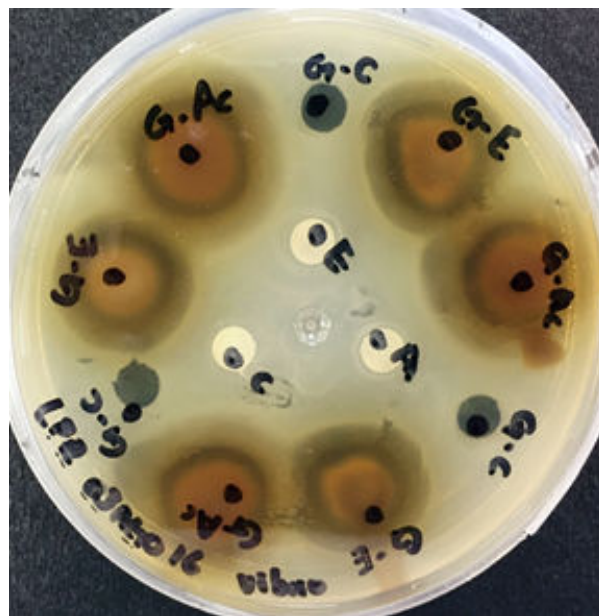


Nota: Barras de error 95% IC.

*V. parahaemolyticus* ATCC 17802 fue otro microorganismo que mostró sensibilidad a la mayoría de los extractos preparados, incluyendo los de neem, pero en menor medida. El extracto que generó el halo de inhibición de mayor tamaño fue el de granado macerado en etanol y disuelto con agua destilada (G-E-A) y el de menor tamaño lo produjo el extracto de neem macerado y disuelto en cloroforno (N-C-C), apenas un poco mayor al diámetro de los discos de papel filtro.



**Figura 24:** Halos de inhibición A) Granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A), B) Neem macerado y disuelto con cloroformo (N-C-C), en *V. parahaemolyticus* ATCC 17802.



**Figura 25:** Placa de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 con extractos de granado disueltos en su mismo solvente de maceración.

A continuación, se muestra en la tabla 25, la comparación de medias de los diámetros de inhibición por microorganismo, de la que podemos concluir que la bacteria más inhibida fue *S. aureus* clínico 010402072763271, seguido de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *S. flexneri* ATCC 12022, los cuales se consideran estadísticamente iguales; mientras que, *K. pneumoniae* clínico 6605734673564210, *S. aureus* ATCC 25923 y *S. typhimurium* ATCC 14028 fueron los microorganismos menos inhibidos, *E. aerogenes* ATCC 13048 y *S. marcescens* ATCC 13880 los que no fueron inhibidos por ningún extracto.

**Tabla 25:** Comparación global de medias de Tukey de los microorganismos

Microorganismos	N	Subconjunto								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>E. aerogenes</i> ATCC	57	.0000								
<i>S. marcescens</i> ATCC	57	.0000								
<i>K. pneumoniae</i> Clínico	57	.2456	.2456							
<i>S. aureus</i> ATCC	57	.2456	.2456							
<i>S. typhimurium</i> ATCC	57	.2456	.2456							
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	57		.4035							
<i>S. typhimurium</i> Clínico	57			1.0175						
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	57				1.3977					
<i>S. marcescens</i> Clínico	57				1.4620					
<i>E. coli</i> ATCC	57				1.6667					
<i>E. coli</i> Clínico	57					2.1228				
<i>S. epidermidis</i> Clínico	57						3.3216			
<i>S. epidermidis</i> ATCC	57							5.1228		
<i>S. flexneri</i> ATCC	57								6.3158	
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC	57								6.5906	
<i>S. aureus</i> Clínico	57									9.0585
Sig.		.541	.976	1.000	.373	1.000	1.000	1.000	.335	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .296.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 57.000

b. Alfa = .05.

**Tabla 26:** Comparación global de medias de Tukey de los diferentes extractos

Extractos	N	Subconjunto									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N-A-A	48	.0000									
Agua	48	.0000									
Cloroformo	48	.0000									
Etanol	48	.0000									
Acetato	48	.0000									
Té de neem	32	.0000									
G-C-C	48		.4722								
G-C-Ac	32		.4896								
N-E-A	32			1.1250							
N-C-Ac	32			1.2708	1.2708						
N-E-E	48			1.2778	1.2778						
P-A-A	48				1.7014						
N-C-C	48					2.6111					
Té de granado	32						3.9583				
G-A-A	48						3.9722				
Té de pericón	32						4.1354				
P-C-C	48							5.0903			
G-E-A	32							5.3542			
G-E-E	48								5.8194		
P-E-E	48								6.0347	6.0347	
P-E-A	32									6.4479	6.4479
P-C-Ac	32										6.6042
Sig.		1.000	1.000	1.000	.064	1.000	.998	.856	.979	.098	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .296.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 39.849

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = .05.

La tabla 26 contiene los resultados de la comparación de medias de cada uno de los extractos, con los cuales podemos determinar que los extractos que mejor acción antimicrobiana presentaron fueron los de pericón macerado en cloroformo y disuelto con acetato de etilo (P-

C-Ac) y de pericón macerado en etanol y disuelto con agua destilada (P-E-A), considerados iguales desde el punto de vista estadístico. Los extractos de granado macerado y disuelto con cloroformo, y de granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo fueron los que menor inhibición produjeron, en tanto que el extracto de neem macerado y disuelto con agua destilada y su correspondiente infusión no generaron inhibición alguna.

A continuación se presenta, en la tabla 27, un resumen de las inhibiciones obtenidas, de manera general, por cada uno de los extractos preparados sobre los 11 microorganismos que mostraron sensibilidad. Como podemos apreciar, los resultados coinciden con los estudios de Gajanan (2012), quienes reporta inhibición de *S. aureus* por parte de *A. indica*, y la investigación de Raut, Sawant y Jamge (2014), donde la misma planta fue capaz de inhibir a *V. parahaemolyticus*; pero difieren de los estudios realizados por Susmitha y colaboradores (2013), quienes publican inhibición de *E. coli* y *Salmonella* sp con extractos de neem, sin embargo no mencionan la concentración a la que fueron preparados, o el de Tirumalasetty y Basavaraju (2014), en el cual *A. indica* parece inhibir a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, debido posiblemente a que ellos colocan mayor cantidad de extracto sobre los discos.

Respecto a la inhibición producida por *P. granatum*, es difícil hacer una comparación con investigaciones previas, ya que éstas utilizan el fruto, la raíz o la corteza y no las hojas para la preparación de los extractos, aun así coinciden en la inhibición, encontrada por Khan y Haneer (2011), de *S. aureus* y *P. aeruginosa* pero difieren en *E. coli*, así como con el trabajo de Janani y Estherlydia (2013) en cuanto a la inhibición de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

Finalmente, en lo que se refiere a *T. lucida*, la mayoría de pruebas de sensibilidad microbiana realizadas hasta el momento con esta planta se enfocan más a evaluaciones con hongos, como la realizada por Barajas y colaboradores (2011); sin embargo, algunos otros muestran actividad antimicrobiana en *E. coli*, como la realizada por Regalado y colaboradores (2011), resultados que coinciden con los del presente trabajo.

**Tabla 27:** Resumen de resultados de inhibición por microorganismo y extracto

M.o.\ Extracto	G-A-A	G-C-C	G-E-E	G-C-Ac	G-E-A	TG	P-A-A	P-C-C	P-E-E	P-C-Ac	P-E-A	TP	N-A-A	N-C-C	N-E-E	N-C-Ac	N-E-A	TN
<i>E. coli</i> ATCC 25922																		
<i>E. coli</i> Clínico 0405610450026611																		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883																		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853																		
<i>S. aureus</i> Clínico 010402072763271																		
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228																		
<i>S. epidermidis</i> Clínico 030400076221211																		
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022																		
<i>S. marcescens</i> Clínico 6425511451056230																		
<i>S. typhimurium</i> Clínico																		
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802																		

Nota: □ Diámetros de inhibición menores a 10 mm, ■ Diámetros de inhibición mayores a 10 mm.

Nota: Granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E); neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); granado macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); granado macerado con etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac); pericón macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A); neem macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); neem macerado con etanol y disuelto en agua (N-E-A); infusión de granado (TG); infusión de pericón (TP); infusión de neem (TN).

## IX. CONCLUSIONES

Los extractos clorofórmicos y etanólicos, disueltos en diferente solvente, de *T. lucida*, específicamente P-C-Ac y P-E-A, fueron los que más inhibición presentaron contra los microorganismos evaluados, entre los cuales se encuentran *E. coli* clínico 0405610450026611, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *S. aureus* clínico 010402072763271, *S. epidermidis* ATCC 12228 y clínico 030400076221211, *S. flexneri* ATCC 12022, *S. marcescens* clínico 6425511451056230 y *V. parahaemolyticus* ATCC 17802.

El microorganismo que mostró mayor sensibilidad frente a los extractos probados fue *S. aureus* clínico 010402072763271; mientras que *E. aerogenes* ATCC 13048 junto con *S. marcescens* ATCC 13880 fueron los de mayor resistencia, al no ser inhibidos por ningún extracto.

Los extractos de *P. granatum*, principalmente etanólicos, también presentaron inhibición en varias bacterias probadas, entre ellas *S. aureus* clínico 010402072763271, *S. epidermidis* ATCC 12228 y clínico, *S. flexneri* ATCC 12022 y *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Los extractos de *A. indica* presentaron escasa inhibición en unos cuantos microorganismos, de los que *S. aureus* clínico 010402072763271 fue la única cepa en la cual produjeron halos de tamaño significativo. El extracto acuoso y la infusión de neem no produjeron inhibición en ningún microorganismo evaluado.

Las bacterias Gram positivas mostraron mayor sensibilidad a los extractos preparados en comparación con las Gram negativas; posiblemente debido a la resistencia innata de éstas últimas a antimicrobianos, producida por la barrera de permeabilidad que forma su membrana externa, la cual reduce el acceso de antibióticos a las dianas intracelulares, así como por su contenido de bombas de eflujo. Sólo la especie *V. parahaemolyticus* presentó una sensibilidad significativa a los extractos, probablemente porque esta cepa no contiene cápsula ni espora.

## **X. PERSPECTIVAS**

- Se sugiere conocer los periodos de temporada de las plantas, antes de iniciar el estudio y realizar la colecta, para su posterior almacenamiento.
- Se recomienda también aislar, purificar e identificar los componentes presentes en estas u otras plantas de estudio, una vez obtenidos sus extractos; mediante pruebas fitoquímicas y técnicas instrumentales como cromatografía, con la finalidad de determinar el compuesto(s) activo.
- Se aconseja, además, no limitar la investigación al análisis exclusivo de los componentes mayoritarios de los extractos.
- Es conveniente evaluar los extractos sobre otras especies de bacterias, así como hongos y levaduras.
- Se exhorta llevar a cabo pruebas adicionales a los extractos seleccionados por su acción antibacteriana, como evaluación de toxicidad, caracterización de los mismos y determinación de sus concentraciones mínima inhibitorias (MIC).

## XI. REFERENCIAS

- Agostini-Costa, T. d., Vieira, R. F., Bizzo, H. S., & Gimenes, M. A. (2012). *Secondary metabolites*. (D. S. Dhanarasu, Ed.) Brasil: InTech. Obtenido de <http://www.intechopen.com/books/chromatography-and-itsapplications/secondary-metabolites>
- Aponte, M., Calderón, M., Delgado, A., Herrera, I., Jiménez, Y., Ramírez, Z., . . . Toro, Y. (2008). *Fitoquímicos*. Recuperado el 6 de Enero de 2006, de Dirección de Investigaciones Nutricionales: <http://www.inn.gob.ve/pdf/docinves/fitoquimicores.pdf>
- Bakht, N., Humaira, F., Madiha, A., & Ihsan, U. (2015). Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. *Austin Journal of Microbiology*.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical analysis*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barajas, J. S., Montes-Belmont, R., Catrejón, F., Flores-Moctezuma, H. E., & Serrato, M. Á. (2011). Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista Mexicana de micología*, 34, 85-91.
- Bauer, B. (Enero de 2012). *Historical review of medicinal plants' usage*. Recuperado el 29 de Enero de 2016, de National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3358962/>
- Castañeda, J., & Ordoñez, J. (2014). La supervivencia de los gérmenes intrahospitalarios en superficies inanimadas. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 394-396.
- Cavalieri, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., . . . Spiegel, C. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad microbiana*. Seattle, Washington: American Society for Microbiology.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Proteínas de membrana externa de *Serratia marcescens*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(4), 224-228.
- Céspedes, C., Avila, J., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J., & Salgado-Garciglia, R. (2006). Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3521-3527.
- CONABIO. (2009). Catálogo taxonómico de especies de México. Ciudad de México, México.

- CONABIO. (2013). *Neem (Azadirachta indica)*. Obtenido de Natura Lista: <http://conabio.inaturalist.org/taxa/319135-Azadirachta-indica>
- CONAFOR. (s.f.). *Azadirachta indica (Juss)*. Obtenido de Comisión Nacional Forestal: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/889Azadirachta%20indica.pdf>
- Dahham, S., Ali, M., Tabassum, H., & Khan, M. (2010). Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 9(3), 273-281.
- Davin-Regli, A., & Pagés, J.-M. (2015). Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00392
- Dhamodhar, P. S. (2012). A study on few medicinal plant extracts against drug resistant *Streptococcus pyogenes* isolated from padiatric cases. *Jorunal of Biochemical Technology*.
- EcuRed. (2012). *Granada (Punica granatum)*. Obtenido de Enciclopedia Cubana en la Red: [http://www.ecured.cu/index.php/Granada\\_\(Punica\\_granatum\)](http://www.ecured.cu/index.php/Granada_(Punica_granatum))
- Enfoque. (27 de Octubre de 2011). *Presenta Jiménez Merino el libro "Herbolaria Mexicana" en San Lázaro*. Recuperado el 18 de Enero de 2016, de Periódico Enfoque: <http://www.periodicoenfoque.com.mx/2011/10/presenta-jimenez-merino-el-libro-%E2%80%9Cherbolaria-mexicana%E2%80%9D-en-san-lazaro/>
- Foundation, N. (2014). *Introduction to Neem Tree*. Obtenido de Neem Foundation: <http://www.neemfoundation.org/about-neem/introduction-to-neem-tree/>
- Gajanan, M. (2012). Antibacterial Activity Of *Azadirachta indica* A. Juss. Leaves Extracts Against Skin Pathogens. *International Journal of Recent Trends in Sciences and Technology*, 2(3), 33-35.
- Gómez, M., Calvo, A., & Prieto, J. (2009). Antibióticos y quimioterápicos. Generalidades. En B. Velázquez, P. Lorenzo, A. Moreno, I. Lizasoain, J. Leza, M. Moro, & A. Portolés, *Farmacología Básica y Clínica* (págs. 791-794). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Hamuel, J. (2012). *Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents*. Recuperado el 08 de Septiembre de 2015, de InTech: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/phytochemicals-extraction-methods-basic-structures-and-mode-of-action-as-potentialchemotherapeutic>

- Hashmat, I., Hussain, A., & Ahmed, A. (2012). Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) - A Nature's Drugstore: An overview. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(6), 76-79.
- Hossain, M., Al-Toubi, W., Weli, A., Al-Riyami, Q., & Al-Sabahi, J. (2013). Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem. *Journal of Taibah University for Science*, 181-188.
- Irchhaiya, R., Kumar, A., Yadav, A., Gupta, N., Kumar, S., Gupta, N., . . . Gurjar, H. (2014). Metabolites in Plants and its Classification. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 287-305.
- Islam, F., Rahman, S., Akter, R., Bakar, M., Abdullah, A., & Ahmed, N. (2012). Antidiabetic and Antioxidant Effect with Phitochemical Screening of Ethanol Extract of *Saurauia Roxburghii*. *Pharma Science Monitor*, 2601-2612.
- Janani, J., & Estherlydia, D. (2013). Antimicrobial activities of *Punica granatum* extracts against oral microorganisms. *International Journal of Pharmaceutical Technology*, 5(3), 973-977.
- Khan, J., & Hanee, S. (2011). Antibacterial properties of *Punica granatum* peels. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2(3), 23-27.
- Koona, S., & Budida, S. (2011). Antimicrobial potential of the extracts of the leave of *Azadirachta indica* Linn. *Natural Sciences and Biology*, 3(1), 65-69.
- Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (16 de Agosto de 2006). *How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review*. Recuperado el 08 de Septiembre de 2015, de BioMed Central: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/130>
- Letchumanan, V., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in Microbiology*(5).
- Lim, T. (2014). *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*. New York London: Springer.
- Maimone, S., & Castilla, A. (2013). *Desinfectantes de uso hospitalario*. Obtenido de Grupo Asesor de Control de Infecciones y Epidemiología (CODEINEP): [http://www.codeinep.org/control/Infeccion\\_hospitalaria\\_Icap5.pdf](http://www.codeinep.org/control/Infeccion_hospitalaria_Icap5.pdf)
- Martínez, M. L., Bettucci, G., Gatusso, M., & Cortadi, A. (2013). Carácteres micrográficos analíticos de hojas, tallos, inflorescencias-flores de *Tagetes lucida* Cav. (Asteraceae-Helenieae). *Dominguezia*, 29-37.

- Méndez, L., Zañudo, J., Castruita, J., Meza, K., & Gómez, J. (6 de Julio de 2014). *Importancia del estudio del metabolismo secundario en plantas*. Obtenido de <http://sb11ceab1a24314f4.jimcontent.com/download/version/1406218313/module/9025792370/name/IMPORTANCIA%20DEL%20ESTUDIO%20DEL%20METABOLISMO%20SECUNDARIO%20EN%20PLANTAS%206%20de%20julio%202014.pdf>
- Miguel, M. G., Neves, M. A., & Antunes, M. D. (2010). Pomegranate (*Punica granatum L.*): A medicinal plant with myriad biological properties - A short review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2836-2847.
- Murray, P. (2013). *Microbiología médica* (Séptima ed.). Elsevier.
- OMS. (2003). Prevención de las infecciones nosocomiales. *Oroganización Mundial de la Salud*.
- OMS. (2008). Hojas de información microbiológica. En O. M. Salud, *Guías para la calidad del agua potable* (págs. 191-208). Suiza. Obtenido de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_11.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_11.pdf)
- OMS. (2016). *World Health Statistics*. Obtenido de World Health Organization: [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2016/en/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/en/)
- OPS. (2007). *Guía para la prevención y el control de las infecciones en servicios de salud dirigida a estudiantes de las carreras de ciencias de la salud*. La Paz Bolivia: Organización Panamericana de la Salud.
- Ortega-Peña, S., & Franco-Cendejas, R. (Julio-Septiembre de 2014). Importancia médica del biofilm de *Staphylococcus epidermidis* en las infecciones de prótesis articular. *Investigación en discapacidad*, 3(3), 106-113.
- Paiva, P. M., Gomes, F. S., Napoleao, R. A., Correia, M. T., & Coelho, L. C. (2010). Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. En A. Mendez-Vilas, *Applied microbiology and microbial biotechnology* (págs. 396-406). Brasil: Formatex.
- Pandey, A., & Kumar, S. (2013). Perspective on Plant Products as Antimicrobials Agents: A Review. *Pharmacologia*, 469-477.
- Pankaj, S., Lokeshwar, T., Mukesh, B., & Vishnu, B. (2011). Review on Neem (*Azadirachta indica*): Thousand Problems One Solution. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(12), 97-102. Recuperado el 24 de Marzo de 2016, de [http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/730\\_pdf.pdf](http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/730_pdf.pdf)

- Perú, M. d. (2004). *Norma técnica de prevención y control de infecciones intrahospitalarias*. Obtenido de Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/iih/normas/4.pdf>
- Prat, S. (2004). *Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar*. Obtenido de Instituto de Salud Pública de Chile: [http://www.ispch.cl/lab\\_sal/doc/manual\\_susceptibilidad.pdf](http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf)
- Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426-3431. Obtenido de [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias\\_Medicine2010.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf)
- Radulovic, N., Blagojevic, P., Stojanovic-Radic, Z., & Stojanovic, N. (2013). Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry*, 20(7), 932-952. doi:10.2174/0929867311320070008
- Radulovic, N., Blagojevic, P., Stojanovic-Radic, Z., & Stojanovic, N. (2013). Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry*, 20(7), 932-952.
- Regalado, E. L., Fernández, M. D., Pino, J. A., Mendiola, J., & Echemendía, O. A. (2011). Chemical composition and biological properties of the leaf essential oil of *Tagetes lucida* Cav. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 1-5.
- Schlaepfer, L., & Mendoza, J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 18-27.
- Silva, N., & Fernandes, J. (2010). Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(3). Recuperado el 05 de Mayo de 2016, de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1678-91992010000300006](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992010000300006)
- Soberón, G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa*. En E. Martínez-Romero, & J. C. Martínez-Romero, *Microbios*. UNAM. Obtenido de Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>
- Susmitha, S., Vidyamol, K., Ranganayaki, P., & Vijayaragavan, R. (2013). Phytochemical Extraction and Antimicrobial Properties of *Azadirachta indica* (Neem). *Global Journal of Pharmacology*, 7(3), 316.313.

- Swami, S., Singh, S., Longo, G., & Dutt, D. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Italia: International Centre for Science and High Technology.
- Tirumalasetty, J., & Basavaraju, A. (2014). Antimicrobial activity of methanolic extracts of *Azadirachta indica*, *Rosmarinus officinalis* and *Lagenaria siceraria* leaves on some important pathogenic organisms. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 766-700.
- UNAM. (10 de Septiembre de 2009). *Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos*. Recuperado el 13 de Enero de 2016, de Revista Digital Universitaria: <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>
- Vibrans, H. (14 de Julio de 2009). *Tagetes lucida Cav. Pericón*. Obtenido de Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-lucida/fichas/ficha.htm>

## XII. ANEXOS

### 12.1 Optimización del extracto obtenido

La estandarización para la obtención de los extractos se llevó a cabo mediante la combinación de diferentes proporciones planta-solvente y distintos tiempos de maceración, los resultados de este proceso se aprecian en las siguientes tablas. Como podemos observar, la cantidad de extracto obtenido permanece constante aún con periodos de maceración prolongados, ya que aunque en algunos casos se perciben ligeros incrementos en las masas, éstos no son lo suficientemente significativos para justificar procesos de extracción tan largos, que a su vez, propiciaban contaminaciones microbiológicas de las mezclas, por lo que se decidió establecer el tiempo de macerado en 5 días, tiempo en que no se detectó crecimiento de microorganismos en las muestras.

**Tabla 28:** Extractos obtenidos con diferentes tiempos de maceración

Tiempo de maceración									
Días	Masa de los extractos secos (g)								
	G-A	G-C	G-E	N-A	N-C	N-E	P-A	P-C	P-E
5	0.1016	0.0244	0.0354	0.1201	0.0298	0.0165	0.0881	0.0223	0.0234
15	0.1066	0.0361	0.0400	0.1251	0.0326	0.0203	0.0889	0.0302	0.0244
30	0.1157	0.0386	0.0406	0.1523	0.0406	0.0396	0.1096	0.0354	0.0315
Proporción	Masa de los extractos secos (g)								
	G-A	G-C	G-E	N-A	N-C	N-E	P-A	P-C	P-E
5	20%	5%	7%	24%	6%	3%	18%	4%	5%
15	23%	7%	8%	25%	7%	4%	18%	6%	5%
30	23%	8%	8%	30%	8%	8%	22%	7%	6%

Nota: Granado en agua (G-A); granado en cloroformo (G-C); granado en etanol (G-E); neem en agua (N-A); neem en cloroformo (N-C); neem en etanol (N-E); pericón en agua (P-A); pericón en cloroformo (P-C); pericón en etanol (P-E).

En cambio, se observa, un incremento en la producción de extracto empleando mayores volúmenes de solvente; sin embargo, el consumo elevado de estos reactivos, implica pérdidas considerables de recursos, por lo que la proporción que se utilizó fue de 1:10, la cual nos permitió tener los componentes necesarios para las pruebas, sin gastar cantidades exageradas de solventes.

**Tabla 29:** Extractos obtenidos con diferentes proporciones Planta: Solvente

<b>Proporción Planta : Solvente</b>									
<b>Proporción</b>	<b>Masa de los extractos secos (g)</b>								
	<b>G-A</b>	<b>G-C</b>	<b>G-E</b>	<b>N-A</b>	<b>N-C</b>	<b>N-E</b>	<b>P-A</b>	<b>P-C</b>	<b>P-E</b>
1:10	0.0668	0.0244	0.0312	0.0425	0.0336	0.0065	0.0362	0.0223	0.0252
1:20	0.1157	0.0263	0.0354	0.1251	0.0326	0.0165	0.1096	0.0297	0.0234
1:50	0.1611	0.2718	0.0675	0.1413	0.3688	0.0282	0.1265	0.2933	0.0838
1:100	0.1866	0.3852	0.1412	0.1756	0.4444	0.0830	0.1442	0.4013	0.1040
<b>Proporción</b>	<b>Porcentaje Extractos secos (g) / Material vegetal (g)</b>								
	<b>G-A</b>	<b>G-C</b>	<b>G-E</b>	<b>N-A</b>	<b>N-C</b>	<b>N-E</b>	<b>P-A</b>	<b>P-C</b>	<b>P-E</b>
1:10	13%	5%	6%	8%	7%	1%	7%	4%	5%
1:20	23%	5%	7%	25%	7%	3%	22%	6%	5%
1:50	32%	54%	13%	28%	74%	6%	25%	58%	17%
1:100	37%	77%	28%	35%	89%	17%	29%	80%	21%

Nota: Granado en agua (G-A); granado en cloroformo (G-C); granado en etanol (G-E); neem en agua (N-A); neem en cloroformo (N-C); neem en etanol (N-E); pericón en agua (P-A); pericón en cloroformo (P-C); pericón en etanol (P-E).

La tabla 30 describe las masas de los extractos obtenidos, con las maceraciones realizadas siguiendo los parámetros establecidos anteriormente, después de haber sido secados por rotavapor, llevadas a cabo por triplicado para evaluar que el método utilizado no repercute en resultados variables durante experimentos posteriores.

**Tabla 30:** Extractos obtenidos por maceración en frío de las plantas

<b>Proporción Planta : Solvente 1:10 (20 g de planta : 200 ml de solvente)</b>			
<b>Extracto</b>	<b>Extracto seco obtenido (g)</b>		
	<b>Réplica1</b>	<b>Réplica2</b>	<b>Réplica3</b>
<b>P-C</b>	1.5509	1.5351	1.6798
<b>P-E</b>	1.8030	1.9551	1.9647
<b>P-A</b>	2.9985	3.0890	2.8982
<b>G-C</b>	1.9756	2.1308	2.1330
<b>G-E</b>	1.4822	1.6094	1.5605
<b>G-A</b>	3.0977	3.2255	3.0948
<b>N-C</b>	1.3042	1.4903	1.3916
<b>N-E</b>	1.0025	0.9135	0.9062
<b>N-A</b>	4.5173	4.7208	4.7477

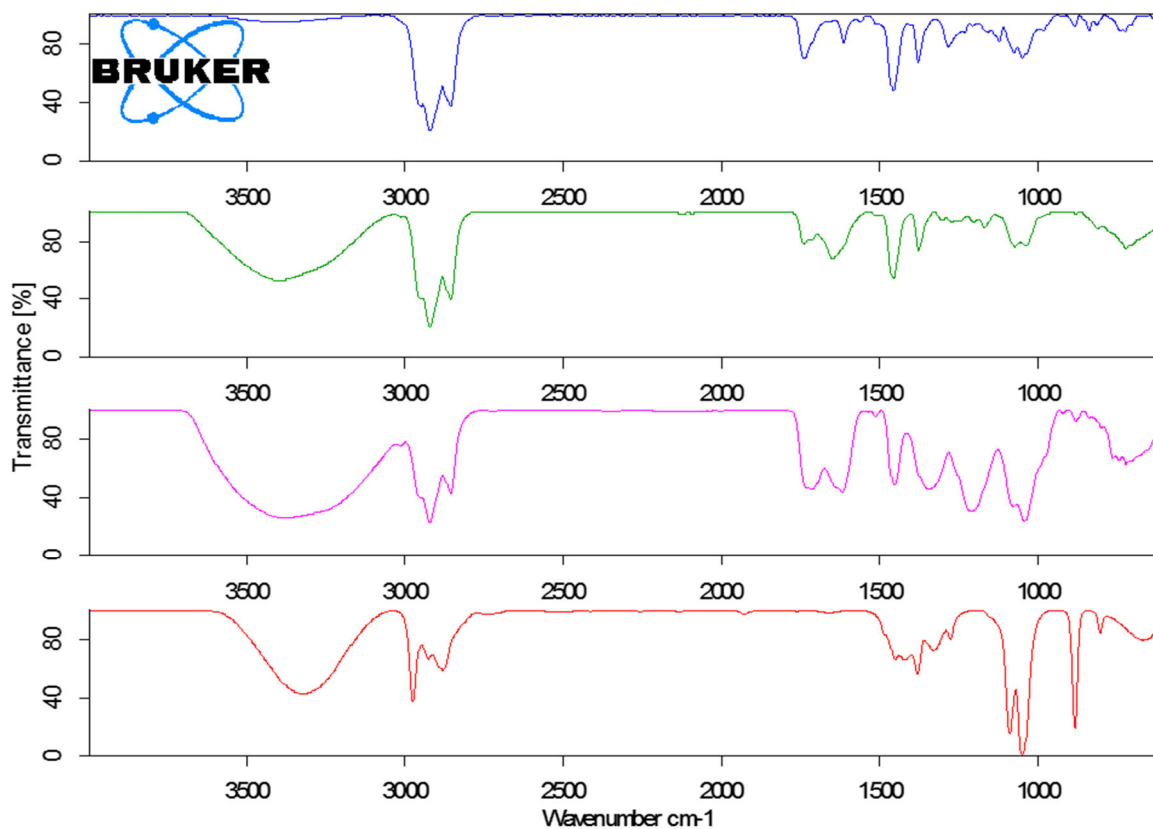
Nota: Masas de compuestos obtenidos mediante maceración en frío de las plantas. Granado en agua (G-A); granado en cloroformo (G-C); granado en etanol (G-E); neem en agua (N-A); neem en cloroformo (N-C); neem en etanol (N-E); pericón en agua (P-A); pericón en cloroformo (P-C); pericón en etanol (P-E).

## 12.2 Extracción de compuestos fitoquímicos

Se llevó a cabo la maceración en frío de cada uno de los extractos preparados, y a pesar que no contamos con un método de identificación preciso, se realizó un ensayo general con espectroscopia infrarroja (FTIR) para visualizar los grupos funcionales que podrían estar presentes en cada extracto.

En la siguiente gráfica 12 se pueden observar diferencias entre los espectros de los extractos y su base, en este caso el etanol con el que fueron preparados; principalmente por la presencia de picos en la región de longitud de onda, aproximada, de 1800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ , zona a la que se asocian estructuras con grupos carbonilo  $\text{C}=\text{O}$  como cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos, etc., que no posee el etanol pero sí los extractos y podrían corresponder a lo reportado en otros estudios.

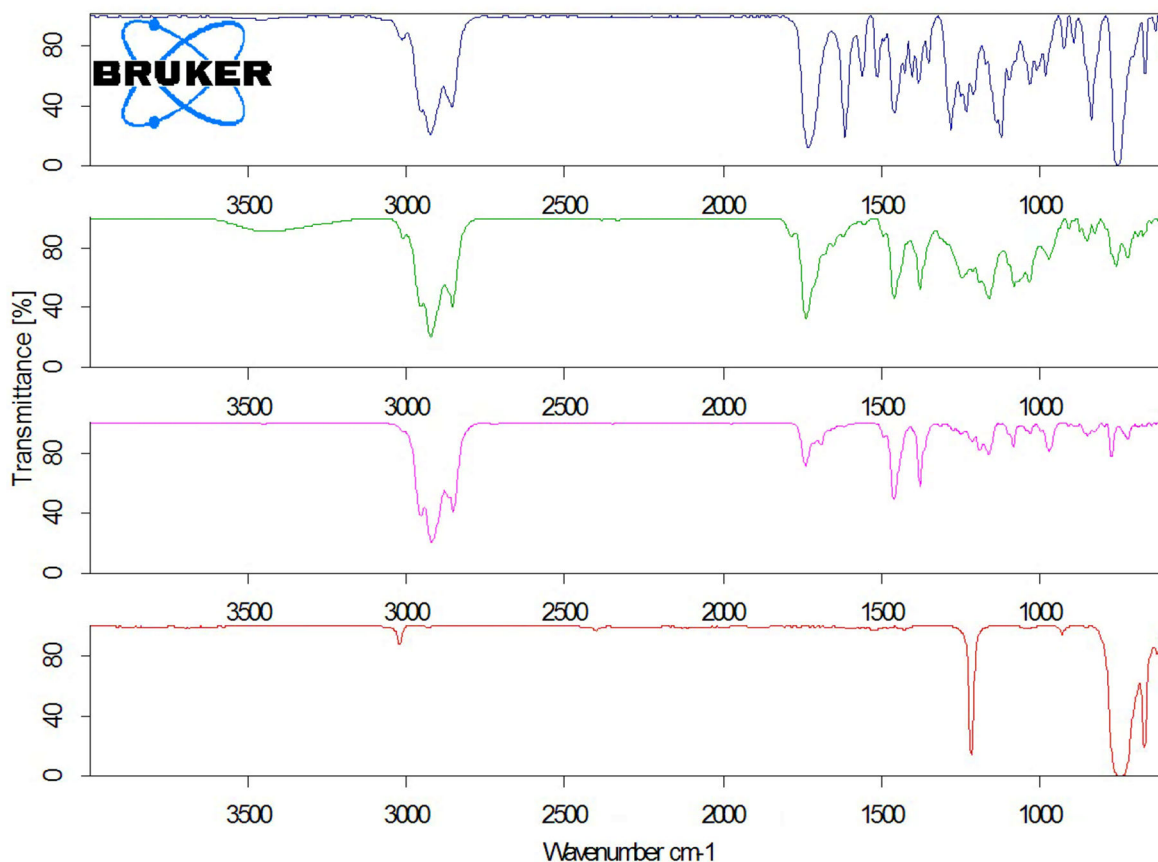
**Gráfica 12.** Comparación de espectros FTIR de los extractos etanólicos y su solvente



Nota: Espectro FTIR del extracto de P-E (azul), espectro FTIR del extracto N-E (verde), espectro FTIR del extracto G-E (rosa) y espectro FTIR de etanol (rojo).

En la gráfica 13 correspondiente a los espectros de los extractos clorofórmicos y su solvente, se observan de manera similar diferencias evidentes entre los espectrogramas de las muestras y el control, es decir, el cloroformo; ya que se pueden apreciar mayor cantidad de picos en los espectros de los extractos, principalmente en el de pericón cloroformo (P-C).

**Gráfica 13:** Comparación de espectros FTIR de los extractos clorofórmicos y su solvente



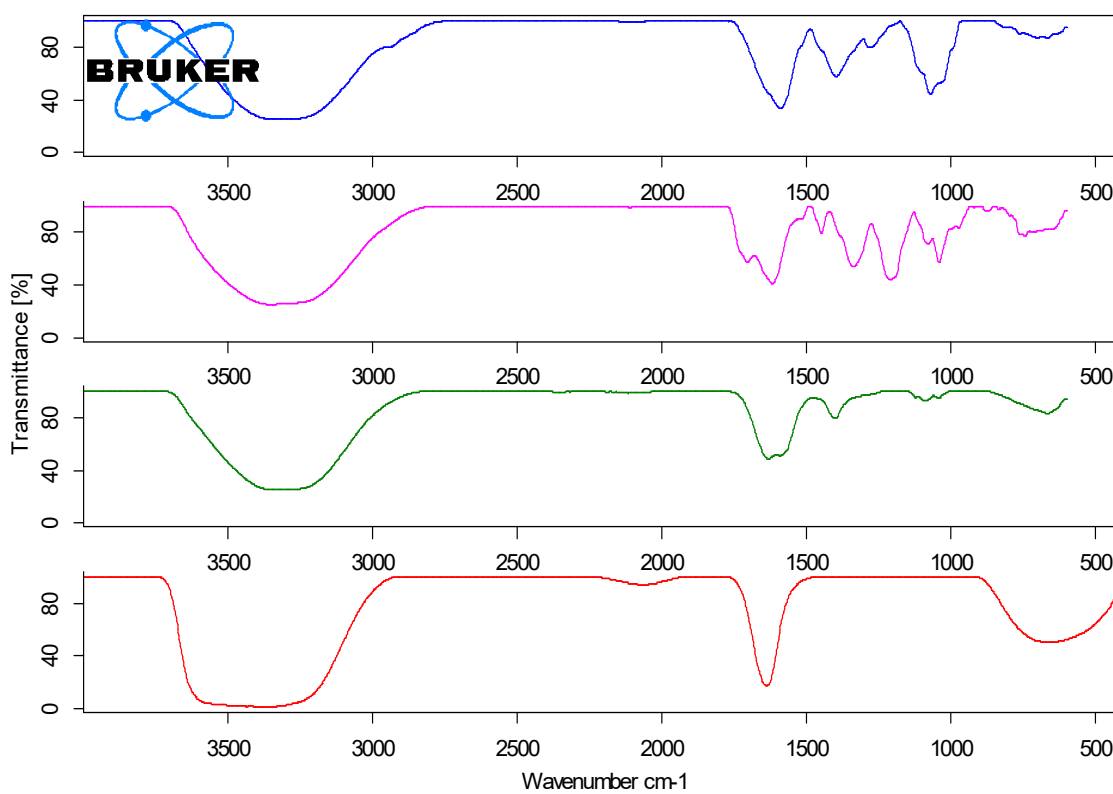
Nota: Espectro FTIR del extracto de P-C (azul), espectro FTIR del extracto N-C (verde), espectro FTIR del extracto G-C (rosa) y espectro FTIR de cloroformo (rojo).

Los espectros de los extractos acuosos y del agua destilada, por su parte, aparecen en la gráfica 14, en la que también podemos distinguir, aunque en menor medida, diferencias de picos, principalmente en la zona conocida como “huella dactilar” de un espectrograma, por ser específica para cada compuesto químico. Podemos notar que el espectro del extracto de neem en agua (N-A), posee apenas unos cuantos picos que no presenta el del agua, lo cual sugiere que se extrajeron pocos compuestos y esto, a su vez, podría ser la razón de la nula

inhibición de este extracto. Cabe resaltar, también, las diferencias entre los gráficos de los extractos etanólicos, clorofórmicos y acuosos.

Con esto verificamos la extracción de compuestos de las plantas, pero no es posible identificarlos; ya que ello requiere de técnicas más exactas como la cromatografía de líquidos, de gases y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

**Gráfica 14:** Comparación de espectros FTIR de los extractos acuosos y su solvente



Nota: Espectro FTIR del extracto de P-A (azul), espectro FTIR del extracto G-A (rosa), espectro FTIR del extracto N-A (verde) y espectro FTIR de agua destilada (rojo).

### 12.3 Análisis estadístico de los extractos con su mismo solvente

En la siguiente tabla se muestran los resultados del análisis de varianza, llevado a cabo con los diámetros promedio producidos por los extractos disueltos en su mismo solvente de maceración, donde los niveles de significancia (Sig.) de los 2 factores (microorganismos y extractos), así como de su intersección (microorganismos\*extractos) son menores a 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis nula, que establece que todos los extractos y controles negativos son iguales:

$$H_0 = GAA = GCC = GEE = PAA = PCC = PEE = NAA = NCC = NEE = A = C = E = Ac$$

Y se acepta la hipótesis alternativa, que establece que al menos 2 extractos son diferentes.

**Tabla 31:** ANOVA de los extractos disueltos con su mismo solvente de maceración

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	14013.460 <sup>a</sup>	207	67.698	276.704	.000
Intersección	2687.540	1	2687.540	10984.880	.000
Extractos	3242.458	12	270.205	1104.418	.000
Microorganismos	4029.147	15	268.610	1097.898	.000
Extractos * Microorganismos	6741.856	180	37.455	153.090	.000
Error	101.778	416	.245		
Total	16802.778	624			
Total corregida	14115.238	623			

a. R cuadrado = .993 (R cuadrado corregida = .989)

Nota: Variable dependiente – Mediciones promedio

Debido a que no es posible determinar con el análisis anterior, a qué extractos corresponde esta diferencia, se procedió a realizar una comparación de medias de Tukey, cuyos resultados aparecen en la tabla siguiente:

**Tabla 32:** Comparación de medias de Tukey de los extractos disueltos con su mismo solvente de maceración

Extractos disueltos en su mismo solvente	N	Subconjunto							
		1	2	3	4	5	6	7	8
N-A-A	48	.0000							
Agua	48	.0000							
Cloroformo	48	.0000							
Etanol	48	.0000							
Acetato de etilo	48	.0000							
G-C-C	48		.4722						
N-E-E	48			1.2778					
P-A-A	48				1.7014				
N-C-C	48					2.6111			
G-A-A	48						3.9722		
P-C-C	48							5.0903	
G-E-E	48								5.8194
P-E-E	48								6.0347
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.641

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .245.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 48.000

b. Alfa = 0.05.

Nota: Neem macerado y disuelto en agua (N-A-A); granado macerado y disuelto en cloroformo (G-C-C); neem macerado y disuelto en etanol (N-E-E); pericón macerado y disuelto en agua (P-A-A); neem macerado y disuelto en cloroformo (N-C-C); granado macerado y disuelto en agua (G-A-A); pericón macerado y disuelto en cloroformo (P-C-C); granado macerado y disuelto en etanol (G-E-E); pericón macerado y disuelto en etanol (P-E-E).

Del análisis anterior podemos concluir que sólo el extracto N-A-A se comportó igual que los controles negativos, es decir no mostró inhibición; mientras que todos los demás mostraron al menos un poco de actividad antimicrobiana, siendo los extractos P-E-E y G-E-E, considerados como iguales, los de mayor inhibición.

## 12.4 Análisis estadístico de los extractos con diferente solvente

A continuación se presentan los resultados del análisis de varianza (ANOVA), llevado a cabo con los diámetros promedio de los extractos disueltos en diferente solvente a los de su maceración, donde los niveles de significancia (Sig.) de los 2 factores (microorganismos y extractos), así como de su intersección (microorganismos\*extractos) son menores a 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis nula, que establece que todos los extractos y controles negativos son iguales:

$$H_0 = GCAC = GEA = PCAC = PEA = NCAC = NEA = A = C = E = Ac$$

Y se acepta la hipótesis alternativa, que establece que al menos 2 extractos son diferentes.

**Tabla 33:** ANOVA de los extractos disueltos con diferente solvente de maceración

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	6779.661 <sup>a</sup>	159	42.639	142.461	.000
Intersección	1450.672	1	1450.672	4846.794	.000
Extractos	2292.626	9	254.736	851.091	.000
Microorganismos	1316.161	15	87.744	293.159	.000
Extractos * Microorganismos	3170.874	135	23.488	78.475	.000
Error	47.889	160	.299		
Total	8278.222	320			
Total corregida	6827.550	319			

a. R cuadrado = .993 (R cuadrado corregida = .986)

Nota: Variable dependiente – Mediciones promedio

Para determinar las diferencias entre los extractos, se llevó a cabo una comparación de medias de Tukey, resumida en la tabla 34, la cual muestra que todos los extractos fueron distintos a los controles negativos y presentaron al menos una inhibición mínima. El extracto de pericón macerado con cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac) fue el que produjo mayor acción antimicrobiana junto con el extracto de la misma planta macerado con etanol y disuelto en agua (P-E-A), los cuales desde el punto de vista estadístico se consideran iguales.

**Tabla 34:** Comparación de medias de Tukey de los extractos disueltos con diferente solvente de maceración

Extractos	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
Agua	32	.0000				
Cloroformo	32	.0000				
Etanol	32	.0000				
Acetato de etilo	32	.0000				
G-C-Ac	32		.4896			
N-E-A	32			1.1250		
N-C-Ac	32			1.2708		
G-E-A	32				5.3542	
P-E-A	32					6.4479
P-C-Ac	32					6.6042
Sig.		1.000	1.000	.987	1.000	.979

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .299.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 32.000

b. Alfa = .05.

Nota: Granado macerado en cloroformo y disuelto en acetato de etilo (G-C-Ac); neem macerado en etanol y disuelto en agua (N-E-A); neem macerado en cloroformo y disuelto en acetato de etilo (N-C-Ac); granado macerado en etanol y disuelto en agua (G-E-A); pericón macerado en etanol y disuelto en agua (P-E-A); pericón macerado en cloroformo y disuelto en acetato de etilo (P-C-Ac).

## 12.5 Análisis estadístico de los extractos con aplicación de calor

Se desarrolló, además, un análisis de varianza con los diámetros de inhibición obtenidos con los extractos preparados mediante aplicación de calor, de cuyos resultados (tabla 35), podemos concluir la misma aseveración que los ANOVA anteriores, que los niveles de significancia de los 2 factores (infusiones y microorganismos) al ser menores a 0.05 o 5%, permiten rechazar la hipótesis nula, la cual menciona que todas las infusiones y blancos son iguales:

$$H_0 = TG = TP = TN = A$$

**Tabla 35:** ANOVA de los extractos de las plantas preparados con aplicación de calor

Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2485.096 <sup>a</sup>	63	39.446	157.238	.000
Intersección	524.070	1	524.070	2089.028	.000
Infusiones	524.572	3	174.857	697.009	.000
Microorganismos	874.416	15	58.294	232.371	.000
Infusiones *	1086.109	45	24.136	96.209	.000
Microorganismos					
Error	16.056	64	.251		
Total	3025.222	128			
Total corregida	2501.152	127			

a. R cuadrado = .994 (R cuadrado corregida = .987)

Nota: Variable dependiente – Mediciones promedio

Se acepta la hipótesis alternativa, infiriendo que al menos 1 extracto es diferente a los controles negativos y presenta, por tanto, actividad antibacteriana. Para encontrar las diferencias entre las infusiones de las plantas, se realizó una comparación de medias de Tukey con las mediciones promedio de los halos de inhibición.

**Tabla 36:** Comparación de medias de Tukey de los extractos preparados con aplicación de calor

Infusiones	N	Subconjunto	
		1	2
Té de neem	32	.0000	
Agua	32	.0000	
Té de granado	32		3.9583
Té de pericón	32		4.1354
Sig.		1.000	.495

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .251.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 32.000

b. Alfa = 0.05.

Con base en los resultados obtenidos en la tabla anterior, deducimos que el té de neem no presentó diferencia significativa con el control negativo (agua destilada), por lo que se consideran iguales y sin actividad antimicrobiana; las infusiones de *T. lucida* y *P. granatum*, por su parte, sí generaron halos de inhibición, aunque pequeños y a un mismo nivel, razón por la cual se consideran iguales en su efecto contra patógenos.

## 12.6 Ficha de identificación de las especies vegetales de estudio



MTRO. IVÁN MARTÍNEZ ESPINOZA

PROFESOR CATEDRÁTICO

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGÍA

UPAEP

PRESENTE

Por medio de este conducto reciba un cordial saludo así mismo aprovecho la presente para entregarle la identificación de las plantas solicitadas, misma que realizó el Botánico Allen J. Coombes, siendo la siguiente:

NÚM. DE COLECTA	NOMBRE CIENTÍFICO	ID
1	<i>Azadirachta indica</i>	Huap 64049
2	<i>Tagetes lucida</i>	Huap 64050
3	<i>Punica granatum</i>	Huap 64051
4	<i>Tagetes lucida</i>	

Cabe mencionar que la colecta No. 4 no tiene número de ID ya que debido al mal estado del ejemplar no pudo ser ingresado a la colección, sin embargo la identificación si pudo realizarse.

Sin más por el momento me despido de usted.

ATENTAMENTE

PENSAR EN LA VIDA PARA VIVIR MEJOR  
Puebla Pue. A 9 de diciembre de 2015

Drá. Maricela Rodríguez Agosta  
Directora del Herbario y Jardín Botánico BUAP

c.c.p. Archivo

Jardín Botánico  
Universitario

Prolongación 24 sur y Av. San Claudio,  
edif. 1 HJA, Ciudad Universitaria,  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7030 y 7031

## 12.7 Informe clínico de la cepa *E. coli* de origen clínico

Laboratorio Estatal de Salud Pública

Informe clínico

Editado 17-abr-2016 08:40 CST

Nº de Cliente: 2517

Nombre del paciente:

Nº paciente: 16655

Localización: LSP

Nº de examen: 16655

Nº de aislamiento: 1

Organismo seleccionado: *Escherichia coli*

Origen: ORINA

Recogida: 15-abr-2016 1742

Comentarios:	

<b>Información de identificación</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 2,50 horas	<b>Estado:</b> Final
<b>Organismo seleccionado</b>	99% Probabilidad	<b>Escherichia coli</b>
<b>Recuento:</b>	<b>Bionúmero:</b> 0405610450026611	
<b>Mensajes de análisis de ID</b>	CB=100,000UFC/mL	

<b>Información de sensibilidad</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 9,75 horas			<b>Estado:</b> Final	
<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>
BLEE	NEG	-	Meropenem	<= 0,25	S
Ampicilina	<= 2	S	Amicacina	<= 2	S
Ampicilina/Sulbactam	<= 2	S	Gentamicina	<= 1	S
Piperacilina/Tazobactam	<= 4	S	Tobramicina	<= 1	S
Cefazolina	<= 4	S	Ciprofloxacino	>= 4	R
Ceftriaxona	<= 1	S	Tigeciclina	<= 0,5	S
Cefepima	<= 1	S	Nitrofurantoína	<= 16	S
Aztreonam	<= 1	S	Trimetoprima/Sulfametoxazol	<= 20	S
Ertapenem	<= 0,5	S			

+ = Antibiótico deducido \* = AES modificado \*\* = Usuario modificado

<b>Conclusiones de AES</b>	
<b>Nivel de confianza:</b>	Coherente

## 12.8 Informe clínico de la cepa *K. pneumoniae* de origen clínico

Laboratorio Estatal de Salud Pública

Nº de Cliente: 2517

Informe clínico

Editado 17-abr-2016 13:54 CST

Nombre del paciente: [REDACTED]

Nº paciente: 16621

Localización: UNIDAD

Nº de examen: 16621

Nº de aislamiento: 1

Organismo seleccionado: *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae*

Origen: SANGRE

Recogida: 14-abr-2016 1843

<b>Comentarios:</b>	

<b>Información de identificación</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 3,75 horas	<b>Estado:</b> Final
<b>Organismo seleccionado</b>	99% Probabilidad <b>Bionúmero:</b> 6605734673564210	<b>Klebsiella pneumoniae</b> ssp <i>pneumoniae</i>
<b>Recuento:</b>		
<b>Mensajes de análisis de ID</b>		

<b>Información de sensibilidad</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 9,25 horas	<b>Estado:</b> Final			
<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>
BLEE	NEG	-	Meropenem	<= 0,25	S
Ampicilina	>= 32	R	Amicacina	<= 2	S
Ampicilina/Sulbactam	16	I	Gentamicina	<= 1	S
Piperacilina/Tazobactam	16	S	Tobramicina	<= 1	S
Cefazolina	<= 4	S	Ciprofloxacino	<= 0,25	S
Ceftriaxona	<= 1	S	Tigeciclina	>= 8	R
Cefepima	<= 1	S	Nitrofurantoina	128	R
Aztreonam	<= 1	S	Trimetoprima/Sulfametoxazol	<= 20	S
Ertapenem	<= 0,5	S			

+ = Antibiótico deducido \* = AES modificado \*\* = Usuario modificado

<b>Conclusiones de AES</b>		
<b>Nivel de confianza:</b>	Coherente	
<b>Fenotipo:</b>	BETA-LACTÁMICOS	PENICILINASA ADQUIR. + IMPERMEABILIDAD (CEFAMICINAS)

## 12.9 Informe clínico de la cepa *S. marcescens* de origen clínico

Laboratorio Estatal de Salud Pública

Nº de Cliente: 2517

Informe clínico

Editado 05-dic-2015 09:37 CST

Nombre del paciente: TOVAR MONTANEZ, R/N

Nº paciente: 13179

Localización: HOSPIT

Nº de examen: 13179

11/7 días UCW

Nº de aislamiento: 2

Organismo seleccionado: *Serratia marcescens*

Origen: ASPIRADO BRONQU

Recogida: 04-dic-2015 1208

<b>Comentarios:</b>	
---------------------	--

<b>Información de identificación</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 4,00 horas	<b>Estado:</b> Final
<b>Organismo seleccionado</b>	99% Probabilidad	<b><i>Serratia marcescens</i></b>
<b>Recuento:</b>	Bionúmero: 6425511451056230	
<b>Mensajes de análisis de ID</b>		

<b>Información de sensibilidad</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 9,00 horas			<b>Estado:</b> Final	
<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>
BLEE			Meropenem	<= 0,25	S
Ampicilina			Amicacina	<= 2	S
Ampicilina/Sulbactam			Gentamicina	<= 1	S
Piperacilina/Tazobactam	>= 128	R	Tobramicina	<= 1	S
Cefazolina	>= 64	R	Ciprofloxacino	<= 0,25	S
Ceftriaxona	>= 64	R	Tigeciclina	2	S
Cefepima	2	S	Nitrofurantoína	256	R
Aztreonam	>= 64	R	Trimetoprima/Sulfametoxazol	<= 20	S
Ertapenem	<= 0,5	S			

+ = Antibiótico deducido \* = AES modificado \*\* = Usuario modificado

<b>Conclusiones de AES</b>		
<b>Nivel de confianza:</b>	Coherente	
<b>Fenotipo:</b>	BETA-LACTÁMICOS	BETA-LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO, CEFALOSPORINASA DE ALTO NIVEL (AmpC), BLEE (SIMILAR A CTX-M)

## 12.10 Informe clínico de la cepa *S. aureus* de origen clínico

Laboratorio Estatal de Salud Pública

Nº de Cliente: 2517

Informe clínico

Editado 17-abr-2016 13:55 CST

Nombre del paciente: ██████████

Nº paciente: 16637

Localización: HOSPIT

Nº de examen: 16637

Nº de aislamiento: 1

Organismo seleccionado: *Staphylococcus aureus*

Origen: LIQUIDO DE DIAL

Recogida: 14-abr-2016 1754

<b>Comentarios:</b>	
---------------------	--

<b>Información de identificación</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 4,50 horas	<b>Estado:</b> Final
<b>Organismo seleccionado</b>	96% Probabilidad	<b>Staphylococcus aureus</b>
<b>Recuento:</b>	<b>Bionúmero:</b> 010402072763271	
<b>Mensajes de análisis de ID</b>		

<b>Información de sensibilidad</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 8,75 horas	<b>Estado:</b> Final			
<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>
Detección de cefoxitina	POS	+	Clindamicina	>= 8	R
Bencilpenicilina	>= 0,5	R	Quinupristina/Dalfopristina	0,5	S
Oxacilina	>= 4	R	Linezolid	2	S
Gentamicina	<= 0,5	S	Vancomicina	1	S
Ciprofloxacino	>= 8	R	Tetraciclina	<= 1	S
Levofloxacino	>= 8	R	Tigeciclina	<= 0,12	S
Moxifloxacino	>= 8	R	Nitrofurantoína	32	S
Resistencia inducible a clindamicina	NEG	-	Rifampicina	<= 0,5	S
Eritromicina	>= 8	R	Trimetoprima/Sulfametoxazol	<= 10	S

+ = Antibiótico deducido \* = AES modificado \*\* = Usuario modificado

<b>Conclusiones de AES</b>	
<b>Nivel de confianza:</b>	Coherente
<b>Fenotipo:</b>	BETA-LACTÁMICOS MODIFICACIÓN DE PBP (mecA)

## 12.11 Informe clínico de la cepa *S. epidermidis* de origen clínico

Laboratorio Estatal de Salud Pública

Nº de Cliente: 2517

Informe clínico

Editado 05-dic-2015 09:36 CST

Nombre del paciente: VALDES DE LEON, RN

Nº paciente: 13214

Localización: HOSPIT

Nº de examen: 13214

6/2m TI

Nº de aislamiento: 1

Organismo seleccionado: Staphylococcus epidermidis

Origen: PUNTA DE CATETE

Recogida: 04-dic-2015 1547

<b>Comentarios:</b>	
---------------------	--

<b>Información de identificación</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 6,00 horas	<b>Estado:</b> Final
<b>Organismo seleccionado</b>	98% Probabilidad	<b>Staphylococcus epidermidis</b>
<b>Recuento:</b>	<b>Bionúmero:</b> 030400076221211	
<b>Mensajes de análisis de ID</b>		

<b>Información de sensibilidad</b>	<b>Tiempo de análisis:</b> 9,75 horas	<b>Estado:</b> Final			
<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>CMI</b>	<b>Interpretación</b>
Detección de cefoxitina	POS	+	Eritromicina	>= 8	R
Bencilpenicilina	>= 0,5	R	Clindamicina	>= 8	R
Ampicilina			Quinupristina/Dalfopristina	<= 0,25	S
Oxacilina	>= 4	R	Linezolid	2	S
Gentamicina de nivel alto (sinergia)			Vancomicina	1	S
Estreptomicina de nivel alto (sinergia)			Tetraciclina	2	S
Gentamicina	>= 16	R	Tigeciclina	<= 0,12	S
Ciprofloxacino	>= 8	R	Nitrofurantoína	<= 16	S
Levofloxacino	>= 8	R	Rifampicina	<= 0,5	S
Moxifloxacino	2	S	Trimetoprima/Sulfametoxazol	>= 320	R
Resistencia inducible a clindamicina	NEG	-			

+ = Antibiótico deducido \* = AES modificado \*\* = Usuario modificado

<b>Conclusiones de AES</b>		
<b>Nivel de confianza:</b>	Coherente	
<b>Fenotipo:</b>	GLICOPÉPTIDOS	RESISTENTE (TEC)
	BETA-LACTÁMICOS	MODIFICACIÓN DE PBP (mecA)