

Actividad antimicrobiana sobre *Salmonella typhimurium* con extracto etanolico del fruto de *Sapindus saponaria* L.

J. Garrido-Islas^{1*}, A. García-Ceja¹, R.G. Campos-Montiel², Z.F. García-Pazaran¹, B.S. García-Sánchez¹

¹Ingeniería en Industrias Alimentarias. Instituto Tecnológico Superior de Venustiano Carranza, Av. Tecnológico S/N, Col. El Huasteco, Ciudad Lázaro Cárdenas, Venustiano Carranza, C.P. 73049, Puebla, México.,

²Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Av. Universidad Km. 1, Ex-Hda. de Aquetzalpa AP 32, C.P. 43600, Tulancingo, Hidalgo.

*jesus.garrido@itsvc.edu.mx

Área de participación: Ingeniería Química

Resumen

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema que enfrenta la industria alimentaria en la actualidad y personas llegan a presentar alergias a ciertos compuestos químicos utilizados para la inhibición bacteriana, disminuyendo el posible uso de estos. Los extractos naturales han tomado fuerza para ser utilizados en la inhibición bacteriana y permitir la inocuidad alimentaria. En la investigación se analizó la inhibición bacteriana del extracto etanolico del fruto de *Sapindus saponaria* L. sobre *Salmonella typhimurium* (ATCC 43971), se manejaron diferentes concentraciones de 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL y 100 mg/mL, la inhibición más pequeña que se presentó fue del 15.31% y la mayor de 27.47%, al analizarlos con una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) demostró diferencia con el control positivo (Ceftriaxona) y las muestras utilizadas, y dentro de las muestras se presentaron diferencias estadísticas.

Palabras clave: *Salmonella*, *Sapindus saponaria*, Inhibición.

Abstract

Foodborne illnesses (ETA) are a problem currently facing the food industry and people become allergic to certain chemical compounds used for bacterial inhibition, reducing their possible use. Natural extracts have gained strength to be used in bacterial inhibition and allow food safety. In the investigation, the bacterial inhibition of the ethanolic extract of the fruit of *Sapindus saponaria* L. on *Salmonella typhimurium* (ATCC 43971) was analyzed, different concentrations of 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL were used. , 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL and 100 mg/mL, the smallest inhibition that occurred was 15.31% and the largest 27.47%, at analyzing them with a Tukey test ($\alpha = 0.05$) showed a difference with the positive control (Ceftriaxone) and the samples used, and within the samples there were statistical differences.

Key words: *Salmonella*, *Sapindus saponaria*, Inhibition.

Introducción

Enfermedades transmitidas por alimentos

Los microorganismos han desarrollados resistencia hacia algunos agentes antibacterianos, debido al uso indiscriminado de fármacos antibacterianos comúnmente utilizados para el tratamiento de enfermedades, además de la resistencia, algunos antibióticos presentan efectos secundarios que limitan su uso, debido a esto surge la necesidad de descubrir nuevos agentes antibacterianos con efectos secundarios mínimos, y las plantas son una fuente potencial de nuevos prototipos antibacterianos [1].

La resistencia antimicrobiana comenzó a ser detectada poco después de que el uso de antimicrobianos se difundiera para el tratamiento de infecciones en seres humanos y animales. Sin embargo, durante los últimos 15 años se observó una aceleración de su emergencia y diseminación en microorganismos, especialmente en bacterias que afectan a personas y, sobre todo, asociada al abuso o mal uso de dichos fármacos [2].

El uso excesivo de antibióticos en lugar de extractos naturales ha generado resistencia y esto es un problema tanto en la medicina veterinaria como en la salud humana. Variedades de enterobacterias han desarrollado resistencia y llegan a causar enfermedades que no se pueden controlar, por lo que es necesario probar nuevos agentes antibacterianos. En estas condiciones, el uso de algunos productos herbales puede proporcionar una respuesta a la resistencia bacteriana ocasionada por los medicamentos tradicionales [3].

Las ETAs se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminadas con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva y son consideradas como una importante carga de enfermedad en el mundo. Estas enfermedades se caracterizan por una variedad de síntomas gastrointestinales, como náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal y fiebre; en algunos casos se pueden presentar complicaciones severas, como sepsis, meningitis, abortos, síndrome de Reiter, síndrome de Guillan Barré o la muerte [4].

Microorganismos causantes de enfermedades

Cuando en el alimento está presente un patógeno que se establece y se multiplica en el consumidor. Tiene dos variantes: a) infecciones invasivas: caracterizadas porque el microorganismo coloniza tejidos y órganos del afectado. Este grupo comprende virus, protozoos parásitos y bacterias como *Salmonella*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia* y *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC). b) Toxiinfecciones: ocasionadas por bacterias no invasivas, pero capaces de colonizar y multiplicarse en el tracto intestinal del hospedero, donde excretan sus toxinas, tal es el caso de: *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus* (cepas productoras de enterotoxinas), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y las variantes enteropatógenas de *E. coli* productoras de enterotoxinas, verotoxinas, o ambas [5].

Adicionalmente, este problema se incrementa con la aparición de nuevas formas de transmisión, en grupos poblacionales vulnerables y el incremento de la resistencia bacteriana. Las infecciones humanas causadas por agentes patógenos (*E. Salmonella* spp., *E. coli*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*), las intoxicaciones provocadas por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, mohos productores de micotoxinas y las toxiinfecciones generadas por *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, entre otros [6].

Salmonella typhimurium se estudia comúnmente porque es un importante patógeno humano y de calidad alimentaria. *S. typhimurium* se describió por primera vez como el agente causal de una enfermedad similar a la tifoidea en ratones. La población de *S. typhimurium* alcanza altos números en el intestino grueso, que también alberga la mayor comunidad microbiológica del cuerpo humano [7].

Salmonella spp. es el agente causal de infecciones gastrointestinales conocidas como salmonelosis, enfermedad considerada como un problema de salud pública a nivel mundial [8]. La principal ruta de transmisión para este patógeno es a través de la ingesta de agua y alimentos contaminados, como la carne y sus derivados, los cuales, si no cumplen con las normas de calidad e higiene pueden ocasionar importantes problemas a la salud humana [9].

Uso de plantas medicinales

En regiones donde por diversos motivos no llegan los beneficios de la medicina moderna, la herbolaria nativa suele ejercer un importante papel. La sabiduría popular menciona la existencia de diversas sustancias, planta y alimentos que poseen propiedades desinfectantes y antisépticas, tales como: alimentos naturales transformados (lácteos, encurtidos y oleáceas) y no transformados (ajo, cebolla, perejil, zanahorias, cítricos, entre otros), condimentos, especias y plantas aromáticas [10].

Por ellos, muchas investigaciones se centran en el uso de plantas medicinales, ya que existen numerosos trabajos realizados en medicina humana y veterinaria sobre las bondades terapéuticas que pueden tener algunas plantas frente a diferentes patógenos. Hoy en día se puede encontrar una amplia gama de productos de origen vegetal

con efecto ya sea bactericida o bacteriostático que sirven para controlar el crecimiento de diversos microorganismos patógenos, debido a que presentan compuestos o metabolitos que inhiben su crecimiento [11].

La especie *Sapindus saponaria* L. de distribución tropical, se encuentra abundantemente en Asia y América, especialmente en Brasil. El aceite de jaboncillo obtenido de la semilla de *S saponaria* L. se compone de oleico, palmítico, araquídico, ácidos grasos esteárico, eicosenoico, linoleico y behénico, y ha sido designado como una fuente de biodiesel debido a la gran cantidad de lípidos contenidos en la semilla (superior al 40% p/p) [12]

La planta ha sido ampliamente utilizada por los habitantes de las regiones norte y noreste de Brasil para el tratamiento de inflamaciones, lesiones e incluso cáncer. En estos lugares, la parte de la planta más utilizada es la fruta, pero no hay informes del uso de semillas como agente antibacteriano y antioxidante en otros países. La especie ha sido estudiada por sus acciones biológicas como diurético y tónico digestivo, antiofídico, fungicida, antitumoral, leishmanicida y tripanocida y potencial larvicida. Así, los estudios con esta especie contribuyeron a la identificación y aislamiento de varios compuestos químicos bioactivos [13]



Figura 1: Fruto de *Sapindus saponaria* L.

El género *Sapindus* (Sapindaceae) está formado por unas 12 especies de árboles o arbustos distribuidos por los trópicos y subtropicos del mundo [14].

El actual trabajo tuvo como objetivo realizar un análisis de actividad antimicrobiana del extracto etanolico del fruto de *Sapindus saponaria* L., sobre *Salmonella typhimurium* (ATCC 43971), mediante la técnica de Kirby-Bauer. Este trabajo es la continuación del trabajo de "Evaluación del extracto etanolico de la hoja de *Sapindus saponaria* L (Gualulu) sobre *Escherichia coli*.

Metodología

Extracción del compuesto

La recolección de la muestra se realizó en la región de Lázaro Cárdenas, Puebla. Para esto se obtuvieron los frutos que presentaran en un estado fitosanitario correcto, el fruto debe estar libre de plaga, de enfermedades o de que presente algún estado de descomposición, una vez terminada la selección se secó en un horno de convección marca LUZEREN a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante un periodo de 72 horas, al terminar el fruto se almaceno en bolsas herméticas y se guardaron hasta su uso.

El fruto se sometió a una molienda para posteriormente ser tamizado hasta tener partículas de $1\text{ mm} \pm 0.1$, el polvo fino se almacenó en un frasco oscuro hermético para su posterior uso y el polvo grueso fue nuevamente molido hasta obtener un polvo fino y ser guardado.

Se tomaron 100 g de polvo y se mezcló con metanol en una relación de 1:10 p/v, se homogenizo durante 5 minutos con ayuda de un bortex marca LB PRO MX-S, posteriormente se ocupó un baño ultrasónico AS7240B para realizar la extracción de los compuestos, el cual se realizó a 55 kHz por un periodo de 10 minutos dentro de

un frasco obscuro a temperatura ambiente [15], al terminar se filtró al vacío con papel filtro Whatman N°40 y se destilo al vacío a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ con ayuda de un baño maría, hasta obtener el extracto (Figura 2).



Figura 2: Extracto del fruto de *Sapindus saponaria* L.

Activación de la bacteria

La bacteria se tenía guardada en tubos eppendorf con 20% de caldo nutritivo y 80% glicerol a una temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, para activarla se tomaron tres azadas con una aza microbiológica estéril del tubo y se mezcló en caldo nutritivo (marca Bioxon), esto se realizó por triplicado, para posteriormente dejar los tubos en incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas [16].

Preparación del extracto

El extracto se preparó en diferentes concentraciones, las cuales fueron 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg y 100 mg en 1 mL de DMSO (Figura 3). Estos extractos se prepararon el mismo día que se utilizaron para evitar que se oxidaran o perdieran su acción.

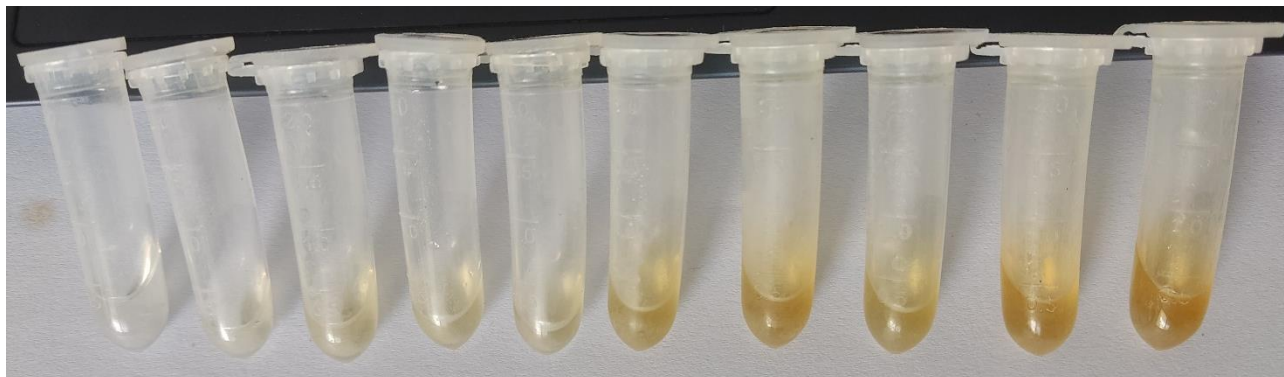


Figura 3: Concentraciones del extracto (de izquierda a derecha)

La bacteria se ajustó a 0.5 de acuerdo a la escala de McFarland, siguiendo el procedimiento descrito [16], se suspendieron las cepas en 60 mL de solución salina estéril en la cual se inocularon *Salmonella typhimurium*, se leyó la absorbancia y el resultado fue comparado con la absorbancia del tubo 0.5 de la escala de McFarland, el tubo ajustado presento una concentración entre 106 UFC/mL a 108 UFC/mL.

Se preparó agar Mueller Hinton (Marca Bioxon) de acuerdo a las especificaciones del proveedor y se esterilizo [17], se vertieron 20 mL de agar a una temperatura aproximada de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Una vez que el agar solidifico se colocaron los sensidiscos como se muestran en la figura 4. Ya colocados los sensidiscos se colocaron 20 μL del extracto, en cada uno de ellos (el orden de acomodo de los sensidiscos fue de 1 – 10mg/mL, 2 – 20 mg/mL, 3 -

30 mg/mL, 4 - 40mg/mL, 5 - 50mg/mL, 1 - 60 mg/mL, 2 - 70 mg/mL, 3 – 80 mg/mL, 4 - 90 mg/mL y 5 - 100 mg/mL), el control negativo (DMSO) y el control positivo (Ceftriaxona), se colocaron en una caja independiente.

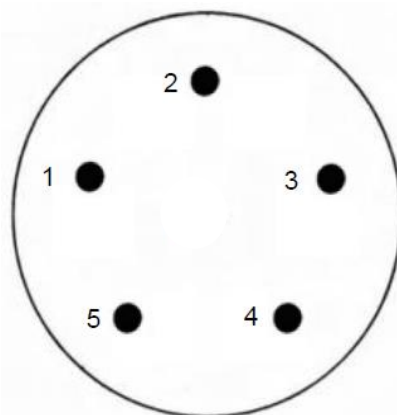


Figura 4: Acomodo de sensibilizadores.

Una vez colocados con sensibilizadores con el extracto, se dejó la caja Petri a 37 °C ±1 durante 24 horas. Todos los extractos se realizaron por quintuplicado y los controles por triplicado.

Porcentaje de inhibición

Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó el método descrito por [18], utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(D. \text{halo del extracto} - D. \text{halo de blanco})}{(D. \text{halo control positivo} - D. \text{halo blanco})} * 100$$

Resultados y discusión

Los resultados se analizaron con el programa Minitab 19 mediante una prueba Tukey ($\alpha = 0.05$) y se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones analizadas y los controles utilizados como positivos y negativos.

La actividad antibacteriana del extracto etanólico del fruto de *Sapindus saponaria* L. en diferentes concentraciones frente a la cepa *Salmonella typhimurium* ATCC 43971 presentó inhibición como se muestra en la tabla 1, donde se observa que la concentración que mostro un mayor halo de inhibición ante la bacteria fue la de 100 mg/mL (**b**) la cual presento similitud estadística con diferentes muestras las cuales son las siguientes, presento una mayor similitud con las concentraciones de 90, 80 mg/mL, ya que estas concentraciones comparten la letra **b** y entre ellas presentan la letra **c** como similitud estadística, una menor similitud con las concentraciones de 70, 60 y 50 mg/mL compartiendo la letra **b** con la concentración más alta y la letra **c** con las concentraciones de 90 y 80 y entre ellas comparten la letra **d**, y por ultimo tiene una mínima similitud con la concentración de concentración de 40 mg/mL, ya que aunque comparten la letra **b**, pero esta concentración presenta otras tres letras que son **c**, **d** y **e**, esta concentración comparte estas letras con las concentraciones más bajas y estas son estadísticamente diferentes a la muestra más alta. En relación al antibiótico todas las muestras fueron estadísticamente diferentes ya que no comparten ninguna letra. EL DMSO no presento inhibición contra la bacteria.

Una vez comparada la tabla 1 con la figura 5, se aprecia que los halos de inhibición muestran un aumento de diámetro entre una muestra y la otra y llegando a la muestra de 50 mg/mL el aumento es mucho más estable, mostrando lo que indica la prueba estadística y la similitud que existen entre dichas muestras.

Al analizar el porcentaje de inhibición con la fórmula utilizada por [19], obtenido el diámetro del control positivo de 38.79 mm y diámetro de control blanco de 0 mm y al aplicar la formula se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 2, en la cual se observa que a partir de la concentración 40mg/mL, se mantiene mucho mayor estable, corroborando el análisis estadístico.

Tabla 1: Determinación de halos de inhibición en *Salmonella typhimurium*

Concentración del extracto (mg/mL)	n	Promedio (mm)
10	5	5.94 ± 1.50 ^e
20	5	6.36 ± 1.88 ^{de}
30	5	7.36 ± 2.03 ^{cde}
40	5	8.21 ± 2.02 ^{bcde}
50	5	8.79 ± 1.33 ^{bcd}
60	5	8.66 ± 0.67 ^{bcd}
70	5	8.79 ± 0.39 ^{bcd}
80	5	9.05 ± 0.25 ^{bc}
90	5	9.25 ± 0.34 ^{bc}
100	5	10.65 ± 0.24 ^b
DMSO (-)	3	0 ± 0.00 ^f
Antibiótico (+)	3	38.79 ± 0.37 ^a

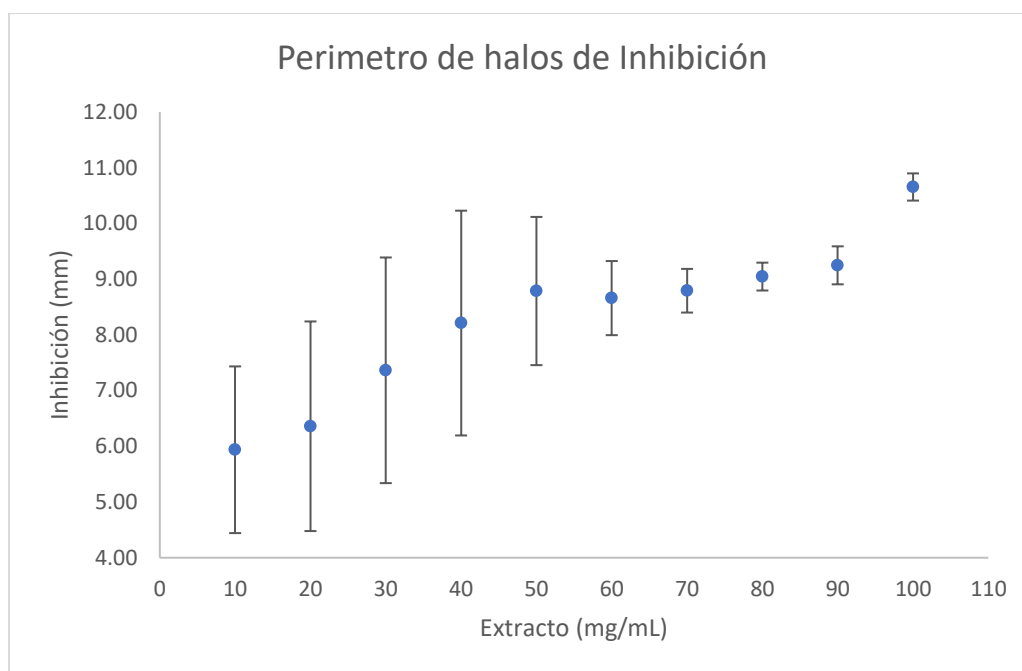


Figura 5: Perímetro de halos de inhibición

La comparación de inhibición que presenta el extracto con lo realizado por otros autores se encontró [19] inhibición contra *Staphylococcus aureus* a partir de una concentración de 150 mg/mL, en el caso de [20] encontró que para *Salmonella typhi* (ATCC14028) y *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) con el extracto de *Croton draco* mostro actividad antibacteriana a partir de 100 mg/mL. [21] demuestra que los aceites esenciales de las plantas presentan inhibición bacteriana, aunque no se ha obtenido la composición del extracto, el fruto contiene aceites como lo explica [11] y a estos aceites se le atribuye la actividad que presenta.

En comparación con el trabajo de [22] en donde se realizó el extracto etanólico de la hoja y se realizó la inhibición de *E. coli*, mostro que todas las concentraciones fueron iguales estadísticamente, mientras que en las concentraciones del fruto si mostro diferencia significativa al momento de inhibir la bacteria.

Trabajo a futuro

Se pretende seguir analizando con más bacterias, para posteriormente realizar aplicaciones a productos procesados y no procesados y conocer si existe una mejora en la vida de anaquel del producto.

Tabla 2: Porcentaje de inhibición de *Salmonella typhimurium*

Concentración del extracto (mg/mL)	Porcentaje de inhibición
10	15.31%
20	16.40%
30	18.98%
40	21.17%
50	22.65%
60	22.33%
70	22.67%
80	23.32%
90	23.84%
100	27.47%

Conclusiones

Los aceites esenciales como el oleico, palmítico, araquídico, esteárico, eicosenoico, linoleico y behénico, presentes y extraídos del fruto de jaboncillo (*Sapindus saponaria* L), inhibieron el crecimiento de *Salmonella typhi* en concentraciones de 10 mg/mL hasta 100 mg/mL, mostrando diferencia significativa a partir de la concentración de 40 mg/mL, sin embargo, se presentó diferencia significativa entre el antibiótico (0.1mg/mL) con los diferentes tratamientos. Dentro de la inhibición se alcanzó un 27.47% con la concentración de 100 mg/mL. La actividad antimicrobiana puede deberse a la acción de uno o mezcla de aceites esenciales presentes en el fruto. Los extractos etanólicos obtenidos podrán ser utilizados en la industria de alimentos sin que generen alguna reacción negativa sobre el producto, pero si contra bacterias causantes de deterioro en los alimentos

Referencias

- [1] P. Thota, P.K. Bhogavalli and S.K. Chenreddy. "Phytochemical Investigation and Antibacterial Screening of Leaf Extracts of *Sapindus saponaria* Vahl," *Research Journal of Pharmacy and Technology*, vol.5, no. 2, pp. 273-276, 2012.
- [2] L. Calvino. "Vigilancia de la resistencia antimicrobiana en animales: profundizar las iniciativas y ampliar las capacidades", *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 53, pp. 87-88, 2021.
- [3] S. Rahman, A. Khasru, R. Islam and M. Hossain. "Antibacterial activity of natural spices on multiple drug resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water, Bangladesh", *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 10, no. 1, art. No. 10, 2011.
- [4] S. Fernández, J. Marcia, J. Bu, Y. Baca, V. Chavez, H. Montoya, I. Varela, J. Ruiz, S. Lagos and F. Ore. "Enfermedades transmitidas por Alimentos (ETAs); Una Alerta para el Consumidor", *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinaria*, vol. 2, no. 2, pp. 2284-2298. 2021 DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i2.433
- [5] H. Rodríguez, G. Barreto, M. Sedrés, J. Bertot, S. Martínez and G. Guevara. "Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio", *Revista Electronica Veterinaria*, vol. 16, no. 8, pp. 1-27, 2015.
- [6] C. Palomino-Camargo, Y. Gonzáles-Muñoz, E. Pérez-Sira and V.H. Aguilar. "Metodología delphi en la gestión de la inocuidad alimentaria y prevención de enfermedades transmitidas por alimentos", vol. 35, no. 3, pp. 483-490, 2018.
- [7] A.W.L. Rogers, R.M. Tsois and A. J. Bäumler. "*Salmonella* versus the Microbiome", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 85, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-19>

- [8] A. Kumar, A. Allison, M. Henry, A. Scales and A.C. Fouladkhah. "Development of salmonellosis as Affected by Bioactive Food Compounds", *Microorganisms*, vol. 18;7, no. 7(9), 2019, DOI: [10.3390/microorganisms7090364](https://doi.org/10.3390/microorganisms7090364)
- [9] M.S.R. Fachmann, C. Löfström, J. Hoorfar, F. Hansen, J. Christensen, S. Mansdal and M.H. Josefsen. "Detection of *Salmonella enterica* in Meat in Less than 5 Hours by a Low-Cost and Noncomplex Sample Preparation Method", vol. 83, no. 5, 2017, DOI: [10.1128/AEM.03151-16](https://doi.org/10.1128/AEM.03151-16)
- [10] A. Arroyo-Lara, L.A. Landín-Grandvallet, A. Alonso-Bustamante, M.A. Sánchez-Aguilar and G. Suárez-Franco. "Actividad inhibitoria de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*", *Biológico Agropecuaria Tuxpan*, vol 3, no. 5, pp. 1045-1052, 2015.
- [11] L. Sorroza, M.I. Campoverde and R.A. Santacruz-Reyes. "Estudio preliminar del extracto de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura", *Reviata AquaTIC*, vol.49, pp. 1-7, 2017
- [12] B.L. Pelegrini, E.A. Sudati, F. Ré, A. L. Moreira, I.C. Piloto, A.R. Sampaio, N.M. Kimura and M.M. de Souza. "Thermal and rheological properties of soapberry *Sapindus saponaria* L. (*Sapindaceae*) oil biodiesel and its blends with petrodiesel", *FUEL*, no. 199, pp. 627-640, 2017.
- [13] G. D. Bocayuva, C.A. Fortes, I. Felzenszwalb, E. K. Carrao, C. F. Araújo-Lima and C.L. Siqueira. "In vitro biochemical characterization and genotoxicity assessment of *Sapindus saponaria* seed extract", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 276, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114170>
- [14] O.A. Abreu. "Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (*Sapindaceae*) y de la especie *Sapindus saponaria* L." *Rev Cubana Plant Med*, vol. 10 n. 3-4. 2005.
- [15] E. Corona-Jiménez, N. Martínez-Navarra, H. Ruiz-Espinosa and J. Carranza-Concha. "Ultrasound-Assisted extracción of cphenolics compounds from chia (*Salvia hispánica* L.) seeds and their antioxidant activity". *Agrociencia*, vol. 50, pp. 403-412, 2016.
- [16] C. Carrillo-Tomalá and R. Díaz-Torres. "Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de hojas de dos variedades de *Mangifera* L". *Revista Ciencia UNEMI*, vol. 12, no. 31, pp. 69 – 77, 2019.
- [17] M. Montero-Recalde, L. Vayas, D. Avilés-Esquivel, P. Pazmiño and V. Erazo-Gutierrez. "Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*". *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, vol. 29, no. 4, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>
- [18] J.E. Neira Llerena. "Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las plantas medicinales utilizadas por los pobladores de tuctumpaya, quequeña y chiguata, frente a bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus* – *streptococcus pneumoniae* causantes de infecciones de importancia médica, arequipa – Perú". Tesis Titulo Profesional de Biólogo. Departameteo de Microbiología y Patología, UNSA, Arequipa, Perú, 2018.
- [19] A. Ramírez, S. Luz, B. Díaz and E. Hilda. "Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*)", vol. 13, no. 33, pp. 397-400, 2007.
- [20] A. Morales-Ubaldo, J. Hernández-Alvarado, B. Valladares-Carranza, V. Velázquez-Ordoñez, L. Delgadillo-Ruiz, C. Rosenfeld-Miranda, N. Rivero-Pérez and A. Zaragoza-Bastida. "Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico *Croton draco* sobre bacterias de importancia sanitaria", *Abanico Veterinario*, vol. 10, no.1, pp. 1-10, 2020.
- [21] C.M. Zamora-Ramírez and C. J. Toro-Huamanchumo. "Antibiotic activity of *Eucalyptus globulus* against Gram positive bacteria: a review article", *Revista Médica Vallejana*, vol. 10, no.2, pp. 93-104.
- [22] J. Garrido-Islas, N.E. Jara-Ramírez, A. García-Ceja, A. Trapala-Islas and L. González-Montiel. "Evaluación del extracto etanolico de la hoja de *Sapindus saponaria* L. (Gualulu) sobre *Escherichia coli*." *Journal CIM*, vol. 9, no. 1, pp. 1216-1222, 2021.