



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA.**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS.



**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE HOJA
DE ÁRBOL DE GUAYABA (*PSIDIUM GUAJAVA*) PARA SU
USO EN ACUICULTURA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LIC. EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA**

PRESENTA

SHAULA ADHARA CASTRO MURRIETA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA A 26 DE ENERO DEL 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE HOJA DE ÁRBOL DE GUAYABA (*Psidium guajava*) PARA SU USO EN ACUICULTURA.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA:

Shaula Adhara Castro Murrieta

APROBADA POR:

COMITÉ DE TESIS

Dr. Samuel Sánchez Serrano
Director de Tesis

Mtra. Thayde Sánchez Nava
Codirectora

Dra. Natalie Millán Aguiñaga
Secretaria

Dra. Ceres Molina Cárdenas
Sinodal

Resumen

La acuicultura es una de las actividades productivas con mayor crecimiento a nivel mundial y sus tendencias a una intensificación de la producción han provocado enfermedades infecciosas emergentes, siendo las producidas por bacterias del género *Vibrio*, las más problemáticas. Estas han sido tratadas con un uso desmedido de antibióticos. Una alternativa al uso de antibióticos es la implementación de productos fitogénicos, por ejemplo los extractos de hoja de árbol de guayaba (*P. guajava*), la cual es conocida por sus amplios usos en farmacología. En este ensayo se realizaron dos extractos elaborados a partir de hojas de *P. guajava* (EHF y EHS), y su potencial antimicrobiano fue probado contra tres especies de bacterias *E. coli*, *B. cereus* y *V. alginolyticus*, además se probó su uso como desinfectante para rotíferos *B. plicatilis* y se realizó un análisis fitoquímico de los mismos. Las tres especies de bacterias demostraron ser sensibles al extracto, siendo *E. coli* la menos sensible (6.3 ± 0.6 mm de halo de inhibición para EHF) y *B. cereus* la más sensible (12.7 ± 1.5 mm de halo de inhibición para EHF). Por otro lado, los rotíferos demostraron ser sensibles al extracto a altas concentraciones (0.25 g/mL) cesando el nado después de 15 min. de exposición, mientras que a la misma concentración, la carga bacteriana de los mismos disminuyó hasta 0 UFC/mL en medios de cultivo específicos y no específicos. El extracto EHF demostró contener compuestos como saponinas, flavonoides y terpenoides, después de las pruebas fitoquímicas. El potencial antimicrobiano que poseen los extractos se atribuye a la presencia de compuestos fitogénicos, mientras que las diferencias observadas en los resultados se deben a las diferencias de sensibilidad de las bacterias. Gracias a los resultados obtenidos se reconoce el potencial antimicrobiano que posee el extracto de hoja de árbol de guayaba en la industria acuícola.

Palabras clave: Acuicultura, *Vibrio*, fitogénico, guayaba, extracto, antimicrobiano.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Baja California, por brindar los espacios y el personal necesarios para llevar a cabo los ensayos que permitieron la realización de este proyecto.

Al laboratorio de microbiología y al laboratorio de nanobiotecnología marina por brindar el material necesario así como los espacios físicos donde se llevaron a cabo los ensayos.

Al laboratorio de nutrición acuícola, especialmente al Dr. Fernando Barreto y a Samantha por su apoyo en el uso y manejo de equipos del laboratorio.

A mi director de tesis el Dr. Samuel Sánchez por otorgar el privilegio de su sabiduría y conocimiento en materia de microbiología, patología, acuicultura y saberes varios. Por las vivencias compartidas que se han acumulado durante los años de estudio compartidos, que no han sido pocos.

A mi codirectora de tesis la Mtra. Thayde Sánchez por brindarme los conocimientos necesarios en materia de química de productos naturales y por despertar en mí el interés por realizar este trabajo de investigación. Por ser una excelente docente y compartir sus saberes y experiencias con paciencia y respeto.

A mi comité de tesis, a la Dra. Natalie Millán, por resolver dudas y guiarme en la escritura y análisis de la información y a la Dra. Ceres Molina por formar parte de este trabajo de investigación compartiendo sus conocimientos en el área de patología y por formar un vínculo entre ambas instituciones educativas.

Dedicatoria

A mis padres, Kenia y Gustavo, que me han apoyado en todas mis locuras a lo largo de toda mi vida y sé que seguirán haciéndolo, por ser un gran ejemplo a seguir, por ser luz infinita y por enseñarme a perseverar y dedicarle tiempo a lo que me hace feliz.

A Kaus por ser y estar. Por darme la oportunidad de vivir con uno de los seres más preciados que tengo en mi vida, Victoria. Por enseñarme el valor de las cosas y ayudarme a aterrizar cuando me hace falta.

A mis tatas y mi familia que han estado conmigo siempre, que me han dado amor y alegría, de los que siempre obtengo un sabio consejo y un plato de comida caliente cuando llegaba de la escuela.

A mi nana Olivia y mi tata Ramón que desde el cielo me cuidan y se preocupan por mi, con amor para ustedes.

A Rubén por ser el mejor amigo que la vida me pudo brindar, por todos los viajes, fiestas y momentos que me ayudaron a escapar de la realidad, porque el estar contigo se siente como una fantasía.

A Daniel por comprenderme, amarme y valorarme hasta en los momentos más difíciles. Por ser un apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida. Gracias.

A mis amigas Areli y Cristina, fuente inagotable de cariño, risas y anécdotas. Por escucharme y ser siempre mis compañeras de vida a través de todos estos años y los que faltan.

Por último a mi misma, por perseverar, por seguir siendo auténtica a mi misma y no dejar que nada me arrebatara mi esencia.

¡Gracias por existir!

Índice

Resumen	3
Agradecimientos	4
Dedicatoria	5
Índice de figuras	8
Índice de tablas	10
1. Introducción	11
1.1 Antecedentes	16
1.1.2 Bacterias en acuicultura	16
1.1.2.1 Género Vibrio	18
1.1.3.3 V. alginolyticus	20
1.1.3 Bacterias de importancia en salud humana	
1.1.3.1 Escherichia coli	20
1.1.3.2 Bacillus cereus	21
1.1.4 Problemática actual para el control de enfermedades bacterianas en acuicultura	23
1.1.4.1 Antibióticos empleados en acuicultura	24
1.1.4.2 Alternativas terapéuticas que se utilizan en acuicultura	26
1.1.5 Los fitogénicos	27
1.1.5.1 Flavonoides	30
1.1.5.2 Terpenoides	31
1.1.6 Psidium guajava	33
1.1.6.1 Características de la especie Psiduim guajava	33
1.1.6.2 Usos y aplicaciones de la hoja de árbol de guayaba Psidium guajava	34
1.1.6.2.1 Uso de P. guajava como antimicrobiano	36
1.1.6.3 Compuestos reportados de las hojas de árbol de guayaba	38
1.2 Justificación	40
2. Hipótesis	40
3. Objetivos	41
3.1 Objetivo general	41
3.2 Objetivos específicos	42
4. Metodología	42
4.1 Material biológico	42
4.1.1 Recolección de muestras	42
4.1.2 Procesamiento del material biológico	43
4.2 Preparación de extractos	44

4.2.1 Extracción acuosa caliente de hoja seca (EHS)	44
4.2.2. Extracción acuosa caliente de hoja fresca (EHF)	45
4.3. Pruebas biológicas in vitro de actividad antimicrobiana de extractos	46
4.3.1. Prueba método de difusión en placa con sensidiscos	46
4.3.2. Ensayo concentración mínima inhibitoria	48
4.4. Pruebas biológicas en rotíferos (<i>B. plicatilis</i>)	50
4.4.1. Ensayo evaluación de sobrevivencia a exposición del extracto.	50
4.4.2. Ensayo sobre la disminución de carga bacteriana por tiempo de exposición al extracto	52
4.5. Pruebas fitoquímicas	54
4.5.1. Preparación de muestras	54
4.5.2. Prueba para saponinas	54
4.5.3. Prueba para terpenoides (Salkowski test)	54
4.5.4. Prueba para flavonoides (Shinoda test)	54
4.6. Análisis estadístico	55
5. Resultados	57
5.1 Efecto antibacteriano de extractos	57
5.1.1 Método de difusión en disco	57
5.1.2 Concentración mínima inhibitoria	59
5.2 Pruebas en rotíferos	61
5.2.1 Evaluación de sobrevivencia de rotíferos	61
5.2.2 Disminución carga bacteriana por tiempo de exposición	62
5.3 Pruebas fitoquímicas	65
6. Discusiones	67
6.1 Efecto antibacteriano de extractos	67
6.2 Pruebas en rotíferos	71
6.3 Pruebas fitoquímicas	74
7. Conclusiones	76
8. Recomendaciones	77
9. Referencias	78
10. Anexos	86

Índice de figuras

Figura 1.- Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura	12
Figura 2.- Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura, 1980-2030	13
Figura 3.- Fotografía de microscopio electrónico de una célula de <i>Vibrio</i> sp. Técnica de sombreado (15.000x)	18
Figura 4.- Fotografía de microscopio electrónico de una célula de <i>E. coli</i> (44,818 X)	21
Figura 5.- Fotografía de microscopio electrónico de barrido de una célula de <i>B. cereus</i> (20,000 X)	22
Figura 6.- Ejemplificación de la amplia gama de fitogénicos que existen	29
Figura 7.- Estructura básica de los flavonoides (izquierda), estructura de la quercetina (derecha)	30
Figura 8.- Estructura química de los mono y sesquiterpenos naturales	32
Figura 9.- Apariencia de una hoja de <i>Psidium guajava</i>	34
Figura 10.- Usos de <i>P. guajava</i> en la medicina tradicional de los principales países productores	35
Figura 11.- Diagrama de flujo de la elaboración de extractos acuosos de hoja seca	45
Figura 12 .- Diagrama de flujo de la elaboración de extractos acuosos de hoja fresca	46
Figura 13.- Diagrama de la elaboración de prueba de actividad biológica métodos de difusión en disco	48
Figura 14.- Diagrama de la elaboración de prueba de concentración mínima inhibitoria	50
Figura 15.- Diagrama de la elaboración de ensayo evaluación de sobrevivencia a exposición del extracto	51
Figura 16.- Diagrama de la elaboración de prueba de disminución de carga bacteriana en rotíferos por tiempo de exposición al extracto	53
Figura 17.- Diagrama de la elaboración de pruebas fitoquímicas para saponinas, terpenoides y flavonoides	55
Figura 18.- Halos de inhibición presentados del extracto EHF contra <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> y <i>V. alginolyticus</i>	58

Figura 19.- Disminución de carga bacteriana en cultivos de rotíferos por exposición al extracto EHF, a través del tiempo en medio de cultivo TSA	63
Figura 20.- Disminución de carga bacteriana en cultivos de rotíferos por exposición al extracto EHF, a través del tiempo en medio de cultivo TCBS	64
Figura 21.- Disminución de carga bacteriana en cultivos de rotíferos por exposición al extracto EHF, a través del tiempo en medio de cultivo <i>Vibrio chrome</i>	65
Figura 22.- Resultados positivos de la prueba fitoquímica para terpenoides y flavonoides del extracto EHF	66

Índice de tablas

Tabla I.- Características de antibióticos empleados en acuicultura	26
Tabla II.- Recopilación de pruebas in vitro contra agentes infecciosos	37
Tabla III.- Análisis proximal de polvo de hojas de <i>P. guajava</i>	38
Tabla IV.- Efecto antibacteriano de los extractos de hoja seca y hoja fresca	57
Tabla V.- Ensayo de CMI del extracto EHF para <i>B. cereus</i> y <i>V. alginolyticus</i>	59
Tabla VI.- Ensayo de CMI del extracto EHS para <i>B. cereus</i> y <i>V. alginolyticus</i>	60
Tabla VII.- Prueba de evaluación de sobrevivencia de rotíferos expuestos a distintas diluciones del extracto EHF a través del tiempo	61
Tabla IX.- Resultados pruebas fitoquímicas para extracto EHF	66

1. Introducción

La acuicultura es una actividad descrita como la producción de organismos acuícolas en recintos artificiales creados para su cría intensiva, incluyendo organismos como peces, crustáceos, moluscos y algas marinas, para el consumo humano y también con fines biotecnológicos. Esta se puede llevar a cabo en sistemas de agua dulce, agua salobre o marina, y se clasifica según su tipo de sistema, aquellos que se realizan directamente en el mar (maricultivos), también los que se realizan en estructuras terrestres cercanas a un cuerpo de agua y por último los que se realizan en sistemas de recirculación donde se controlan recambios de agua y parámetros físico químicos (El-Saadony *et al.*, 2022).

La acuicultura, es una actividad holística, que gracias a sus diversos enfoques y métodos de cultivo desde rurales hasta otros más industrializados, genera distintos impactos, resultados y afecciones tanto sociales, económicos, nutricionales y ambientales. A pesar de que la acuicultura tiene raíces antiguas, es una industria relativamente nueva, que ha aumentado en los últimos 40 años y la cual posee un inmenso potencial y espacio de crecimiento. Así, uno de los objetivos que esta industria ha tenido es el satisfacer las necesidades de alimento de alta calidad con prácticas responsables que influyan en el bienestar humano y la salud ambiental (Gephart *et al.*, 2020).

Esta industria ha logrado producir un impacto en la sociedad desde tiempos milenarios, creando no solo una fuente de alimento para la población, sino que, además brinda empleo a cientos de personas pertenecientes a sectores marginados de la población (El-Saadony *et al.*, 2022). Así mismo, la acuicultura ha sido en tiempos modernos, una alternativa para todos aquellos miembros de la comunidad dedicada a la extracción pesquera del medio natural que, debido a la decadencia de los volúmenes de captura, se vieron en la necesidad de abandonar su empleo y buscar otra fuente de ingresos aplicando sus conocimientos.

Esta actividad, es una de las pertenecientes al sector de producción con mayor crecimiento y relevancia a nivel mundial. En el año 2020, se registró que la actividad acuícola produjo 88 millones de toneladas (el 49 % de la producción mundial de

pescados y mariscos en comparación con la pesca extractiva). Esta producción se tradujo en 265 000 millones de USD pertenecientes a la acuicultura. Como se puede apreciar en Figura 1, la producción que se comenta ha aumentado con los años, desde que se tiene un registro histórico de la producción pesquera y acuícola, podemos denotar, que la acuicultura es una actividad económica que sigue en aumento, incluso más que la extracción pesquera (FAO, 2022).

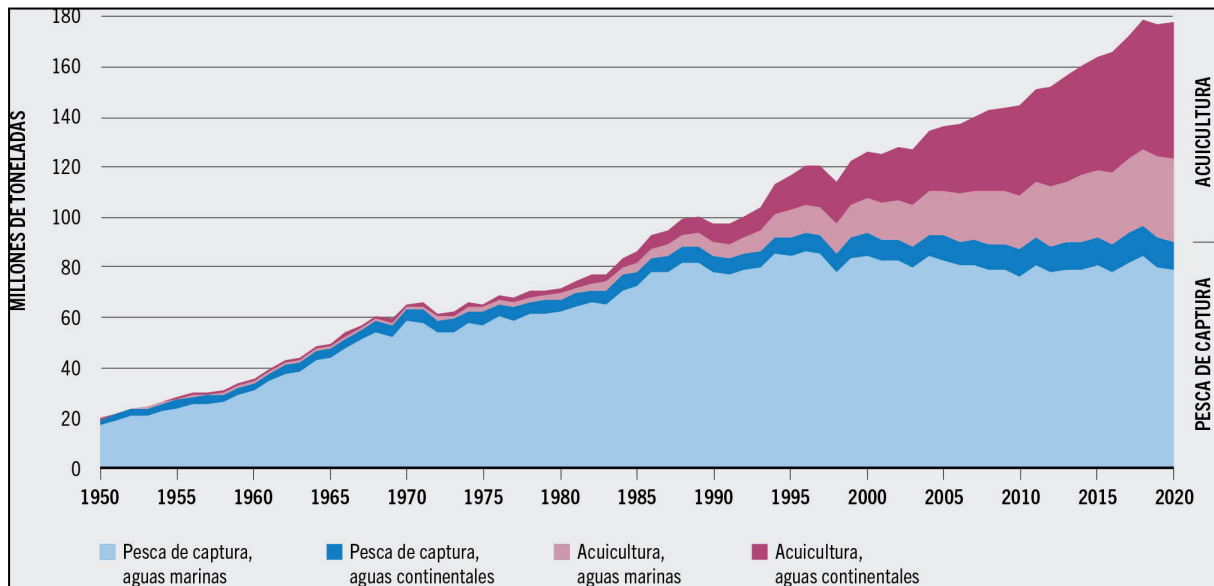


Figura 1.- Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura (FAO, 2022).

En cuanto al futuro de la producción mundial de pesca y acuicultura como se plasma en Figura 2, de manera gráfica se representa el crecimiento previsto de ambas actividades. Así, se estima que la producción de pesca por extracción sea rebasada por la producción acuícola, siendo para el 2030 un 47% de la producción proveniente de la pesca y el 57% de la producción provendrá de acuicultura. Por ende, se prevé que la actividad de producción acuícola siga aumentando y alcance 106 millones de toneladas en 2030, por lo tanto, un incremento global del 22 %, es decir, alrededor de 19 millones de toneladas más, en comparación al 2020 (FAO, 2022).

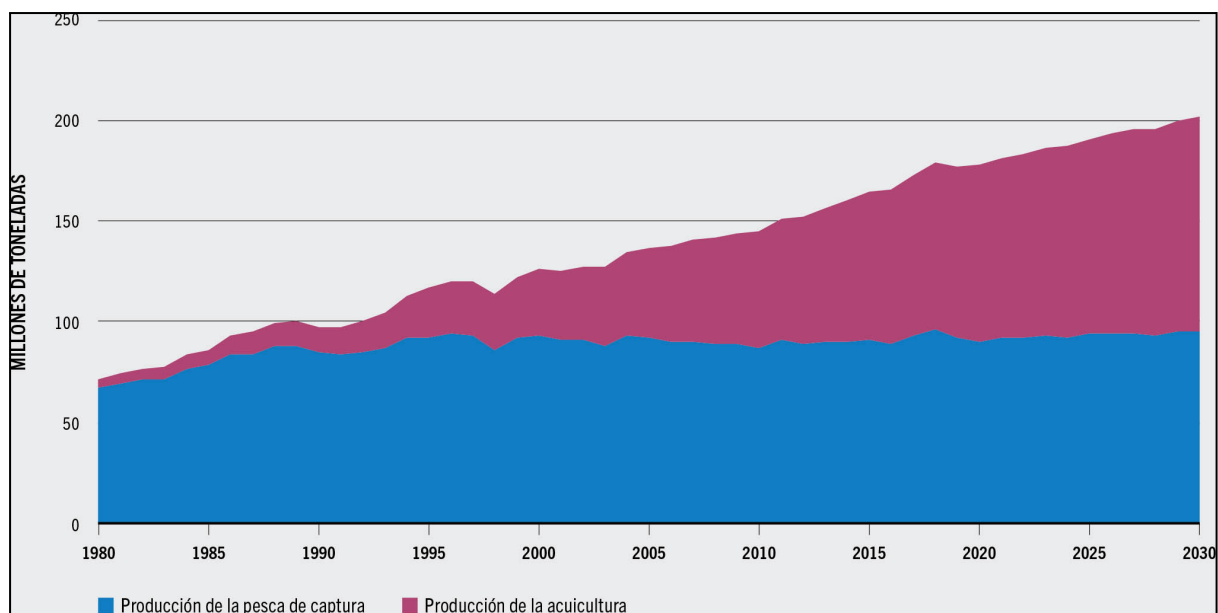


Figura 2.- Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura, 1980-2030 (FAO, 2022).

A pesar del aumento previsto en la producción acuícola, esta actividad se ve afectada por factores externos que se convierten en amenazas, estas se relacionan con los cambios climáticos que se estima continúen afectando cada vez con más frecuencia, así como las modificaciones en la normativa de cada país en materia acuícola, menor disponibilidad de recursos, enfermedades emergentes, entre otros (FAO, 2022).

Desde el 2016 hasta la actualidad las prácticas acuícolas en respuesta a la necesidad de producción que demanda la población a nivel mundial, han modificado sus sistemas de producción, teniendo tendencias hacia una producción más intensiva, donde se cultivan organismos en mayores densidades (FAO, 2022). Este tipo de producción ha traído consigo una consecuencia importante que representa una amenaza a la producción. Se trata del aumento de los brotes de enfermedades en los organismos en cultivo. Así, las granjas de producción son constantemente afectadas por enfermedades infecciosas, que son causadas por distintos tipos de patógenos, como son virus, hongos, parásitos y bacterias (Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018).

Las infecciones bacterianas producen un sin fin de efectos negativos en los organismos, como pueden ser lesiones en la piel, abscesos, anemia, cambios en el comportamiento, deterioro de productividad, entre otras. Además, promueve la mortalidad de los organismos infectados, lo cual se traduce en pérdidas económicas importantes. Una alternativa que se ha empleado para contrarrestar estos efectos, es el uso de antibióticos. Sin embargo, el uso desmedido y sin regulación de estos fármacos, ha llevado a la aparición de cepas bacterianas que generan resistencia a estos antibióticos. Además, debido a una mala gestión, se ha logrado detectar la presencia de residuos de estos fármacos en el medio natural, gracias a estos efectos, esta actividad se ha convertido en una amenaza contra la salud pública, a la cual hay que prestar atención (De-Souza-Gazal *et al.*, 2020).

En respuesta a esta creciente problemática, las empresas acuícolas, han buscado alternativas al uso de antibióticos. Una de las alternativas terapéuticas que se han propuesto es el uso de sustancias naturales y de extractos provenientes de plantas, los cuales se ha demostrado que tienen efectos benéficos para el organismo huésped y previene el brote de enfermedades. Estos efectos benéficos en los extractos de plantas, se atribuyen a la presencia de moléculas bioactivas como alcaloides, flavonoides, terpenoides, entre otros que, además de poseer propiedades antimicrobianas contra bacterias patógenas, no provocan resistencia bacteriana (Nafiqoh *et al.*, 2019).

Uno de los objetivos del estudio de productos fitoquímicos, es la búsqueda de nuevos prospectos para la obtención de nuevos fármacos que sean eficientes. Una especie de la cual se tiene una amplia línea de investigación es la hoja de árbol de guayaba (*Psidium guajava*) (Omitoyin *et al.*, 2019). Esta planta es abundante en la mayoría de los países tropicales y se ha reportado que en sus hojas se encuentran compuestos bioactivos de importancia, como son aceites esenciales, flavonoides, saponinas, quercetina, entre muchos otros, los cuales, han reportado tener efectos positivos como antimicrobianos, además de tener otras cualidades sobre los organismos huéspedes (Novi-Rosmala *et al.*, 2021).

Por esta razón, en el siguiente trabajo de investigación, se buscó implementar extractos realizados a partir de hojas de árbol de guayaba, con el fin de probar si

estos poseen una actividad antibacteriana, contra una de las bacterias que más afectan a los sistemas acuícolas, que es *Vibrio alginolyticus*. Además, se buscó probar estos extractos como desinfectantes en un cultivo de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y poder así evaluar si estos extractos tienen un potencial uso como antimicrobiano en acuicultura.

1.1 Antecedentes

1.1.2 Bacterias en acuicultura

Como es de conocimiento, en todo momento, convivimos con agentes biológicos microscópicos que se encuentran a nuestro alrededor y dentro de nosotros. Sabemos que existen bacterias que nos afectan directa o indirectamente de manera negativa, provocando enfermedades; sin embargo, también están aquellas que coexisten con nosotros y que brindan un beneficio, como es el caso de bacterias que nos ayudan a la digestión de alimentos, que forman parte de nuestra microbiota (Montaño-Arias *et al.*, 2010).

De esta manera, cada ser vivo, ya sea terrestre o acuático, posee una carga bacteriana propia, misma que coexiste con las bacterias que se encuentran en el medio. Propiamente existen distintas especies de bacterias en los sistemas acuícolas que forman parte de la microbiota natural, estas se pueden encontrar en los sedimentos, en la columna de agua, y en el propio organismo. Sin embargo, algunos de estos microorganismos son patógenos facultativos y pueden llegar a causar una enfermedad infecciosa (Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018).

Además, existen otros factores que pueden afectar la microbiota de un sistema, por ejemplo en las etapas tempranas del desarrollo en especial de peces, es necesaria la implementación de alimento vivo como fuente principal de alimento, siendo el empleo de rotíferos marinos como *B. plicatilis* la opción predilecta. Sin embargo, la producción de alimento vivo a gran escala donde se manejan altas densidades y un exceso de materia orgánica en el medio, lleva consigo el aumento de la carga bacteriana propia de los sistemas. Esta carga bacteriana que por lo general se conforma de bacterias oportunistas, se transfiere a los sistemas de cultivo larval de peces provocando que aumenten las posibilidades de disminución de crecimiento y mortalidad en estas primeras etapas de crecimiento (Stefanakis *et al.*, 2014).

Debido a esta constante interacción entre bacterias de distintas especies, es indispensable que los organismos mantengan una homeostasis, ya que de no ser así, puede suscitarse un desequilibrio que propicie la aparición de una patología bacteriana, gracias a bacterias oportunistas, factores predisponentes, o exposición a largos periodos de estrés (Álvarez *et al.*, 2017). Esta aparición de enfermedades, puede provocar grandes mortalidades, lo cual, se traduce en pérdidas económicas importantes si no se cuenta con un buen programa de detección y manejo de los organismos.

Inevitablemente, las enfermedades bacterianas se presentan en todo tipo de sistema de cultivo en piscicultura, ostricultura o camaronicultura, tanto en especies de agua dulce como en aquellas de agua de mar. Entre los tipos de bacterias que destacan en la industria acuícola de manera general, son las bacterias de tipo *Aeromonas* y del tipo *Myxobacteria*, así como las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y aquellas del género *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Hemophilus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Vibrio* (Millán y Pérez, 2017). En la piscicultura, los tres principales géneros bacterianos asociados con cuadros clínicos son *Aeromonas*, *Streptococcus* y *Vibrio* (De-Souza-Gazal *et al.*, 2020).

Por otro lado, en la industria de la camaronicultura, el efecto de bacterias infecciosas, no puede ser distinto, ya que en esta industria afectan bacterias del género *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* (Sivakamavalli *et al.*, 2021). Sin embargo, el género que se ha reportado afecta en mayor medida a la camaronicultura es *Vibrio*, en especial *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, y *V. cholerae* (El-Saadony *et al.*, 2022).

En el cultivo de moluscos, en especial moluscos bivalvos, también existen bacterias patógenas, algunas de las principales especies que afectan son *Nocardia crassostreae*, *Roseovarius crassostreae* y aquellas bacterias del género *Vibrio*, como *V. coralliilyticus*, *V. harveyi* *V. alginolyticus*, todas causando graves patologías. Así mismo, para distintas especies de abulón (molusco gasterópodo) la principal bacteria que produce enfermedades es de tipo rickettsia y es llamada *Xenohalotis californiensis* (Travers *et al.*, 2015).

La acuicultura es una actividad que no se encuentra exenta de amenazas, una de las más importantes, son las enfermedades provocadas por bacterias, convirtiéndose en un factor limitante para el desarrollo de sistemas de cultivo exitosos. Dentro de las principales enfermedades que afectan a todos los cultivos en general y como se pudo apreciar anteriormente, se encuentran las vibriosis, esta enfermedad se produce por diversas especies de vibrios y producen grandes pérdidas económicas para la industria, debido a las mortalidades que provoca (Rameshkumar *et al.*, 2017).

1.1.2.1 Género *Vibrio*

Como se ha mencionado anteriormente, una de las bacterias que más afectan a todos los cultivos acuícolas en general, son las del género *Vibrio*, estas son bacterias Gram negativas no formadoras de esporas. Su estructura es en forma de bacilos pequeños, delgados, de forma recta o curva. Son móviles por flagelos polares, en Figura 3 se observa la estructura de *Vibrio* sp., en donde se destaca la presencia de un flagelo (Arévalo *et al.*, 2003).



Figura 3.- Fotografía de microscopio electrónico de una célula de *Vibrio* sp. Técnica de sombreado (15,000 X) (Arévalo *et al.*, 2003)

El género *Vibrio* forma parte de la microbiota marina, con una extensa distribución y densidad, en especial en sistemas costeros (Muñoz *et al.*, 2012) y se presenta comúnmente en sistemas de cultivo de algunas especies acuícolas, dentro de las que destacan los cultivos de camarón. Existe una amplia variedad de especies del género *Vibrio* que tienen potencial patógeno para organismos acuícolas y que a su vez producen enfermedades graves, algunas de las especies son *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. coralliilyticus*, *V. harveyi*, entre otras (Rosado-Salazar, 2018).

Las bacterias del género *Vibrio*, son una problemática en el área acuícola en especial para la camaronicultura, ya que se ha reportado su incidencia como bacterias oportunistas que afectan mayormente en las etapas tempranas de larvicultura de camarón, provocando retardo en el crecimiento. Además, estas infecciones, producen mortalidades en la etapa juvenil y de engorda, afectando particularmente en el hepatopáncreas de éstos y causando efectos en su comportamiento. Además, las especies del género *Vibrio*, han reportado ser el agente detonante del síndrome de “bolitas blancas”, la enfermedad del camarón manchado o “brown spot disease”, vibriosis sistémica, entre otras patologías (Gómez-Gil *et al.*, 2001).

Por otro lado, en una de las especies de moluscos más cultivadas en todo el mundo, *Crassostrea gigas*, también se ha reportado la presencia de episodios de mortalidad masiva. Gracias a investigaciones recientes se ha asociado a bacterias del género *Vibrio*, como causante de estas afecciones, especialmente en organismos de engorda en épocas de mayor exposición a temperaturas (25°C). Particularmente la especie *V. alginolyticus*, fue reportada como la causante de mortalidad masiva en China en un cultivo de *C. gigas*, convirtiéndose en un problema a largo plazo en la ostricultura de China, mayor productor mundial de ostras (Ben *et al.*, 2021).

En el área de maricultura, *V. alginolyticus* también se hace presente produciendo afecciones en variadas especies de peces que se cultivan bajo este sistema. *V. alginolyticus* es causante de mortalidades masivas, no solo en sistemas cerrados de producción, sino que además en sistemas abiertos. En el cultivo de cobia, se han

registrado brotes de vibriosis que producen un cuadro clínico con signos como hemorragias, ulceraciones en la piel, coloración oscura en piel y la acumulación de fluido en la cavidad peritoneal (Rameshkumar *et al.*, 2017).

1.1.3.3 *V. alginolyticus*

V. alginolyticus es una especie que se presenta en la mayor parte de los sistemas de cultivo acuícola, provocando enfermedades importantes, sin embargo, esta especie también afecta a seres humanos causando infecciones gastrointestinales y extraintestinales. En especial se le asocian infecciones sobre todo en tejidos blandos como conjuntivitis, peritonitis, otitis, infecciones en heridas y quemaduras, además se le ha atribuido como causante de gastroenteritis (Gil-Quintero, 2005).

De manera general, el modo en que los humanos nos contagiamos de estas infecciones, es por exponernos al medio marino con heridas abiertas o por consumir productos acuícolas contaminados. Debido a esto, se considera que *V. alginolyticus* además de ser un agente infeccioso de vital importancia en la industria acuícola, representa también un riesgo para la salud humana (Gil-Quintero, 2005).

1.1.3 Bacterias de importancia en salud humana

1.1.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*), es una bacteria tipo bacilo Gram negativo, la cual se distribuye principalmente en la microbiota humana, una fotografía de la especie, se muestra en Figura 4. Esta especie produce enfermedades infecciosas importantes en humanos, como son del tipo diarrea y entéricas. Principalmente la transmisión de esta bacteria es por medio de alimentos contaminados y por entornos de poca higiene en general. Al ser un patógeno que causa diarreas, es un importante agente infeccioso en países en desarrollo y representa un importante foco de atención en el ámbito de salud humana (Cánata *et al.*, 2016).

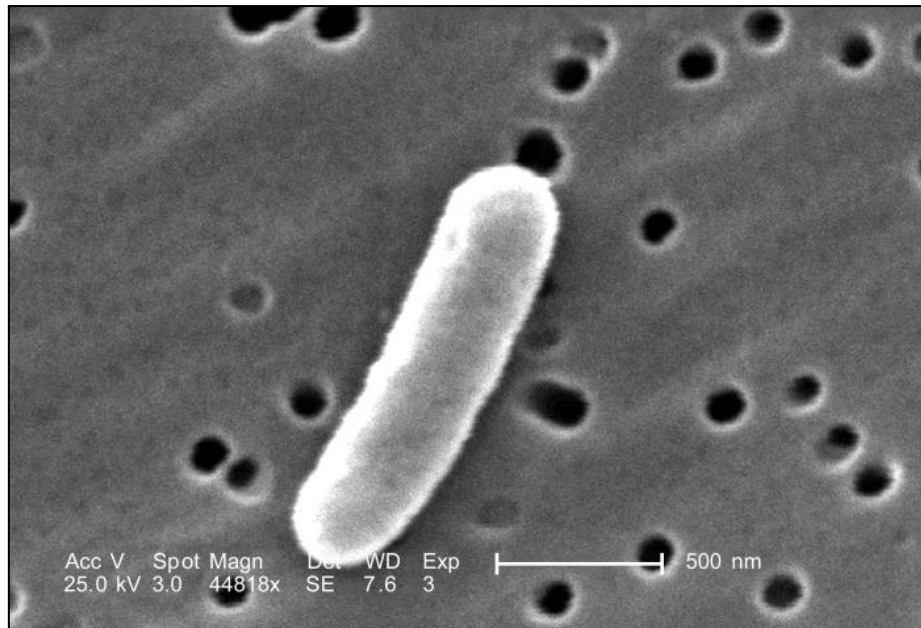


Figura 4.- Fotografía de microscopio electrónico de una célula de *E. coli* (44,818 X) (Haney, 2008).

Gracias a su distribución en el intestino de seres humanos y otros organismos como el ganado vacuno, porcino y de aves de corral, *E. coli* es una especie ampliamente utilizada como indicador de contaminación fecal en alimentos y muestras ambientales. Cuando este tipo de contaminación fecal llega al medio acuático y presentándose las condiciones idóneas, *E. coli* puede ser identificada en la microbiota de organismos acuícolas, los cuales a su vez, llegan a afectar al consumidor final que son los humanos (De-Souza-Gazal *et al.*, 2020).

Entendemos que *E. coli* se transmite por el contacto de las heces con el agua y los alimentos, los organismos acuícolas al estar inmersos en el medio acuático son susceptibles a esta bacteria. *E. coli* provoca una enfermedad para los seres humanos cuando los productos pesqueros contaminados no se preparan de forma adecuada y son manipulados sin tener en cuenta cuestiones de higiene e inocuidad (Rodríguez *et al.*, 2014).

1.1.3.2 *Bacillus cereus*

La bacteria *Bacillus cereus* (*B. cereus*), tiene forma de bacilo y es tipo Gram positiva, su distribución es amplia, principalmente en el suelo, agua de mar, agua dulce, alimentos, etc. En la Figura 5 se aprecia la estructura de este microorganismo. *B. cereus* es un importante patógeno oportunista que produce enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), como son bacteriemia, infecciones del sistema respiratorio y nervioso, meningitis, entre otras. *B. cereus* tiene un efecto negativo en la salud humana debido a las toxinas que produce, dichas toxinas llegan a los humanos principalmente por el consumo de alimentos contaminados (Cortés-Sánchez *et al.*, 2017).

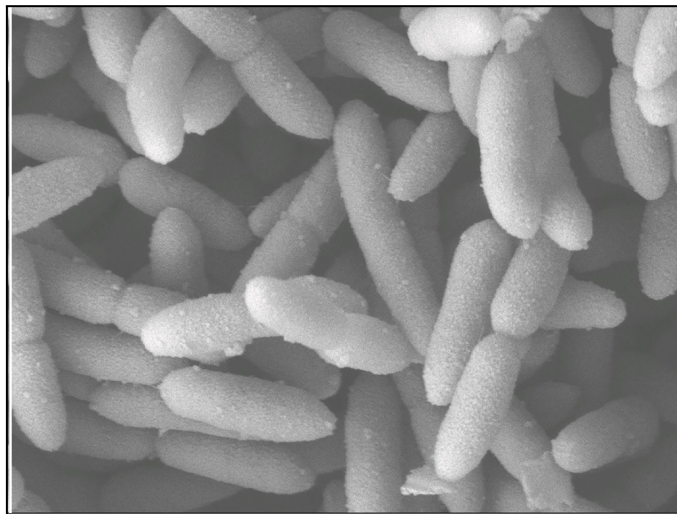


Figura 5.- Fotografía de microscopio electrónico de barrido de una célula de *B. cereus* (20,000 X) (Jiang *et al.*, 2019).

A pesar de que este microorganismo puede ser un patógeno para los seres humanos, en el medio ambiente marino *B. cereus* forma parte de la microbiota de organismos acuícolas. De este modo, algunas especies del género *Bacillus*, incluido *B. cereus*, se ha implementado como un probiótico para organismos en cultivo. Este uso como probiótico, por ejemplo en cultivo de camarón, ayuda a estimular la respuesta inmune y la supervivencia de los organismos, ya que por lo general, estas bacterias compiten con otros patógenos por el aprovechamiento de nutrientes y espacio y algunos pueden producir compuestos antagónicos para combatir a los patógenos (El-Saadony *et al.*, 2022).

1.1.4 Problemática actual para el control de enfermedades bacterianas en acuicultura

Actualmente la acuicultura es una de las actividades de producción primaria que más impacto tienen en la producción de alimentos de consumo humano. Sin embargo, debido a la creciente necesidad de proteína de origen animal, las empresas dedicadas a la producción acuícola han optado por la realización de cultivos hiperintensivos. Este tipo de cultivos provoca que los organismos presenten niveles de estrés que conduce a la reducción del crecimiento, inmunosupresión y susceptibilidad a enfermedades infecciosas, lo que se traduce en importantes pérdidas económicas para la industria (Omitoyin *et al.*, 2019).

Gracias a la creciente incidencia de enfermedades bacterianas en la industria acuícola, se ha optado por la implementación de antibióticos de amplio espectro como tratamiento contrarrestante a estas afecciones que presentan los organismos en cultivo. El uso de antibióticos es generalmente como medida correctiva una vez que los organismos presentan síntomas de una enfermedad, sin embargo, estos también son empleados como medida profiláctica en organismos asintomáticos. Algunos de los antibióticos de amplio espectro que más se emplean en acuicultura son, la oxitetraciclina, florfenicol, ciprofloxacino, enrofloxacino, entre otros (Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018).

De este modo, es necesario tener en cuenta los efectos negativos que produce o puede producir el uso desmedido y sin fundamentos de antibióticos en acuicultura. Uno de ellos puede ser el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, también la bioacumulación de residuos de fármacos y el impacto de los antibióticos liberados en el medio ambiente. Todos estos efectos han llevado a restringir o en algunos casos prohibir el uso de ciertos antibióticos en el cultivo de animales destinados a la industria alimenticia, como es el caso de la acuicultura comercial (Omitoyin *et al.*, 2019).

Debido a estos efectos y las implicaciones en salud humana y salud ambiental, se han creado regulaciones en cuanto al uso de los antibióticos alrededor del mundo.

Gracias a la gravedad de los posibles efectos producidos por estos fármacos, la Organización Mundial de la Salud (Por sus siglas OMS) ha desarrollado el Plan de Acción Mundial sobre Resistencia a los antimicrobianos. A este plan, se sumó la Unión Europea, el Ministerio de Salud y Servicios Sociales noruego, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Por sus siglas en inglés, FDA), entre otros. Además, en las regulaciones y normas escritas, se tiene como un importante objetivo, el uso de nuevas alternativas a los antibióticos y el aumento de la investigación para la creación de nuevos fármacos (Vivanco-Font, 2021).

1.1.4.1 Antibióticos empleados en acuicultura

El uso de antibióticos en acuicultura, es una actividad que se encuentra regulada de manera específica, para cada uno de los países donde esta actividad se lleva a cabo. A pesar de tener restricciones distintas, todos tienen en común los parámetros que se toman en cuenta para determinar si el uso del antibiótico en cuestión es aprobado o no, uno de estos es el nivel de límite máximo de residuos (Por sus siglas en inglés MRLs), otro punto a tener en cuenta es la resistencia bacteriana que estos puede producir, así como la toxicidad de los mismos hacia los organismos (De-Souza-Gazal et al., 2020).

Las distintas regulaciones que se tienen alrededor del mundo respecto al uso de antibióticos en acuicultura, ha llevado a determinar qué fármacos se emplean en cada país, produciendo diferencias significativas en cada uno de ellos. Por ejemplo, en la unión europea se emplean antibióticos como la oxitetraciclina, amoxicilina, quinolonas de primera generación, sulfonamidas y florfenicol. Por otro lado, en países asiáticos donde las regulaciones son más laxas, se tienen aprobados alrededor de 36 antibióticos distintos. A diferencia de los anteriores, en Estados Unidos, solo se han aprobado cinco antibióticos, entre ellos la oxitetraciclina, florfenicol y sulfamideracina. Por último y a modo de comparación en países como Brasil, debido a las regulaciones establecidas, solo se pueden emplear el florfenicol y la oxitetraciclina en acuicultura (De-Souza-Gazal *et al.*, 2020).

Como se ha mencionado anteriormente, los antibióticos, son extensamente utilizados en la industria acuícola de manera distinta para cada país que se tome en cuenta. Sin embargo, algunos de los más empleados a nivel mundial son oxitetraciclina (OTC), florfenicol (FFC), ciprofloxacino (CIPRO) y enrofloxacino (ENRO) (Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018); cada uno de estos antibióticos, tiene características específicas, como son su origen de síntesis, el tipo de aplicación, sus mecanismos de acción, dosis empleada y tiempo de tratamiento, entre otras especificaciones. En la Tabla I se describen detalladamente las características de cada uno de los antibióticos que más se emplean en acuicultura.

Tabla I.- Características de antibióticos empleados en acuicultura. Modificado de (Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018).

Antibiótico	Origen	Tipo de antibiótico	Mecanismo de acción	Dosis (mg/kg de biomasa)	Duración terapia (días)	Resistencia bacteriana
Oxitetraciclina (OTC)	Sintetizada por bacterias del género <i>Streptomyces</i> .	Amplio espectro	Inhibición de la síntesis proteica.	120-240	7-12	Si, por medio de la expresión de bombas de eflujo, la inactivación enzimática del antibiótico y la expresión de proteínas TET (del inglés ten-eleven translocation).
Florfenicol (FFC)	Derivado del tiamfenicol	Bacteriostático de amplio espectro	Bloqueo de la subunidad ribosómica 50S	50-80	7-12	Si, gracias a mecanismos de eflujo como mutaciones a nivel ribosómico

Ciprofloxacino (CIPRO)	Pertenece a la segunda generación de quinolonas	Amplio espectro	Inhibición de la ADN girasa y la Topoisomerasa IV	10-15	7-12	Si, produce alteraciones en enzimas diana. También alteraciones en la expresión de las porinas de entrada. La sobreexpresión de genes que codifican proteínas de membrana.
Enrofloxacin (ENRO)	Es una prodroga que lleva a la formación de CIPRO					

Este tipo de antibióticos que son permitidos en la acuicultura, son suministrados a través de su incorporación en el alimento, además de que algunas veces se añaden en el agua a modo de baños y por último, se han utilizado técnicas como administración vía muscular por medio de inyecciones (De-Souza-Gazal *et al.*, 2020).

1.1.4.2 Alternativas terapéuticas que se utilizan en acuicultura

Debido a los efectos perjudiciales que produce el uso de antibióticos, ha provocado que su uso concierna a la población, ya que puede ser una amenaza a la salud pública. Así, el uso de antibióticos en alimentos para organismos en cultivo, ha intentado ser reemplazado por otras alternativas, algunas de las que se han probado incluyen probióticos, péptidos antimicrobianos, ácidos orgánicos, enzimas y compuestos fitogénicos (Yang *et al.*, 2015).

Una de las principales alternativas por la cual se apuesta es el uso de fitogénicos, que son productos naturales como aceites esenciales extraídos de hierbas o plantas. Esto se debe a que gracias a su composición hay menos probabilidad de que se desarrollen cepas bacterianas resistentes, al no tratarse de una molécula aislada sino, una mezcla de compuestos. Además de que en cuanto a opinión

pública, el uso de fitogénicos es mayormente aceptado que el uso por ejemplo de antibióticos comerciales de origen sintético como parte del proceso de producción de organismos (Stefanakis *et al.*, 2014).

De este modo, en acuicultura, los extractos de plantas se han implementado para controlar o reducir infecciones y además, reducir las mortalidades cuando se presentan este tipo de brotes infecciosos. Por ejemplo, en la camaronicultura se han empleado extractos de ajo para tratar vibriosis, también los extractos de *Azadirachta indica* actúan como antibiótico para tratar la infección bacteriana de *Citrobacter freundii* en tilapia (Castro *et al.*, 2008), entre muchos otros. La mayoría de los extractos de plantas que se han probado actúan como antibióticos debido a que fortalecen el sistema inmunológico de los organismos para prevenir las enfermedades (Sivakamavalli *et al.*, 2021).

La aplicación de estas alternativas terapéuticas, puede ser de distintas formas, sin embargo, una que destaca es implementar los extractos como un ingrediente más de los alimentos formulados que se emplean. Por ejemplo, los aceites esenciales de orégano, se han empleado como parte de los ingredientes en piensos, sin embargo, también se han usado como agentes terapéuticos contra distintos tipos de parásitos (Stefanakis *et al.*, 2014).

Sin embargo, el uso de fitogénicos en acuicultura tiene también sus obstáculos, como son los posibles efectos secundarios en los organismos que se desconozcan, las barreras en cuanto a normativa y por último, la relación costo beneficio de su uso. A pesar de estos inconvenientes, la investigación de nuevos fitogénicos que sustituyan antibióticos en las dietas animales es un área de estudio que se ha impulsado en los últimos años (Yang *et al.*, 2015).

1.1.5 Los fitogénicos

Los fitogénicos son compuestos naturales bioactivos derivados del metabolismo secundario de numerosas plantas como hierbas, arbustos y especias. Principalmente, estos compuestos bioactivos se obtienen a partir de la extracción de aceites esenciales con distintas partes de plantas, pero existen otras maneras de obtenerlos (Yang *et al.*, 2015).

Los fitogénicos cumplen un papel importante en el tratamiento de enfermedades así como en algunos casos la prevención de las mismas, en especial para aquellas enfermedades que afectan a la salud humana. Se sabe que las plantas poseen una amplia variedad de fitogénicos, algunos de los principales grupos de compuestos que se conocen son los taninos, terpenoides, alcaloides, flavonoides y glucósidos (Zuhaira *et al.*, 2018).

En cuanto a sus usos, es de conocimiento que los distintos grupos de fitogénicos tienen un sin fin de propiedades que han sido descubiertas a través de los años, algunas de las más significativas, son sus propiedades antimicrobianas, antivirales, antifúngicas, antioxidantes, entre otras. Estas propiedades, han hecho que los fitogénicos sean empleados en la industria farmacéutica (Yang *et al.*, 2015). Existe una amplia gama de compuestos fitogénicos, algunos de estos compuestos, así como su uso, pueden observarse en la Figura 6.



Figura 6.- Ejemplificación de la amplia gama de fitogénicos que existen (DELACON, 2021).

De manera específica, los fitogénicos como antimicrobianos, son una alternativa que se ha empleado como medida terapéutica contra infecciones bacterianas. En cuanto al modo de acción en el caso de los aceites esenciales y sus derivados, la actividad antimicrobiana se debe a que estos afectan a la pared celular y el citoplasma de las células bacterianas, modificando la morfología de los mismos. De manera más específica, los aceites esenciales aumentan la permeabilidad de las membranas bacterianas provocando la fuga de componentes celulares produciendo la muerte de las bacterias (Yang *et al.*, 2015).

1.1.5.1 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de sustancias naturales considerados productos naturales, estas fueron descubiertas por el Dr- Albert Szent-Gyorgi, este nombró a este grupo de sustancias como vitamina "P", mencionando que éstos favorecen la función de la vitamina "C" ya que mejoran su absorción y la protegen de la oxidación, este gran descubrimiento, lo hizo acreedor del premio Nobel en Bioquímica (Martinez, 2020).

De manera general, estas sustancias son de origen biosintético y son metabolitos secundarios vegetales, se presentan en las flores, hojas y frutos de plantas, y estas son las responsables, entre otros compuestos, de darle el color amarillo, naranja, rojo, azul y violeta a las plantas (Martinez, 2020). La estructura química de estas moléculas es muy específica, y está compuesta por dos anillos bencénicos o aromáticos que están unidos por una cadena de tres carbonos, en la Figura 7 se observa esta estructura general incluyendo la estructura de la quercetina como ejemplo de un flavonoide.

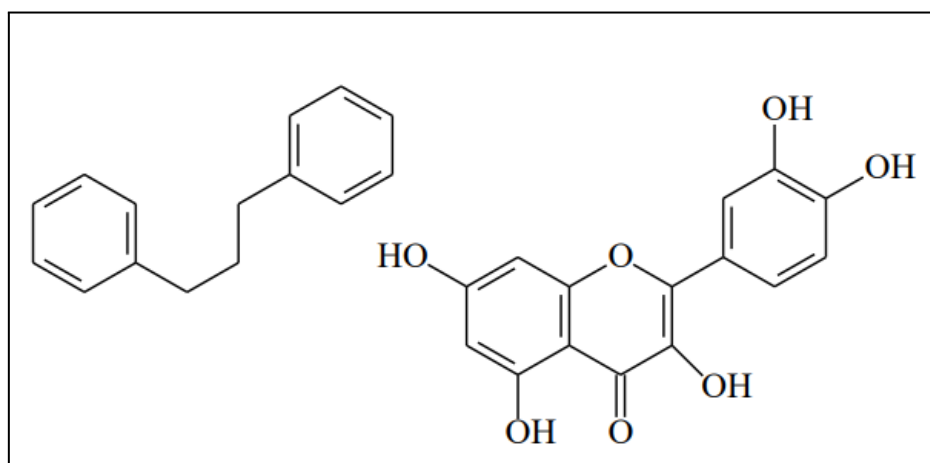


Figura 7.- Estructura básica de los flavonoides (izquierda), estructura de la quercetina (derecha). Recuperado de (Martinez, 2020).

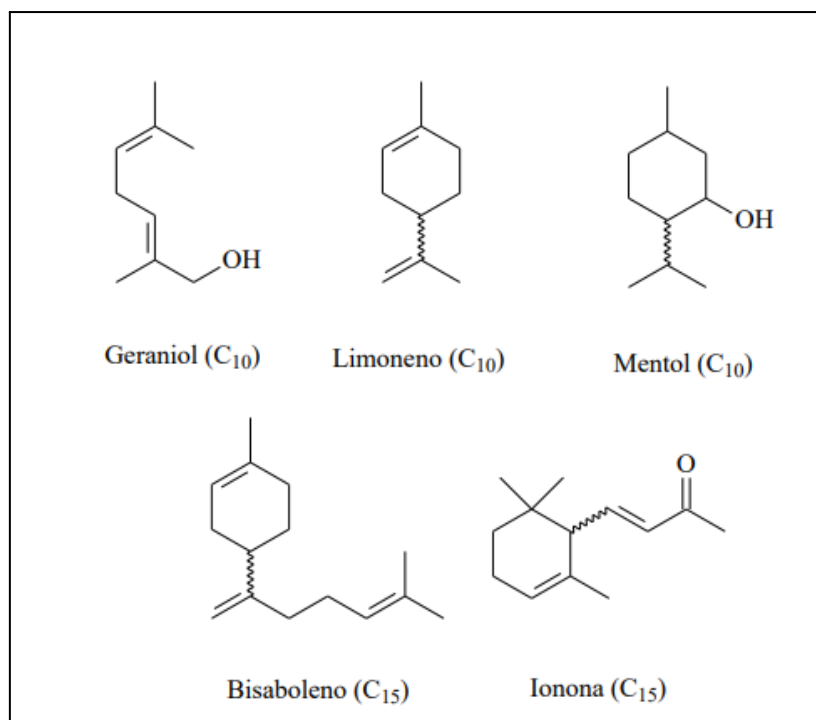
Este grupo de compuestos es amplio, teniendo alrededor de 9 mil flavonoides naturales y se clasifican por ende en varios grupos, algunos de ellos son las flavonas, catequinas, chalconas, flavonoles, entre otros. Los flavonoides en general, son un grupo de sustancias que son un objeto de investigación constante en la

química de productos naturales, gracias a las propiedades que estas poseen, las cuales van desde propiedades antioxidantes, anti cáncer, anti diabetes, antiinflamatorias, contra alzheimer, antibacterianas, entre otras (Martinez, 2020). Además, una de las propiedades más destacables de los flavonoides, es su capacidad antimicrobiana, la cual ha sido probada con algunos tipos de bacterias en ensayos *in vitro* y se han obtenido resultados alentadores (Zuhaira *et al.*, 2018).

Los usos como antimicrobiano que tienen este tipo de moléculas se debe a sus distintos mecanismos de acción, los cuales son distintos a los mecanismos de la mayoría de los fármacos, además son amplios y varían según el tipo de flavonoide. Una de los principales mecanismos de acción es la perturbación de la membrana celular de las bacterias, estas perturbaciones van desde la modificación de la estructura de la membrana, su ruptura, el aumento de la permeabilidad, entre otros. Además, otros modos de acción menos conocidos, son la inhibición la formación de biofilm (Disminución de adhesión bacteriana, motilidad y quorum sensing) y la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Inhibidores de topoisomerasa) (Górniak *et al.*, 2019).

1.1.5.2 Terpenoides

Otro de los grandes grupos de compuestos que pertenecen a los productos naturales, son los conocidos como terpenoides, estos tienen la característica de ser de bajo peso molecular como es el caso de los monoterpenos y sesquiterpenos, los cuales se encuentran presentes en los aceites esenciales de plantas y en fragancias. Estos se encuentran específicamente en las hojas, las raíces, en los frutos, en las flores o en los tallos de las plantas. En cuanto a su estructura, los monoterpenos y sesquiterpenos, son terpenos de 10 y 15 átomos respectivamente (Martinez, 2020), en la Figura 8 se observa la estructura química de estos, siendo el mentol, limoneno y geraniol pertenecientes al grupo de monoterpenos. Por otro lado, el bisaboleno y la ionona representan a los sesquiterpenos.



**Figura 8.- Estructura química de los mono y sesquiterpenos naturales.
Recuperado de (Martinez, 2020).**

Estos terpenoides, conocidos también como aceites esenciales, tienen un uso principalmente en la industria cosmética y farmacéutica. Algunos de los usos farmacéuticos que se les da a este tipo de compuestos son como analgésico, antiséptico, antibacterial, como tratamiento para hiperglucemias, diurético (Martinez, 2020), antifúngico, insecticida, antiviral y antioxidante (Soliman *et al.*, 2016).

A pesar de que el principal uso de estos compuestos sea por sus cualidades aromáticas en la industria cosmética, se ha reportado que estos también poseen un importante potencial como agentes inhibidores contra distintas especies de bacterias (Zuhaira *et al.*, 2018). Así, gracias a esto, se ha buscado la implementación de aceites esenciales como posibles remedios alternativos para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas que perjudican no solo a la salud humana, sino de otros animales (Soliman *et al.*, 2016).

Todos los compuestos bioactivos derivados de plantas, se encuentran distribuidos en la naturaleza en distintas especies. La composición de estos, varía según el origen de la planta, el tipo de especie, las condiciones climáticas en las que esta

crece etc. Estos fitogénicos específicos pueden además, encontrarse en diferentes especies de plantas, por ejemplo el timol, se encuentra en el tomillo y el orégano (Lacombe, 2021). Y de igual manera existen organismos que poseen una amplia variedad de compuestos bioactivos, como son la planta del guayabo (*Psidium guajava*), la cual es una planta rica en fitogénicos como los flavonoides, terpenoides, saponinas, entre otros (Afroze y Hossain, 2015).

1.1.6 *Psidium guajava*

A través de la historia, nuestros antepasados han utilizado lo que la naturaleza les brinda para satisfacer sus necesidades. Una actividad milenaria que se mantiene hoy en día es la medicina tradicional, en esta, se implementan materiales botánicos como son las plantas y hierbas para tratar enfermedades. Estas plantas medicinales como se les conoce popularmente, deben sus efectos a sus propios componentes bioactivos. Una de las plantas medicinales que es mundialmente reconocida por sus cientos de aplicaciones es la guayaba, desde sus hojas hasta su fruto y raíces, se han empleado en la medicina tradicional, como un antiinflamatorio, antidiarreico y muchos otros usos farmacológicos (Naseer *et al.*, 2018).

1.1.6.1 Características de la especie *Psiduim guajava*

P. guajava también conocida como guayaba, pertenece a la familia de las Myrtaceae. Es un árbol perenne de 5 a 10 metros de altura, con un tronco con textura lisa de color rojizo. Sus hojas tienen una forma elíptica con un promedio de tres a cinco centímetros de ancho y de 4-12 cm de longitud, presentan un color verde-grisáceo por el haz y un color verde claro por el envés. Este tipo de hoja presenta de 12 a 16 nervios laterales que parten de una venación central prominente (Rivera-Arce *et al.*, 2003), en la Figura 9 se puede observar la apariencia de estas hojas con las partes antes mencionadas señaladas.

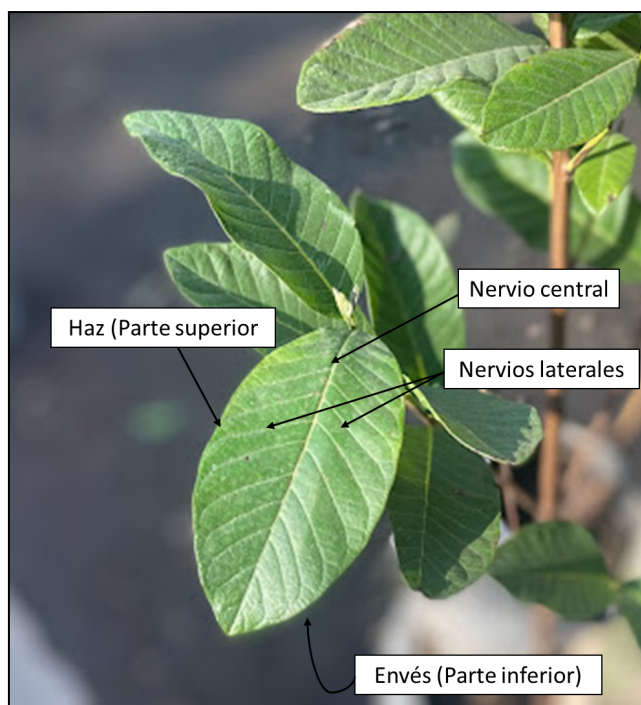


Figura 9.- Apariencia de una hoja de *Psidium guajava* (Castro-Murrieta, 2022).

Esta especie es originaria de Mesoamérica, y su distribución va desde el sur de México hasta el norte de Sudamérica, sin embargo, hoy en día se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de los países pertenecientes a las regiones tropicales y de temperaturas cálidas del mundo. Algunos de los países donde más es consumida y producida esta planta, son China, Filipinas, India, México, Brasil, entre otros (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017).

1.1.6.2 Usos y aplicaciones de la hoja de árbol de guayaba *Psidium guajava*

Desde tiempos ancestrales y hasta hoy en día, el uso de plantas medicinales ha estado presente en la medicina tradicional y popular en todo el mundo. Esta práctica representa para algunas secciones de la población, la principal fuente de atención sanitaria disponible gracias a su accesibilidad y aceptación. Así, alrededor de todo el mundo, y especialmente en los países en vías de desarrollo, las plantas medicinales, como es el caso de las hojas de árbol de guayaba han sido empleadas para tratar diversas afecciones a la salud. Por lo general las hojas del guayabo son consumidas en forma de infusión, sin embargo, también son comunes sus usos

tópicos, con la hoja hervida o cruda, según el uso que se le pretenda dar (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017).

El uso fitoterapéutico de las hojas de *P. guajava*, reside en su rica variedad de componentes benéficos, que poseen potencial antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, antihistamínico, etc. Gracias a estos componentes, *P. guajava* se emplea ampliamente en la medicina popular para tratar diversas enfermedades, como pueden ser malaria, gastroenteritis, vómitos, diarrea, disentería, heridas, úlceras, dolor de muelas, tos, dolor de garganta, gingivitis entre muchas otras (Zuhaira *et al.*, 2018). En la Figura 10 se muestra un diagrama resaltando los usos más comunes en medicina popular que se le da a las hojas de árbol de guayaba, en los países que más producen esta planta.

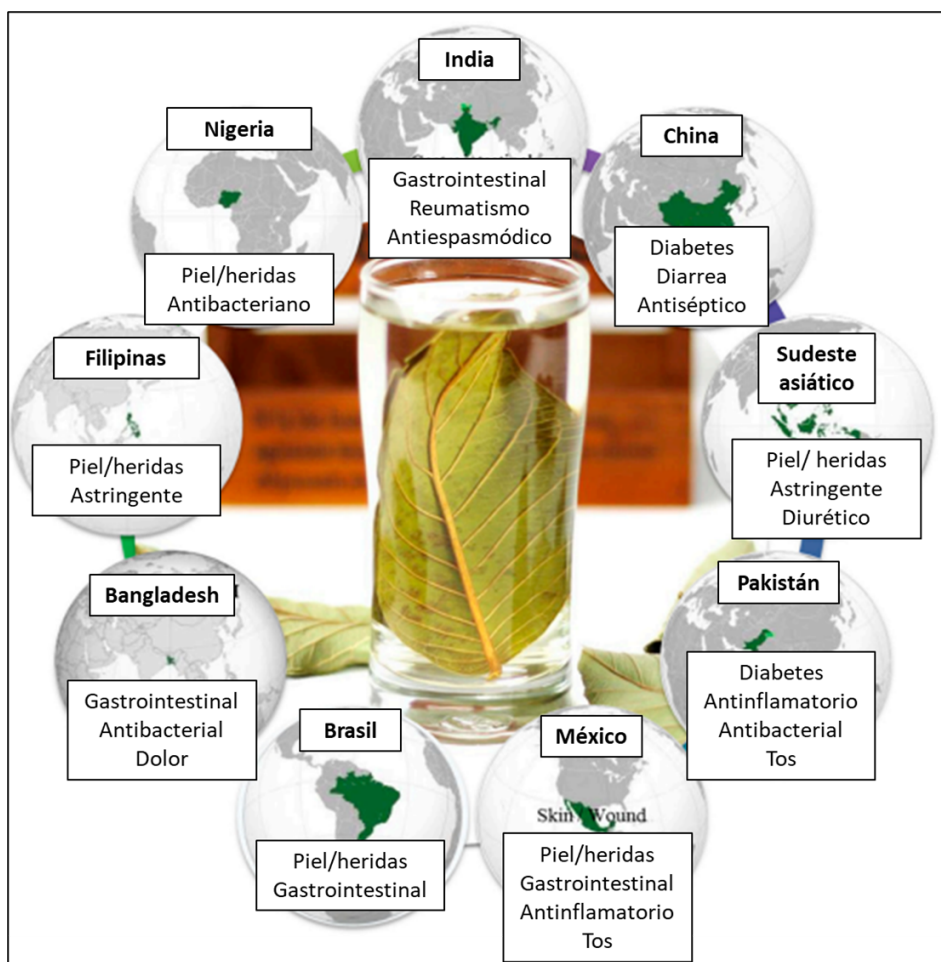


Figura 10.- Usos de *P. guajava* en la medicina tradicional de los principales países productores, modificado de (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017).

Además de las afecciones para la que es usada comúnmente esta planta, y gracias a un sin fin de investigación científica, se sabe que *P. guajava* puede además tener otro tipo de propiedades farmacéuticas. Mediante el uso de ensayos *in vitro* e *in vivo*, se ha confirmado a través de los años, que los distintos tipos de extractos elaborados a partir de *P. guajava* tienen efectos contra enfermedades infecciosas y parasíticas, así como enfermedades sanguíneas, del sistema inmunológico, endocrinas y metabólicas, del sistema digestivo y circulatorio, e incluso se ha reportado información sobre las propiedades anticancerígenas que los extractos de esta planta poseen (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017).

1.1.6.2.1 Uso de *P. guajava* como antimicrobiano

Una de las principales propiedades que se le atribuyen a los extractos derivados de las hojas de árbol de guayaba, es su capacidad como antimicrobiano. En función a esto, alrededor de los años, se han realizado distintas pruebas para poder estimar el poder antimicrobiano de estos extractos contra distintas especies bacterianas. Uno de los principales fines por el que se han empleado extractos derivados de esta especie como potencial antimicrobiano es para combatir bacterias patógenas que afectan al ser humano tanto del tipo Gram positivas, como Gram negativas (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017).

Los distintos tipos de extractos elaborados a partir de *P. guajava* como son, extractos acuosos, extractos metanólicos, extractos de tipo aceites esenciales, entre otros, han sido probados contra especies de bacterias que son conocidas por su resistencia a antibióticos, como es el caso de algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *P.aeruginosa*, *Shigella* sp., entre otras (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017). El resultado de estas numerosas pruebas *in vitro* realizadas por distintos autores, se encuentra resumido en la Tabla II, donde se aprecia información pertinente a las metodologías realizadas y sus resultados más significativos.

Tabla II.- Recopilación de pruebas *in vitro* contra agentes infecciosos (Modificado de Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017).

Origen	Método extracción	Bacteria empleada	Ensayo	Principales resultados	Referencia
Arabia saudita	Decocción	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Ensayo de difusión en pozo de agar	Zona de inhibición ≤ 20 mm (200 µL)	(Milyani y Ashy, 2012)
India	Maceración en H ₂ O	<i>V. parahaemolyticus</i>	Ensayo de difusión en pozo de agar	Zona de inhibición ≤ 21 mm (20 mg/mL)	(Chanu <i>et al.</i> , 2011)
Nigeria	Maceración en MeOH	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>Shigella sp.</i>	Ensayo de difusión en pozo de agar	Zona de inhibición ≤ 18 mm (20 mg/mL)	(Chah <i>et al.</i> , 2006)
Bangladesh	Maceración en H ₂ O	<i>V. cholerae</i>	Ensayo de difusión en pozo de agar	CMI= 1250 µg/mL	(Rahim <i>et al.</i> , 2010)
Indonesia	Maceración en EtOH:H ₂ O (30%)	<i>E. coli</i> <i>P. aureginosa</i> <i>S. aureus</i>	Método de difusión de disco de papel	Zona inhibición ≤ 15 mm.	(Mailoa <i>et al.</i> , 2014)

Los resultados de estas pruebas han sido alentadores, ya que se ha observado que los distintos extractos tienen un efecto inhibitorio con las bacterias que se han probado. Al analizar algunos de los estudios que se han llevado a cabo para *P. guajava*, de manera particular, se ha demostrado que las bacterias que son de tipo gram-positivo son más susceptibles a los extractos, ya que presentan una mayor zona de inhibición, así como una menor concentración mínima inhibitoria, que aquellas de tipo Gram negativa (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017).

1.1.6.3 Compuestos reportados de las hojas de árbol de guayaba

En los últimos años, y gracias al creciente interés en el área de los productos naturales, se ha exhortado el estudio de los componentes que poseen distintas plantas con uso potencial como fitogénico. De este modo, los extractos elaborados a partir de la hoja de árbol de guayaba, han sido analizados para conocer su composición química, gracias a sus variadas propiedades y a los efectos benéficos que posee esta planta (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017).

De manera general, las hojas de árbol de guayaba, poseen una composición proximal, donde los carbohidratos representan más del 80% de la hoja, mientras que en cuanto a proteínas, grasas, y fibra, este porcentaje disminuye (Okunrobo *et al.*, 2010), se puede observar en Tabla III, un análisis proximal de las hojas de árbol de guayaba.

Tabla III.- Análisis proximal de polvo de hojas de *P. guajava* (Modificado de Okunrobo *et al.*, 2010).

Variable	Contenido (g)
Cenizas	2.80±0.80
Proteínas	2.80±0.60
Fibra	2.70±0.40
Grasa	1.80±0.30
Carbohidratos	88.90±0.70

Por otro lado, los extractos realizados a partir de hoja de *P. guajava*, presentan una amplia variedad de compuestos producto del metabolismo secundario. Estos compuestos conocidos como productos naturales, son utilizados ampliamente en la industria farmacéutica, cosmética y biotecnológica, ya que presentan una importante bioactividad, como antiinflamatorios, antibacterianos, antivirales, etc. Algunos de los productos naturales que se encuentran en estos extractos, especialmente aquellos

de tipo acuosos y metanólicos son alcaloides, flavonoides, saponinas, entre otros (Afroze y Hossain, 2015).

Este tipo de compuestos que se mencionan, se pueden encontrar en distintos tipos de extractos realizados a partir de la hoja de árbol de guayaba, sin embargo, su presencia o proporción dependerá del tipo de metodología que se lleve a cabo para su extracción. Por ejemplo, uno de los principales métodos empleados para *P. guajava*, es la extracción de aceites esenciales. Este tipo de extracto tiene una mayor proporción de compuestos tipo terpenoides, como el limoneno, 8-cineol, β -cariofileno y α -pineno, los cuales poseen una importante bioactividad, por ejemplo, como antimicrobianos (Soliman *et al.*, 2016).

Por otro lado, cuando se habla de extractos de tipo infusiones con el empleo de distintos solventes, se ha reportado la presencia de otro tipo de compuestos conocidos como flavonoides, de los cuales destacan el morin-3-O-lixósido, morin-3-O-arabinósido, quercetina-3-O-arabinósido y quercetina (la estructura de esta última, se puede observar plasmada en la Figura 7). Estos flavonoides encontrados en los extractos de hoja de árbol de guayaba, son conocidos por poseer una actividad antimicrobiana importante, tanto para bacterias de tipo Gram positivas, como para aquellas Gram negativas (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010).

1.2 Justificación

Debido a los efectos negativos que se producen actualmente por el uso desmedido de antibióticos en la industria acuícola, es necesario buscar alternativas terapéuticas y profilácticas que ayuden a combatir a las bacterias que generan infecciones, en especial *Vibrio alginolyticus*, la cual se sabe que afecta a la mayoría de las especies que se cultivan en acuicultura y produce afecciones graves.

Una de las principales líneas de investigación que proponen alternativas al uso de estos fármacos es la industria del desarrollo de fitogénicos que funcionen como antimicrobianos para la industria acuícola. Para proponer un nuevo fitogénico, se toman en cuenta especies de las cuales se tenga conocimiento e información de las propiedades que poseen. En este caso *P. guajava* fue elegida como potencial fuente de moléculas bioactivas que se puedan implementar como antimicrobiano, gracias a la información recopilada de los usos y propiedades de esta planta.

En respuesta a esta demanda de nuevos compuestos y teniendo en cuenta la información presente de *P. guajava* es que se realizó esta investigación, en principio con el fin de realizar distintos extractos a partir de hojas de guayaba, para luego probar su potencial como antimicrobiano contra tres distintos tipos de bacterias, *E. coli*, *B. cereus* y *V. alginolyticus*. Como se ha mencionado anteriormente, *E. coli* y *B. cereus*, representan un importante patógeno para la salud humana, mientras que la intención de probar estos extractos contra *V. alginolyticus* es porque esta especie afecta en gran medida a la acuicultura.

2. Hipótesis

- Los extractos realizados a partir de la hoja de árbol de guayaba (*P. guajava*) presentarán un efecto antimicrobiano contra distintos tipos de bacterias.
- El efecto antimicrobiano del extracto de las hojas de guayaba dependerá del tipo de metodología que se emplee.
- El poder antimicrobiano de los extractos realizados será distinto ante cada especie de bacteria empleada.
- Los extractos de hoja de árbol de guayaba realizados, disminuirán el crecimiento de las bacterias presentes en el cultivo de rotíferos (*B. plicatilis*).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de distintos extractos de hoja de árbol de guayaba contra bacterias patógenas y su aplicación en cultivos de rotíferos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar extractos acuosos de hoja de árbol de guayaba mediante diferentes metodologías de extracción, empleando el material biológico húmedo y seco.
- Determinar el tipo de compuestos presentes en los extractos mediante pruebas fitoquímicas para saponinas, flavonoides y terpenoides.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos e identificar el extracto con mayor actividad antimicrobiana con el método de difusión en disco contra las bacterias *B. cereus*, *V. alginolyticus* y *E. coli*.
- Establecer la CMI de los extractos que tengan un mejor desempeño en las pruebas de antibiograma.
- Probar la actividad biológica del mejor extracto mediante un ensayo de evaluación de sobrevivencia de rotíferos al exponerlos al extracto.
- Evaluar la actividad biológica del mejor extracto mediante un ensayo de disminución de carga bacteriana en rotíferos por tiempos de exposición al extracto.

4. Metodología

4.1 Material biológico

4.1.1 Recolección de muestras

La recolección de material biológico (hojas de *P. guajava*) se llevó a cabo en el municipio de Ensenada, Baja California. La colecta fue tomada de un árbol de guayaba identificado como sano y joven. Las hojas se recolectaron en fresco y se seleccionaron teniendo en cuenta que no presentaran daños mecánicos o biológicos, obteniendo aproximadamente 500 gramos de hojas.

Una vez realizado el proceso, se procedió a separar las hojas de los tallos y ramas adheridas a estas, se realizaron cuatro lavados utilizando agua corriente, frotándolas unas con otras para eliminar la mayor parte de la suciedad y polvo. Una vez enjuagadas y escurridas, se realizó una segunda selección, donde se tomaron las hojas más grandes y brillantes que no presentaron señales de daños biológicos u oxidación.

Después de la segunda selección, las hojas fueron desinfectadas con etanol de 70° utilizando un algodón húmedo para frotar las hojas y eliminar así el polvo y desechos adheridos a las hojas. Después de este paso, se secaron al aire para evaporar los residuos de etanol durante 30 minutos. Una vez secas y desinfectadas las hojas se pesaron con ayuda de una balanza y se separaron en tres bolsas tipo ziploc. Estas bolsas se etiquetaron con el peso, así como su fecha de colecta y se mantuvieron en un congelador a -4°C hasta su posterior uso.

4.1.2 Procesamiento del material biológico

Una vez recolectadas las hojas de guayaba, se tomó una parte de estas (250 g) y se sometieron a un proceso de secado por medio de liofilización. Para liofilizarlas, se utilizó un liofilizador marca LABCONCO, modelo FreeZone 2.5 el cual se mantuvo a 0.370 mBar de presión y a una temperatura de -104 ° C. Las muestras se mantuvieron bajo estas condiciones por 24 horas o hasta tener sequedad absoluta.

Después de liofilizarlas, una parte del material biológico fue procesado y pulverizado (64 g), para hacerlo se utilizó una procesadora de alimentos. La muestra pulverizada se pesó y colocó en bolsas ziploc y fue almacenada en oscuridad para su posterior uso.

Por otro lado, una parte del material biológico se mantuvo preservado en congelación, de manera fresca, ya que estos se utilizaron posteriormente para los procesos de extracción que implican el uso de hojas frescas o húmedas.

4.2 Preparación de extractos

4.2.1 Extracción acuosa caliente de hoja seca (EHS)

Para llevar a cabo esta extracción se siguió la metodología propuesta por Zuhaira y colaboradores (2018). Se tomó un total de 20 g de polvo de hojas secas, estas se disolvieron en 100 mL de agua destilada caliente (70°C) en un matraz cónico de 250 ml y se llevaron a ebullición (100°C), manteniendo esta temperatura durante 30 minutos y con agitación constante (100 RPM). Seguido, la solución resultante se resguardó en refrigeración y oscuridad durante 24 horas.

Después de estar en refrigeración, la muestra pasó por un proceso de filtración utilizando papel de filtro Whatman n. ° 1 estéril, con ayuda de un matraz Kitazato de 250 mL y una bomba de vacío. La solución resultante se colocó en una serie de tubos corning, estos se llevaron a congelación.

Luego, al extracto resultante congelado se le eliminó la parte acuosa mediante el uso de liofilizador. Este proceso de secado del extracto se llevó a cabo mediante liofilización durante 24 horas (Ver sección 4.1.2). El extracto seco en forma de polvo obtenido del proceso de liofilización se mantuvo en un tubo de centrifuga para su posterior uso. En la Figura 11 se aprecia un diagrama donde se ilustran los pasos a realizar para elaborar esta extracción.

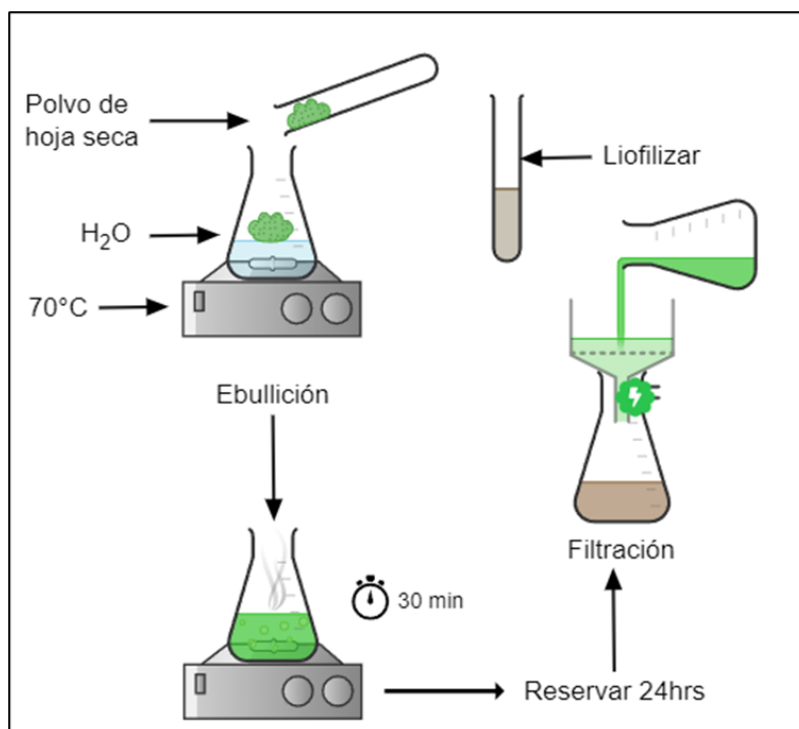


Figura 11.- Diagrama de flujo de la elaboración de extractos acuosos de hoja seca.

4.2.2. Extracción acuosa caliente de hoja fresca (EHF)

Con el fin de comparar las diferencias entre los efectos de la hoja seca en polvo y la hoja fresca, se realizó una modificación a la metodología propuesta por Zuhaira y colaboradores (2018). Para llevar a cabo esta extracción, se pesó un total de 30 g de hojas frescas, luego estas se cortaron en tiras delgadas con ayuda de tijeras. Las tiras fueron colocadas en 200 mL de agua destilada caliente (70°C) en un matraz cónico de 500 mL y se llevaron a ebullición (100°C) durante 30 minutos. Una vez terminado el proceso de infusión, la solución resultante se mantuvo en refrigeración y en oscuridad durante 24 horas.

Después de estar en refrigeración, la muestra pasó por un proceso de filtración por decantación para eliminar los sólidos utilizando papel de filtro Whatman n. ° 1 estéril y un embudo. Luego, el resultado se colocó en diversos tubos de centrifuga y se llevó a congelación.

Luego, al extracto resultante congelado se le eliminó la fase acuosa mediante el uso de liofilizador (Ver sección 4.1.2). El extracto seco en forma de polvo obtenido del proceso de liofilización se mantuvo en un tubo de centrifuga para su posterior uso. En la Figura 12 se aprecia un diagrama donde se ilustran los pasos a realizar para elaborar esta extracción.

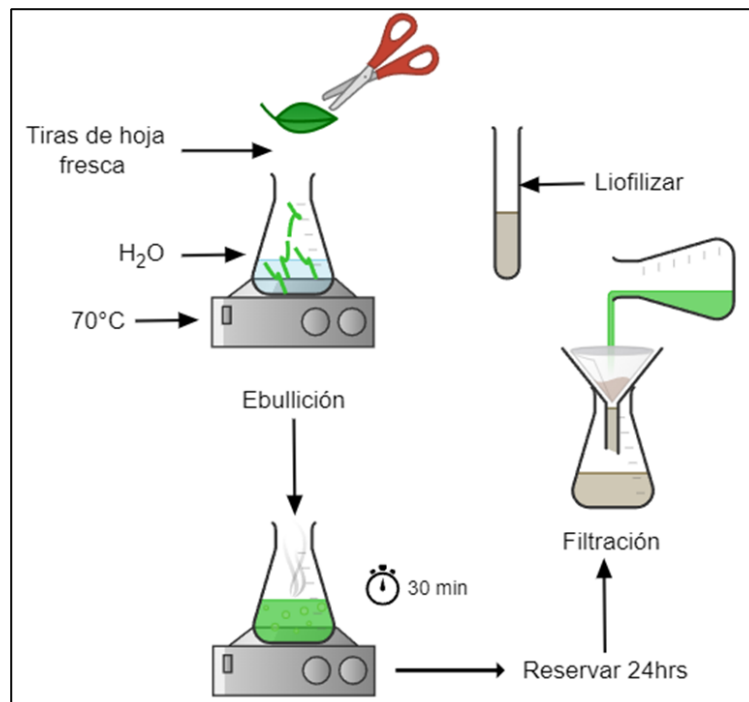


Figura 12 .- Diagrama de flujo de la elaboración de extractos acuosos de hoja fresca.

4.3. Pruebas biológicas *in vitro* de actividad antimicrobiana de extractos

4.3.1. Prueba método de difusión en placa con sensidiscos

Para llevar a cabo la evaluación de la actividad biológica como antimicrobiano que presentan los extractos realizados (EHF y EHS), se empleó el método de difusión en placa con sensidisco también conocido como antibiograma. Para la realización del ensayo, se emplearon placas con medio de cultivo Mueller-Hinton (MHA) sólido. Estas placas fueron realizadas con anterioridad a una razón de 38 g de medio de cultivo en polvo por un litro de agua destilada. En el caso de los medios de cultivo

empleados para *V. alginolyticus* se añadió NaCl a razón de 2 g por mililitro de medio.

Por otra parte, las cepas de bacterias que se emplearon para el ensayo fueron *E. coli*, *B. cereus* (ambas obtenidas de la colección perteneciente al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada) y *V. alginolyticus* (Aislada por Mata-Torres, 2022) . Estas cepas se llevaron a una concentración de 1×10^8 UFC/mL lo que equivale a 0.5 en la escala de McFarland para ser utilizadas en el ensayo. Para llevar a cabo el ajuste de concentración se emplearon métodos de dilución, midiendo la concentración con ayuda de un turbidímetro.

Una vez ajustada la concentración del cultivo bacteriano se inocularon las placas de medio de cultivo MHA con la bacteria correspondiente, para hacer esto se tomó un hisopo estéril, se introdujo en el cultivo bacteriano y se esparció por toda la placa. Después de realizado el proceso de inoculación se colocaron tres sensidiscos alrededor de cada una de las placas inoculadas utilizando una pinza estéril. Todo lo anterior descrito se llevó a cabo en condiciones asépticas bajo un mechero bunsen y respetando una distancia de asepsia de 15 cm.

Después de colocar los sensidiscos en las placas, se añadieron los distintos extractos realizados a probar. Para poder agregar los extractos cada uno de ellos se disolvieron en agua destilada a una razón de 1:1, disolviendo 0.5 g del extracto en polvo en 500 uL de agua destilada. Una vez hecha la dilución se colocaron 10 uL del extracto sobre los sensidiscos utilizando una pipeta automática. La adición de los extractos a los sensidiscos se llevó a cabo en condiciones asépticas bajo un mechero bunsen y respetando una distancia de asepsia de 15 cm.

De igual manera, a modo de control negativo se realizó el ensayo aplicando los sensidiscos sobre las placas inoculadas sin agregar ningún extracto o solvente sobre este. Por otro lado, como control positivo se empleó enrofloxacina al 10%, este se aplicó sobre los sensidiscos colocados en las placas inoculadas con las diferentes bacterias.

Después de añadir los extractos, las placas se mantuvieron en incubación a 32°C por 24 horas. Pasadas las 24 horas se evaluaron los resultados del ensayo, para

hacerlo, se midieron los halos de inhibición (diámetro en mm) que presentaron los extractos probados utilizando una regla y con la ayuda de un contador de colonias de mesa. En la Figura 13 se puede apreciar un diagrama donde se ilustran los pasos a realizar para llevar a cabo la prueba de actividad biológica.

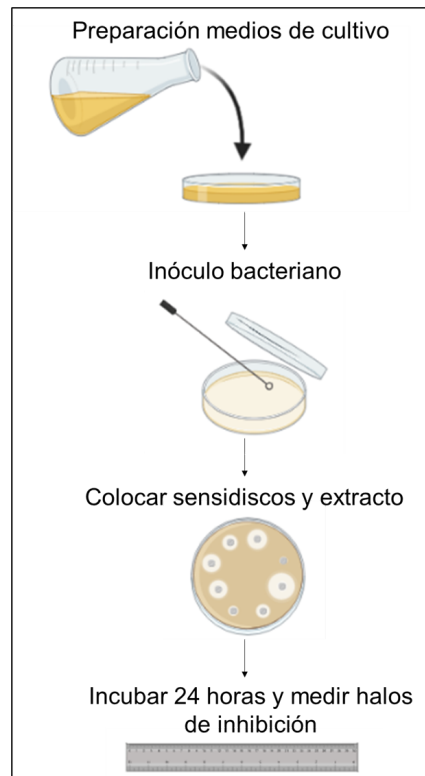


Figura 13.- Diagrama de la elaboración de prueba de actividad biológica métodos de difusión en disco.

4.3.2. Ensayo concentración mínima inhibitoria

Para realizar el ensayo se empleó medio de cultivo Mueller Hinton líquido. Los medios bacterianos utilizados se llevaron a una concentración de 1×10^8 UFC/mL lo que equivale a 0.5 en la escala de McFarland, para lograrlo se tomó una cantidad del cultivo bacteriano stock y se le añadieron 10 mL del medio de cultivo Mueller Hinton líquido. Una vez hecho esto se prepararon los extractos de hoja seca y hoja húmeda llevándolos a una concentración 1:1 con 0.5 g del extracto en 500 uL de agua destilada.

Por otro lado, se prepararon un conjunto de siete tubos para realizar el proceso de dilución seriada. A cada uno de los tubos se les añadió 500 uL de medio de cultivo líquido Mueller Hinton. Luego se llevó a cabo las diluciones añadiendo en el primer tubo 500 uL del extracto EHF a concentración 1:1, luego se homogeneizó y se transfirió de éste, 500 uL al siguiente tubo, así sucesivamente hasta tener siete diluciones distintas. El mismo procedimiento se realizó para el extracto EHS.

A partir de este punto, se observó que las distintas diluciones presentaron coloraciones marrones fuertes a simple vista. Debido a la pigmentación de los extractos, no fue posible evaluar el crecimiento bacteriano en las diluciones por medio de la turbidez como se realiza comúnmente utilizando un turbidímetro. De este modo, se optó por realizar una adaptación a la metodología.

La evaluación de los resultados se llevó a cabo sembrando las distintas diluciones en una placa a modo de antibiograma, sembrando la placa con la bacteria correspondiente y aplicando las diluciones en sensidiscos por triplicado. De este modo el halo de inhibición que formaron correspondió al valor a considerar para determinar la CMI. Siendo considerada la concentración donde se comenzaron a presentar halos de inhibición como la CMI. En la Figura 14 se puede apreciar un diagrama donde se ilustran los pasos realizados para llevar a cabo la prueba de concentración mínima inhibitoria.

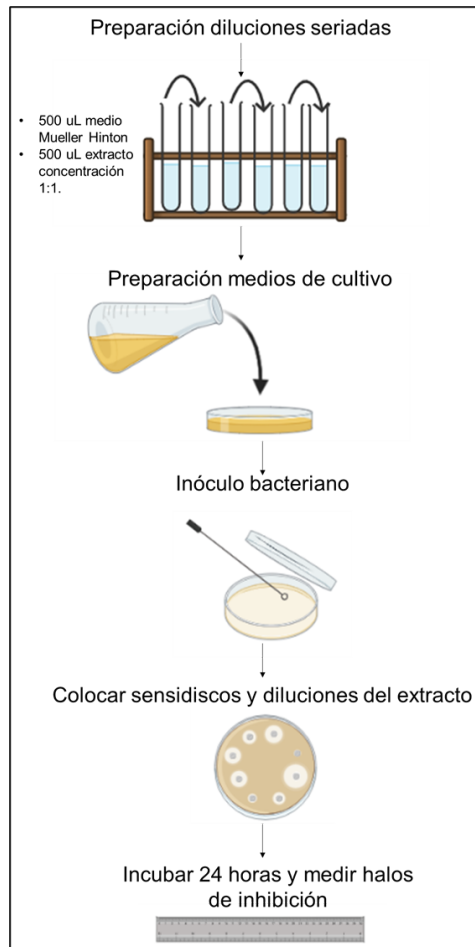


Figura 14.- Diagrama de la elaboración de prueba de concentración mínima inhibitoria.

4.4. Pruebas biológicas en rotíferos (*B. plicatilis*)

4.4.1. Ensayo evaluación de sobrevivencia a exposición del extracto.

En este ensayo se emplearon rotíferos (*B. plicatilis*) proporcionados por la UBP (Unidad Biotecnológica de Peces) de la UABC. En principio se tomó una alícuota de 200 mL del cultivo de rotíferos, estos se enjuagaron con agua de mar y se concentraron en 10 mL de agua de mar. Una vez concentrados, se estimó la concentración de organismos por mL, con ayuda de un microscopio estereoscópico.

Después de saber la concentración de rotíferos se realizaron diluciones seriadas para realizar el ensayo. Para esto se tomaron 8 tubos con 500 uL de agua de mar

cada uno, en el primero se añadió 500 uL del extracto de hoja fresca a una concentración 1:1 y se homogeneizó. Después tomando 500 uL de la primera dilución se llevaron a cabo las 8 diluciones seriadas correspondientes. Después de tener las diluciones se añadieron 500 uL del cultivo de rotíferos en cada uno de los tubos.

La evaluación de la sobrevivencia de los rotíferos se observó en las primeras tres diluciones cada 5 minutos de exposición al extracto y para las diluciones posteriores cada 30 minutos de exposición al extracto, durante tres horas. Para hacerlo, los organismos se observaron bajo microscopio estereoscópico y se registraron los efectos que el extracto provocó sobre ellos. De igual manera, a modo cualitativo se describió la sobrevivencia de los mismos, así como el comportamiento de su nado, el conteo de los organismos en su totalidad no fue posible debido a que el extracto presenta una pigmentación fuerte que hizo imposible observar a todos los individuos. En la Figura 15 se puede apreciar un diagrama donde se ilustran los pasos a realizar para llevar a cabo el ensayo de dosis letal 50% en rotíferos.

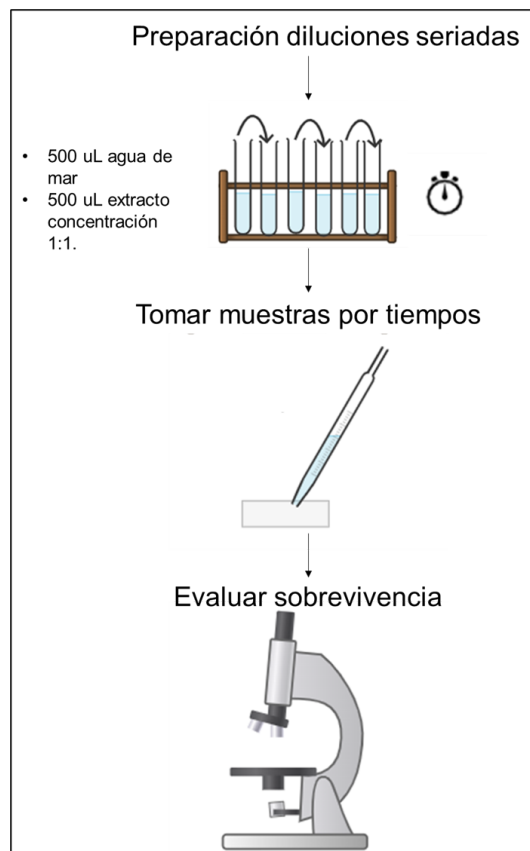


Figura 15.- Diagrama de la elaboración de ensayo evaluación de sobrevivencia a exposición del extracto.

4.4.2. Ensayo sobre la disminución de carga bacteriana por tiempo de exposición al extracto

Para llevar a cabo este ensayo se realizó primeramente una estimación de la carga bacteriana del cultivo de rotíferos provenientes del ensayo LD50%. Para hacerlo se tomó una alícuota del cultivo de rotíferos, la cual, pasó por una serie de diluciones para lograr tener una mejor visualización de las unidades formadoras de colonias (UFC) provenientes del cultivo de rotíferos. Una vez diluída el agua de medio de cultivo de rotíferos, se sembró en placas con un medio de cultivo no específico TSA, y en placas con dos medios cultivo específico *Vibrio* Chrome (V.C) y TCBS. Este proceso se llevó a cabo por triplicado.

Una vez determinada la dilución requerida para poder contabilizar las colonias, se realizó el diseño experimental. Para hacerlo se tomó una alícuota de rotíferos y se le colocó el extracto de hoja fresca de árbol de guayaba a dos distintas concentraciones y un control negativo, una de las concentraciones fue a una razón de 0.25 g de extracto por 1 mL de agua destilada, la otra concentración fue a una razón de 0.2 g de extracto por 1 mL de agua destilada.

El ensayo de exposición se realizó tomando una alícuota de 2 mL del cultivo de rotíferos, esta se colocó en un frasco de vidrio estéril y se le añadieron 2 mL de los extractos a las distintas concentraciones. Para el caso del control negativo, se añadieron 2 mL de agua destilada en lugar del extracto. Este proceso fue realizado por triplicado.

Una vez colocadas las distintas concentraciones del extracto y de la muestra control se tomaron muestras de los rotíferos cada media hora y se diluyeron a la dilución establecida anteriormente, para cada medio de cultivo. Luego estas alícuotas se sembraron en los distintos medios de cultivo, TSA, TCBS y V.C. El mismo procedimiento se realizó cada media hora durante tres horas.

Una vez terminada la siembra de los ensayos se mantuvieron en incubación a 32°C por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se registró si existió una disminución de la carga bacteriana en los rotíferos, debido a los distintos tiempos de exposición y concentraciones del extracto EHF. En la Figura 16 se puede apreciar un diagrama donde se ilustran los pasos a realizar para llevar a cabo la prueba de disminución de carga bacteriana en rotíferos por tiempo de exposición al extracto.

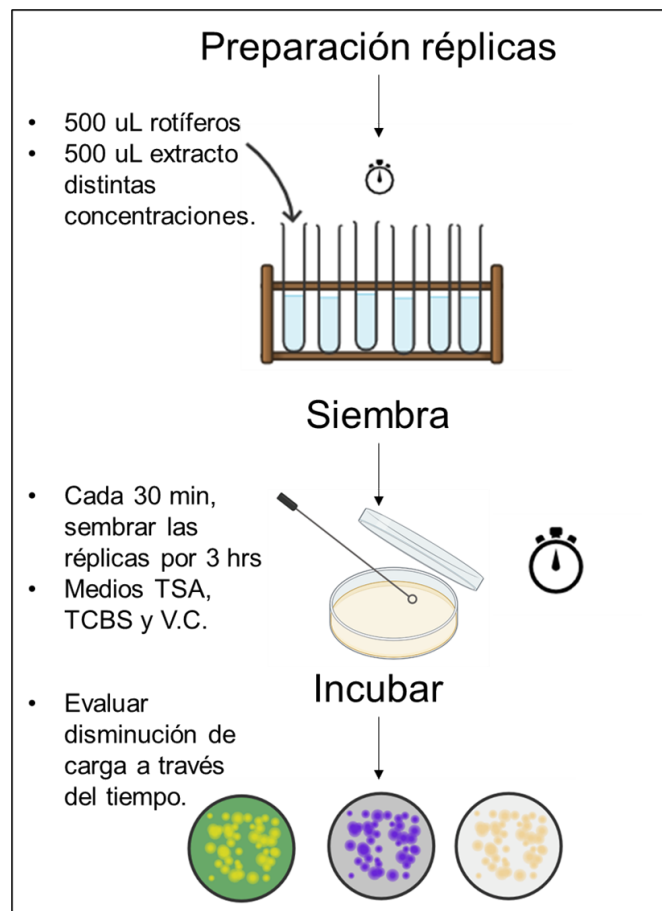


Figura 16.- Diagrama de la elaboración de prueba de disminución de carga bacteriana en rotíferos por tiempo de exposición al extracto

4.5. Pruebas fitoquímicas

4.5.1. Preparación de muestras

Para poder llevar a cabo las pruebas fitoquímicas era necesario que el extracto analizado (EHF) se encontrara disuelto en agua destilada en diferente proporción para cada tipo de prueba. En el caso de la prueba para saponinas, se tomaron 3 mg del extracto en polvo y se disolvieron en 3 mL de agua destilada. Para las pruebas de terpenoides y flavonoides se pesó 1 mg del extracto EHF y se disolvió en 1 mL de agua destilada.

4.5.2. Prueba para saponinas

Para llevar a cabo la prueba de saponinas se tomaron 3 mL del extracto previamente disuelto en agua destilada y se colocó en un tubo de ensayo con tapón por separado. Paso seguido se procedió a agitar vigorosamente de arriba abajo el tubo de ensayo. Al final se observó la apariencia de las muestras, teniendo en cuenta que la formación de una espuma estable es indicativo de la presencia de saponinas.

4.5.3. Prueba para terpenoides (Salkowski test)

Para la realización de esta prueba se colocó en un tubo de ensayo 1 mL del extracto previamente disuelto y se le añadió 2 mL de cloroformo. Después se añadieron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado teniendo en cuenta los cuidados necesarios para el manejo de este compuesto. Al final se observó la apariencia de la reacción, teniendo en cuenta que una coloración marrón-rojiza en la interfase indica la presencia de terpenoides.

4.5.4. Prueba para flavonoides (Shinoda test)

Esta prueba para identificar flavonoides se llevó a cabo colocando en un tubo de ensayo, 1 mL del extracto disuelto previamente y se añadieron fragmentos de cinta de magnesio. Una vez hecho esto se añadió ácido clorhídrico concentrado por goteo. Mientras se añadía el ácido se observó la reacción resultante, teniendo en

cuenta que una coloración naranja, roja, rosa o morada indica la presencia de flavonoides. En la Figura 17 se observa un diagrama que ilustra los pasos a seguir para llevar a cabo las distintas pruebas fitoquímicas realizadas.

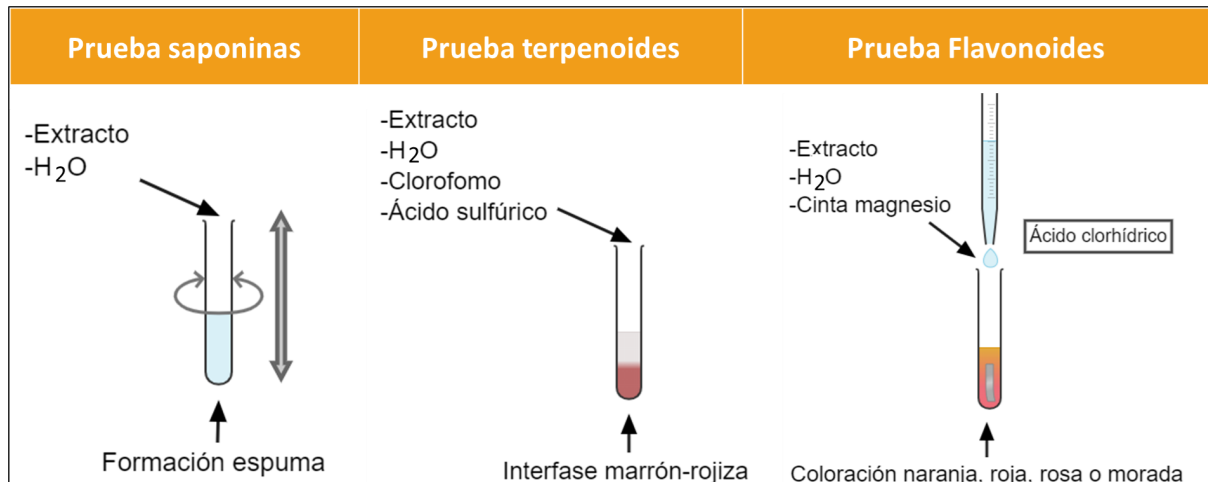


Figura 17.- Diagrama de la elaboración de pruebas fitoquímicas para saponinas, terpenoides y flavonoides.

4.6. Análisis estadístico

La evaluación de la normalidad de los datos se determinó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para la evaluación de la homocedasticidad de los datos se aplicó el test de Levene, los cuales se realizaron con el programa STATISTICA.

El efecto antimicrobiano de los extractos contra las bacterias propuestas, resultado de la prueba de antibiograma (Halos de inhibición) fue evaluado con una prueba de ANOVA de doble vía, considerando como primera variable independiente el tipo de material biológico (Hoja fresca u hoja seca), la segunda variable independiente es el tipo de bacteria a probar (*V. alginolyticus*, *B. cereus* y *E. coli*), así la variable dependiente fue el diámetro del halo de inhibición que se formó. Cuando se registraron diferencias significativas se llevó a cabo una prueba *a posteriori* de tipo Tukey con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

5. Resultados

5.1 Efecto antibacteriano de extractos

5.1.1 Método de difusión en disco

Como resultado de realizar las pruebas del posible efecto antibacteriano que poseen los distintos extractos realizados de hoja de árbol de guayaba, se presenta en Tabla IV los halos de inhibición que produjo el extracto de hoja fresca (EHF), el extracto de hoja seca (EHS) al ser probada a una concentración de 1:1 (0.5 g del extracto en polvo en 500 uL de agua destilada), así como el control positivo utilizando Enrofloxacina (Enrokarizoo) al 10% contra *B. cereus*, *V. alginolyticus* y *E. coli*.

Tabla IV.- Efecto antibacteriano de los extractos de hoja seca y hoja fresca. (Anova de 2 vías, n=3, prueba a posteriori de Tukey, $\alpha=0.05$, letras mayúsculas indican diferencias por efecto del tipo de extracto A>B en tanto que letras minúsculas indican diferencias por efecto de la especie de bacteria donde a>b).

Tipo de extracto	Halo de inhibición formado (mm)		
	<i>B. cereus</i> (Gram +)	<i>V. alginolyticus</i> (Gram -)	<i>E. coli</i> (Gram -)
Extracto hoja fresca (EHF)	12.7 ± 1.5Aa	12.3 ± 1.5Aa	6.3 ± 0.6Ab
Extracto hoja seca (EHS)	12.0 ± 1.0Aa	9.7 ± 0.6Aa	7.7 ± 0.6Ab
Enrokarizoo 10%	47.0	35.0	40.0

Al analizar los resultados se observa que no existe diferencia significativa ($P=0.204$, $F=1.8$) entre el tipo de extracto realizado, es decir entre el empleo de la hoja fresca y la hoja seca para la realización de los extractos. Sin embargo, al analizar los resultados se detectó que existen diferencias significativas ($P= 0.000004$, $F=41.6$) entre las diferentes especies de bacterias. Así, sabemos que la especie menos

susceptible a ambos tipos de extractos fue *E. coli* (Ab), mientras que las bacterias *B. cereus* y *V. alginolyticus* son más susceptibles a ambos tipos de extractos (Aa), como se aprecia en la Tabla IV por las diferencias entre los promedios de halos de inhibición que se presentan en los distintos tipos de especies para ambos extractos probados. Esta observación fue comprobada con una prueba estadística de ANOVA de doble vía, en la sección de Anexo I se puede observar la tabla resultante de esta prueba estadística.

Por otro lado, se aprecia también que existen diferencias significativas ($P=0.021$, $F=5.4$) entre las interacciones de los tipos de extractos y las bacterias contra las que se probaron dichos extractos. Así, podemos decir que la interacción entre *B. cereus* y el extracto EHF son distintos del resto de las interacciones, sugiriendo que esta especie fue la más susceptible a los extractos probados. De igual manera la interacción entre *E. coli* y ambos extractos EHF y EHS son diferentes al resto de las interacciones, confirmando así que esta especie fue la menos susceptible a los extractos probados. Estos supuestos se afirmaron con la prueba estadística *a posteriori* Tukey, la tabla resultante de este análisis se puede observar más detalladamente en Anexo II.

Así, como se observa en la Tabla IV, al probar el EHF, se obtuvo un promedio de diámetro de halo de inhibición de 12.7 ± 1.5 mm para *B. cereus*, 6.3 ± 0.6 mm para *E. coli* y 12.3 ± 1.5 mm para *V. alginolyticus*. En la Figura 18 se aprecia una fotografía de los halos de inhibición presentados en este ensayo, para los tres distintos tipos de bacterias.

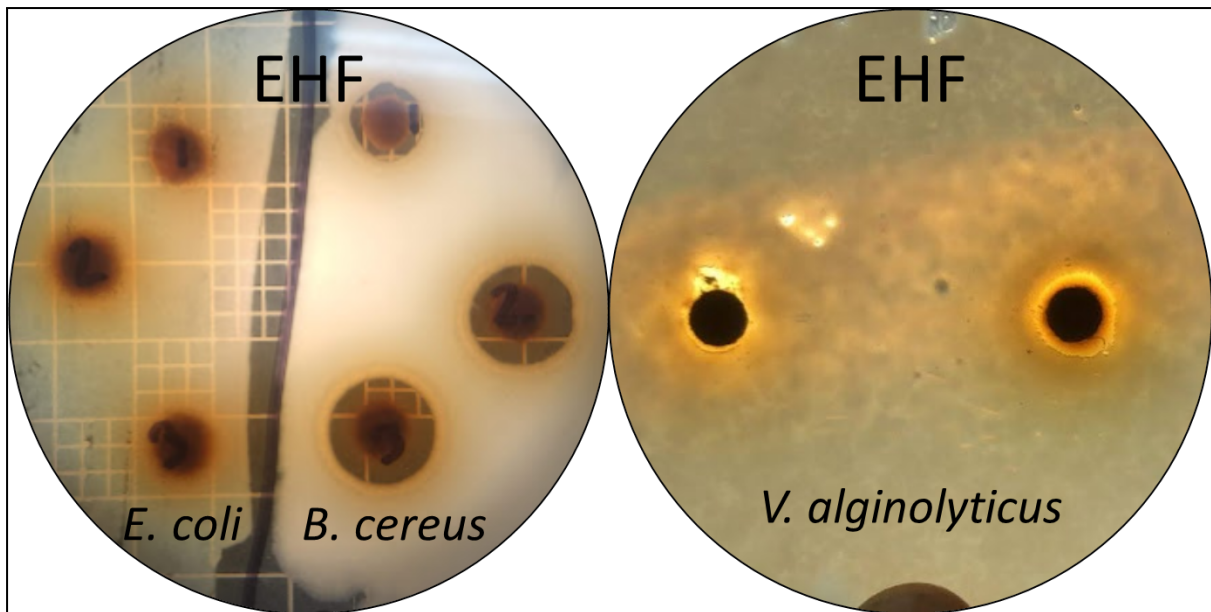


Figura 18.- Halos de inhibición presentados del extracto EHF contra *E. coli*, *B. cereus* y *V. alginolyticus*.

5.1.2 Concentración mínima inhibitoria

Después de encontrar que los extractos probados presentan actividad antimicrobiana contra algunas de las bacterias probadas, se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). En esta prueba se emplearon dos de los tres tipos de bacterias (*B. cereus* y *V. alginolyticus*), *E. coli* no fue utilizada, debido al tamaño del halo de inhibición que presentó en la prueba anterior. De este modo, en la Tabla V se puede observar el resultado del ensayo de CMI por medio del uso de antibiogramas como indicativo, al aplicar distintas concentraciones del extracto EHF contra las bacterias *B. cereus* y *V. alginolyticus*. En esta tabla se señalan además, las dos concentraciones mínimas inhibitorias para *B. cereus* y *V. alginolyticus* resaltadas con color rosa y azul respectivamente.

Tabla V.- Ensayo de CMI del extracto EHF para *B. cereus* y *V. alginolyticus*.

Extracto EHF		
Concentración g/mL	Bacteria	Halo de inhibición (mm)
1	<i>B. cereus</i>	12.5 ± 0.7
0.5		9.7 ± 0.6

0.3*		8.3 ± 0.6
1	<i>V. alginolyticus</i>	11.7± 0.5
0.5*		9.3 ± 0.5
0.3		0±0
*La concentraciones resaltadas (Rosa para la bacteria <i>B. cereus</i> y azul para <i>V. alginolyticus</i>) corresponden a la CMI que se determinó, después de comparar el diámetro de los halos de inhibición que se presentaron en el ensayo.		

De igual manera en Tabla VI se puede observar el resultado del ensayo de CMI por medio del uso de antibiogramas como indicativo, al aplicar distintas concentraciones del extracto EHS contra las bacterias *B. cereus* y *V. alginolyticus*. En esta tabla se señalan además, las dos concentraciones mínimas inhibitorias para *B. cereus* y *V. alginolyticus* resaltadas con color rosa y azul respectivamente.

Tabla VI.- Ensayo de CMI del extracto EHS para *B. cereus* y *V. alginolyticus*.

Extracto EHS		
Concentración g/mL	Bacteria	Halo de inhibición (mm)
1	<i>B. cereus</i>	9.7 ± 0.6
0.5		8.0 ± 0.0
0.3*		7.5 ± 0.7
1	<i>V. alginolyticus</i>	9.7± 0.6
0.5*		9.0 ± 0.0
0.3		8.0 ± 1.41
*La concentraciones resaltadas (Rosa para la bacteria <i>B. cereus</i> y azul para <i>V. alginolyticus</i>) corresponden a la CMI que se determinó, después de comparar el diámetro de los halos de inhibición que se presentaron en el ensayo.		

Resultado de este ensayo presentado en Tabla V y Tabla VI, podemos observar que las CMI para cada tipo de extracto realizado es el mismo, sin embargo, difiere entre las especies de bacterias probadas, siendo para *B. cereus*, una menor

concentración (0.3 g/mL) del extracto en comparación con la CMI para *V. alginolyticus* (0.5 g/mL).

5.2 Pruebas en rotíferos

5.2.1 Evaluación de sobrevivencia de rotíferos

Después de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para ambos extractos realizados, se llevó a cabo una prueba donde se evaluó la sobrevivencia en rotíferos a distintas concentraciones del extracto EHF, en un intervalo de tres horas de exposición. En esta prueba se empleó solamente el extracto EHF, ya que fue el que presentó un mejor desempeño en las pruebas anteriores.

Después de tener ocho diluciones distintas del extracto, y aplicarlas a los rotíferos, notamos que no fue posible contabilizar la sobrevivencia de los organismos, debido a la presencia de pigmentación del extracto. De este modo, se procedió a evaluar la sobrevivencia de manera cualitativa de este ensayo.

De este modo, en las primeras tres diluciones probadas (1 g/mL, 0.5 g/mL y 0.25 g/mL) al ser imposible observar a los organismos, se tamizaron para poder aclararlos y analizarlos bajo el microscopio. Se observó cómo durante los primeros 5 y 10 minutos los organismos continuaban vivos, sin embargo, presentaron un nado errático y lento, además se observaban restos de partículas del extracto adheridos a los organismos, especialmente en las dos concentraciones más altas. Después de 15 minutos de aplicado el extracto, los rotíferos de las dos concentraciones más altas cesaron su nado. Para la tercera dilución (0.25 g/mL) se continuó con el experimento por más tiempo, hasta que a los 150 minutos de exposición cesaron su nado.

Por otro lado, los ensayos donde se emplearon las concentraciones más diluidas, fueron realizados por un mayor tiempo, en la Tabla VII se plasman las observaciones realizadas en las distintas diluciones a través de tres horas de exposición al extracto.

Tabla VII.- Prueba de evaluación de sobrevivencia de rotíferos expuestos a distintas diluciones del extracto EHF a través del tiempo.

Concentración (g/mL)	Tiempo exposición (Minutos)			
	5	60	120	180
0.125	Nado fluido	Nado con dificultad ¹	Nado lento ^{2,3}	Nado lento ³
0.062	Nado fluido	Nado con dificultad ¹	Nado lento ²	Nado lento ³
0.031	Nado fluido	Nado con dificultad ¹	Nado lento ²	Nado lento ³
0.015	Nado fluido	Nado fluido	Nado fluido	Nado fluido
0.007	Nado fluido	Nado fluido	Nado fluido	Nado fluido

1.-Se aprecia dificultad en el nado, especialmente en los organismos hembra, ya que se observa como en la superficie corporal se adhieren residuos del extracto.

2.-Se observa cómo los rotíferos hembra pierden movilidad en su mayoría, los rotíferos pequeños continúan moviéndose.

3.-Se aprecian muy pocos organismos en movimiento.

5.2.2 Disminución carga bacteriana por tiempo de exposición

Como parte de las pruebas biológicas realizadas en rotíferos, se llevó a cabo un experimento de disminución de la carga bacteriana en los cultivos de rotíferos al aplicarles el extracto EHF a distintas diluciones directamente en el medio de cultivo de los organismos y sembrándolos en tres medios de cultivo distintas cada 30 minutos, por tres horas.

De este modo, se plasma en la Figura 19, un gráfico donde se representan los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento bacteriano (UFC/mL) a través del tiempo, al añadir el extracto EHF a dos concentraciones distintas (0.2 g/mL en color

naranja, 0.25g/mL en color rosa), así como un control positivo (Color azul) en el medio de cultivo no específico TSA.

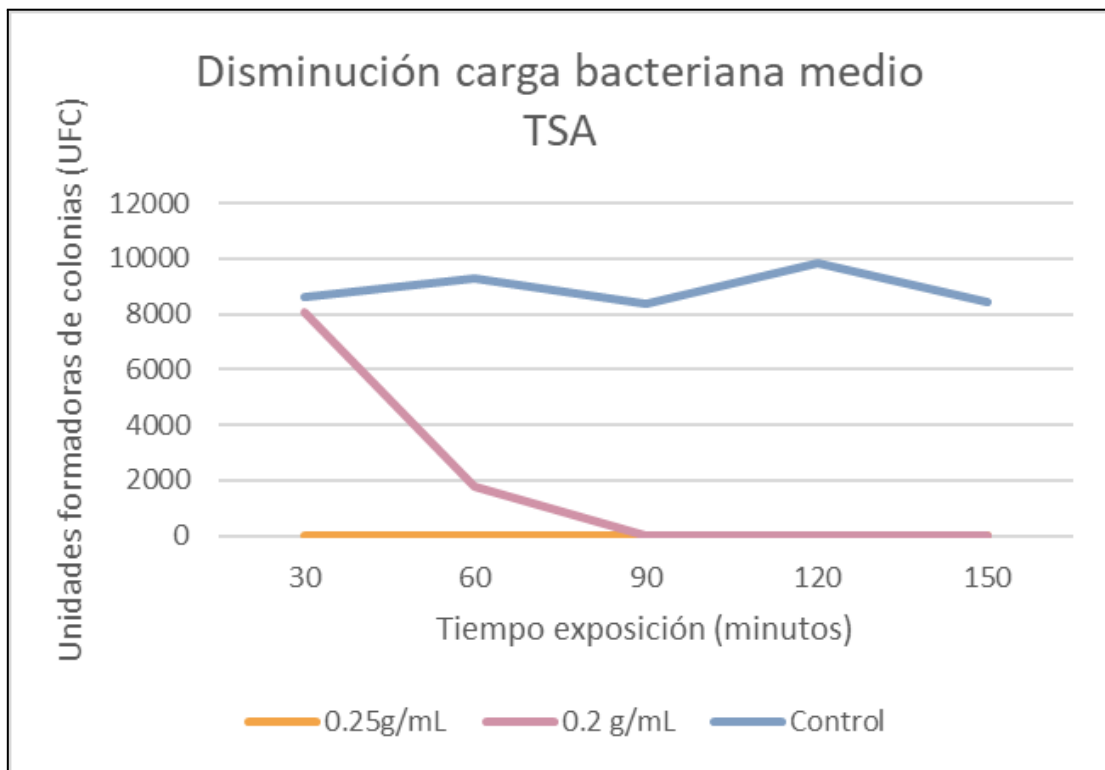


Figura 19.- Disminución de carga bacteriana en cultivos de rotíferos por exposición al extracto EHF, a través del tiempo en medio de cultivo TSA.

Así en la Figura 19 se observa cómo a la concentración más baja probada (0.2 g/mL) del extracto le tomó 90 minutos de exposición en el medio de cultivo de rotíferos para poder disminuir su carga bacteriana a 0 UFC/mL, mientras que para la concentración de 0.25 g/mL del extracto, a partir de los 30 minutos de exposición, el crecimiento bacteriano decreció hasta llegar a las 0 UFC/mL. Esto en comparación con el ensayo control, el cual se mantuvo constante durante el tiempo, presentando siempre un número mayor a 8000 UFC/mL, entendiendo que este crecimiento, es atribuido a bacterias de distintos géneros presentes en el cultivo de rotíferos, ya que TSA es un medio de cultivo no selectivo.

De igual manera, se plasma en la Figura 20, un gráfico donde se representan los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento bacteriano (UFC/mL) a través del tiempo, al añadir el extracto IHF a dos concentraciones distintas (0.2g/mL en color naranja, 0.25g/mL en color rosa), así como un control positivo (color azul) en el

medio de cultivo específico para el crecimiento de organismos del género *Vibrio*, TCBS.

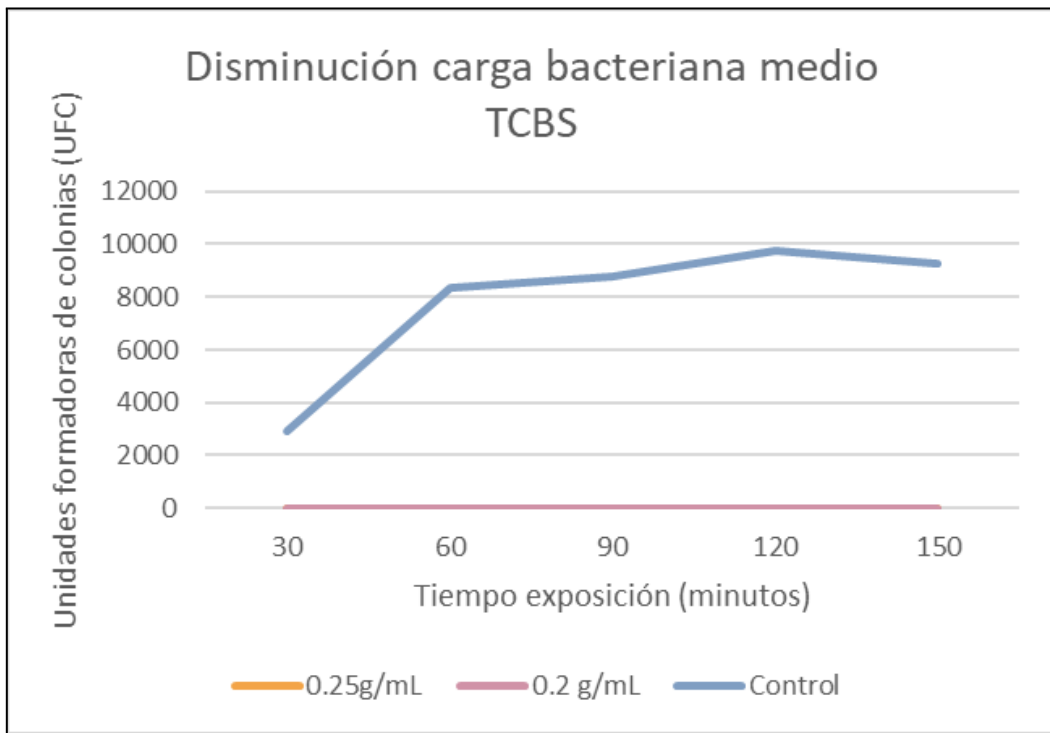


Figura 20.- Disminución de carga bacteriana en cultivos de rotíferos por exposición al extracto EHF, a través del tiempo en medio de cultivo TCBS.

Como se puede observar en la Figura 20, en el medio de cultivo específico para bacterias del género *Vibrio* TCBS, la disminución de la carga bacteriana fue más abrupta. En ambas concentraciones probadas (0.25 y 0.2 g/mL) se aprecia cómo a los 30 minutos de exposición al extracto, la carga bacteriana registrada disminuyó totalmente hasta las 0 UFC/mL. Caso contrario con el control, en este diseño experimental se presentó un crecimiento bacteriano que fue aumentando a través del tiempo, sobrepasando siempre las 2000 UFC/mL.

Así mismo y por último, se plasma en la Figura 21, un gráfico donde se representan los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento bacteriano (UFC/mL) a través del tiempo, al añadir el extracto IHF a dos concentraciones distintas (0.2 g/mL en color naranja, (0.25 g/mL en color rosa), así como un control positivo (color azul) en el medio de cultivo específico para el crecimiento de organismos del género *Vibrio*, *Vibrio* chrome.

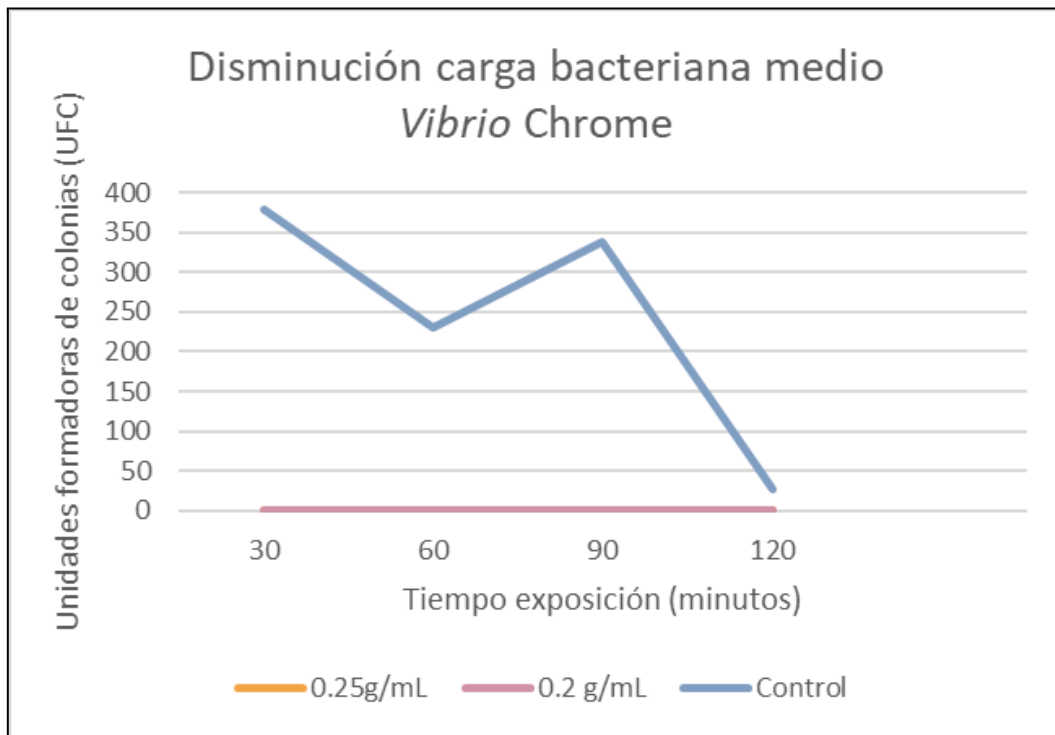


Figura 21.- Disminución de carga bacteriana en cultivos de rotíferos por exposición al extracto EHF, a través del tiempo en medio de cultivo *Vibrio chrome*.

En el ensayo representado en la Figura 21, se aprecia un comportamiento similar al ensayo anterior en el medio TCBS, aquí, la carga bacteriana específica que crece más que el medio VC, se mantiene en las 0 UFC/mL al añadir el extracto en ambas concentraciones. Por otro lado, en el ensayo control se observa un crecimiento bacteriano.

5.3 Pruebas fitoquímicas

Una vez determinada la bioactividad de ambos extractos, se determinó que el extracto EHF, fue el que presentó mejor desempeño y resultados, así, este extracto fue analizado y pasó por una serie de pruebas fitoquímicas para tener una idea del tipo de compuestos que se presentan en este extracto. Así, en la Tabla IX, se pueden observar los resultados de estos ensayos.

Tabla IX.- Resultados pruebas fitoquímicas para extracto EHF.

Prueba		
Saponinas	Terpenoides	Flavonoides
Positiva: Presencia de espuma blanca estable.	Positiva: Se observa una interfase color marrón oscura.	Positiva: Presencia de una coloración naranja-rosada.

Así, como se aprecia en la Tabla VII, este extracto probado, presentó los tres tipos de compuestos para los que se le aplicó las pruebas, dando positivo para la presencia de saponinas, terpenoides y flavonoides. Por último, estos resultados se respaldan con una serie de fotografías representativas de los ensayos realizados, estas están plasmadas en la Figura 22.

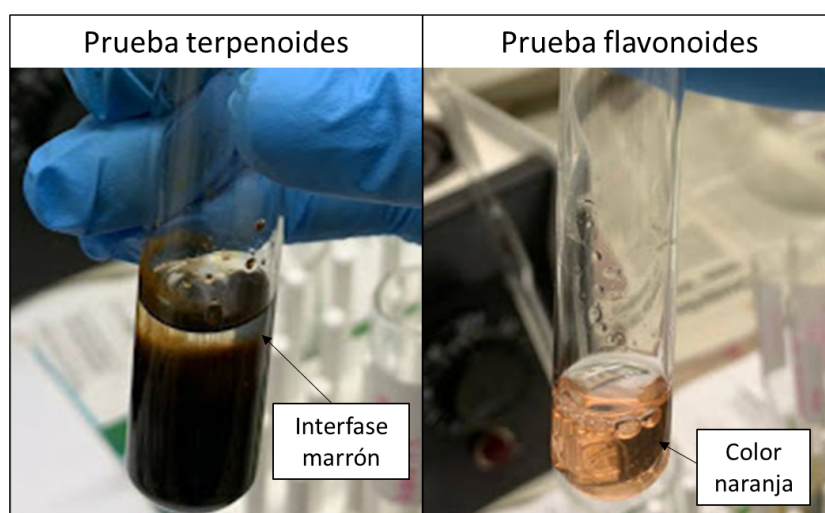


Figura 22.- Resultados positivos de la prueba fitoquímica para terpenoides y flavonoides del extracto EHF.

6. Discusiones

6.1 Efecto antibacteriano de extractos

Uno de los principales resultados obtenidos de la investigación realizada, se refiere a aquellos de las pruebas *in vitro* del potencial antibacteriano de los extractos obtenidos contra distintos tipos de bacterias. Un efecto antibacteriano notable en los tres tipos de bacterias probadas, aquellas Gram negativas (*E. coli* y *V. alginolyticus*) y la bacteria Gram positiva (*B. cereus*), esto tanto para el extracto realizado con hojas frescas como aquel realizado con hojas secas.

Sin embargo, como se aprecia en la Tabla IV, para el caso de la bacteria *E. coli*, los halos de inhibición presentados en los ensayos (7.7 ± 0.6 mm para el EHS y 6.3 ± 0.6 mm para EHF) fueron los halos más pequeños en comparación con el resto. Este resultado presentado en contraste con otros autores es distinto, por ejemplo, en un ensayo realizado por Puntawong y colaboradores (2012) donde se llevaron a cabo distintos extractos, uno de ellos por el método de decocción en agua durante dos horas, utilizando hojas de *P. guajava* frescas. Este extracto se probó contra bacterias patógenas, entre ellas *E. coli*, empleando el método de difusión en disco. Estos autores reportaron una zona de inhibición de 13.3 ± 0.8 mm para *E. coli*, mucho mayor al reportado en este ensayo (6.3 ± 0.6 mm para EHF).

De igual manera, en el ensayo realizado por Zuhaira y colaboradores (2018), se utilizaron hojas de *P. guajava* secas pulverizadas para la realización de los extractos con el método de infusión durante 30 minutos, luego al ser probadas con el método de difusión en disco, se encontró que para *E. coli*, la zona de inhibición fue de 9.0 ± 1.0 mm, así usando un método similar se encontró en este ensayo que la zona de inhibición fue de 7.7 ± 0.6 mm para el EHS, menor al reportado.

La cepa utilizada de *E. coli*, presentó una mayor resistencia a ambos extractos probados (EHF y EHS). Esto puede deberse a la naturaleza de este tipo de bacteria, en principio, se trata de una bacteria Gram negativa, las cuales, como lo comenta Zuhaira y colaboradores (2018) suelen ser más resistentes a los antibacterianos, en especial a aquellos provenientes de plantas, esto gracias a la estructura de su pared celular externa, la cual funciona como una barrera de permeabilidad efectiva, que

restringe la penetración del extracto. De este modo podemos aseverar que los extractos probados contra *E. coli*, tanto el de hoja fresca como el de hoja seca, presentaron un menor efecto, así, la cepa empleada en este ensayo en específico presenta una mayor resistencia a los extractos, en comparación con otros ensayos similares.

Por otro lado, la bacteria *B. cereus* presentó los mayores halos de inhibición en este ensayo, mencionado en Tabla IV (12.7 ± 1.5 mm para el extracto EHF y 12.0 ± 1.0 mm para el extracto EHS). Estos efectos de los extractos acuosos sobre *B. cereus*, son distintos a otros encontrados en literatura, por ejemplo, Biswas y colaboradores (2013) realizaron un ensayo utilizando extractos acuosos a base de hojas de guayaba secas pulverizadas, siguiendo un método similar al propuesto en esta investigación, en este caso se emplearon bacterias como *B. cereus* y *E. coli*. y para determinar la actividad antibacteriana de estos extractos se usó el método de difusión en agar. Estos investigadores concluyeron que ambas bacterias eran resistentes al extracto acuoso empleado ya que no se creó un halo de inhibición de estas.

Esta diferencia de los efectos puede deberse, entre otras cosas, a las metodologías realizadas por Biswas y colaboradores (2013) y aquellas realizadas en este trabajo de investigación, donde existen diferencias desde el tipo de recolección del material biológico siendo al azar en el ensayo comparado y en este caso se realizó de manera dirigida, además la fuente del material biológico, en este caso se tomó de un árbol silvestre, mientras que en el ensayo se tomó de una colección botánica (Casa de plantas especializadas en la Universidad Estatal de Fort Valley) donde existen diferencias en los factores biológicos y ecológico donde crecen estas plantas.

Este análisis, se sustenta con lo mencionado por Biswas y colaboradores (2013) los cuales comentan que los efectos que producen los extractos de plantas, dependen de muchos factores, desde el origen de la planta, las variaciones en las técnicas de extracción como el tiempo de extracción, la temperatura empleada, el tipo de solvente empleado y la proporción del solvente respecto a la muestra.

Reafirmando lo comentado respecto a los factores biológicos que influyen en la composición, calidad y proporción de los fitogénicos en plantas, como lo comenta

Molina-Meza (2022) destacan aquellos referentes a la ecología, a su cultivo y procesamiento. Los factores ecológicos y de condiciones climáticas, se refieren al entorno físico donde se desarrolla la planta, como el fotoperiodo, la temperatura y propiedades del suelo y el agua, los cuales afectan el desarrollo de la planta e indirectamente los metabolitos secundarios que posee.

Por otro lado Vazquez-Cahuich y colaboradores (2013) analizaron los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales extraídos de distintas plantas, entre ellas *P. guajava*, contra especies de bacterias patógenas, así encontraron por medio del método de difusión en agar que *B. cereus* es susceptible a los aceites esenciales, presentando un promedio de 13.80 ± 1.20 mm de halo de inhibición. De igual manera otros autores como Sanches y colaboradores (2005) han demostrado que los extractos acuosos tienen un efecto antimicrobiano contra la especie de bacteria *B. subtilis*, por medio del método de CMI.

Así, de manera general en comparación con lo presentado por otros autores, se puede decir que la cepa de *B. cereus* que se empleó en este ensayo es más susceptible a los extractos acuosos probados de *P. guajava*. Esto se puede deber a la naturaleza del tipo de bacteria (Gram +), la cual según Zuhaira y colaboradores (2018) suele ser más susceptible debido a su tipo de pared celular, la cual está recubierta por una capa de peptidoglicano que se asemeja a una malla, la cual provoca que esta sea menos impermeable y sea más accesible para que los extractos penetren la célula.

Para el caso de *V. alginolyticus*, presentó susceptibilidad a los extractos acuosos probados como se muestra en Tabla IV (12.3 ± 1.5 mm para EHF y 9.7 ± 0.6 mm para EHS). A pesar de que *V. alginolyticus* es una bacteria patógena importante no solo para la industria acuícola, sino también para la salud humana, no existen pruebas donde se hayan empleado extractos acuosos de hoja de árbol de guayaba como antimicrobiano para esta especie de *Vibrio*.

Sin embargo, se han realizado investigaciones con otras especies de *Vibrio*, Yamanaka y colaboradores (2008), llevaron a cabo un experimento donde a base de té de hojas de *P. guajava* comercial, obtuvieron un extracto al evaporar el líquido de éste, después lo probaron contra *V. vulnificus*, *V. mimicus* y *V. parahaemolyticus* mediante el método de CMI. Así observaron que el extracto tuvo un efecto

antibacteriano contra las tres especies de *Vibrio* probadas obteniendo concentraciones mínimas inhibitorias de 256 µg/mL para *V. vulnificus*, 2048 µg/mL para *V. mimicus* y 512 µg/mL para *V. parahaemolyticus*.

Por otro lado, Hannan y colaboradores (2019) realizaron una investigación donde se probó la susceptibilidad de distintas cepas de *V. alginolyticus* que fueron aisladas de camarones con cuadros de vibriosis, a una serie de extractos de plantas conocidas por sus potenciales antibacterianos, entre ellas, se empleó un extracto acuoso a partir del fruto de *P. guajava*. Sin embargo, en el ensayo de antibiograma se descubrió que las cepas probadas fueron resistentes a este extracto. Además, se emplearon otros tipos de plantas medicinales, las cuales sí representaron un potencial antimicrobiano para *V. alginolyticus*, en especial extractos obtenidos del clavo de olor, el tamarindo, ajo y la valeriana.

Otra investigación remarcable realizada por Carbay y Sorroza (2019) los cuales realizaron extractos alcohólicos (usando alcohol industrial al 96°) de algunas plantas, entre ellas *P. guajava*, para probarlo contra organismos del género *Vibrio* obtenidos de un caso de vibriosis en camarón. Mediante el uso del método de difusión en placa se probó el extracto, y se encontró que este presentó un efecto inhibitorio con un halo de inhibición de 5mm.

V. alginolyticus, al ser una bacteria Gram - se esperaría que tuviese una mayor resistencia al antibacteriano probado debido a la naturaleza de su pared celular como lo mencionaba ya Zuhaira y colaboradores (2018) reiterado por lo encontrado en la prueba para *E. coli*. Sin embargo, en esta especie vemos una excepción a esta regla ya que como lo mencionó Naseer y colaboradores (2018), la actividad antibacteriana de los extractos provenientes de *P. guajava*, es mayor contra bacterias de tipo Gram positiva y moderado contra aquellas cepas de bacterias Gram negativas.

Por otro lado, existe una variable que afecta este tipo de ensayos donde se emplean bacterias, las diferencias en la patogenicidad de las mismas, lo cual tendrá una repercusión en la susceptibilidad o resistencia que presenten ante el antimicrobiano probado. En este caso, la cepa empleada en este ensayo de *V. alginolyticus* aislada por Mata-Torres (2021) es altamente patógena, probando producir hasta 80%

mortalidad en desafíos de patogenicidad con camarón blanco (*P. vannamei*) ocasionando cuadros de vibriosis.

Al analizar los resultados obtenidos de manera general en comparación con la información disponible en bibliografía, podemos decir que ambos extractos probados tuvieron efectos sobre el crecimiento de las bacterias probadas. Cabe resaltar, que existieron diferencias entre el tipo de bacteria empleada. Esta diferencia puede deberse a la naturaleza del tipo de bacteria (Gram + o Gram -) y del grado de patogenicidad de la misma.

Por otro lado, los resultados obtenidos de la realización de la prueba de CMI, fueron distintos a lo esperado, ya que como se observa en Tabla V y Tabla VI la CMI de ambos tipos de extractos probados fue la misma (0.3 g/mL para *B. cereus* y 0.5 g/mL para *V. alginolyticus* para ambos extractos) esto, no concuerda con lo mencionado anteriormente por Biswas y colaboradores (2013) los cuales comentan que los efectos que producen los extractos de plantas varían dependiendo de las metodologías empleadas y en este caso las CMI fueron iguales para ambos tipos de extractos.

Sin embargo, al comparar las diferencias de las CMI entre especies, podemos comprobar que existe una diferencia entre las bacterias analizadas, ya que para *B. cereus* se tuvo una CMI menor (0.3 g/mL) que para *V. alginolyticus* (0.5 g/mL). Estos resultados denotan que *B. cereus* es más susceptible a ambos extractos probados (EHS y EHF), efecto que se observó también en el ensayo de sensibilidad. Esto se pudo deber de igual manera a la naturaleza de la bacteria (Gram +), los cuales son más susceptibles a los extractos de plantas a diferencia de las bacterias Gram - como es *V. alginolyticus*.

6.2 Pruebas en rotíferos

Al observar los resultados obtenidos de la prueba de evaluación de sobrevivencia de los rotíferos, se pudo apreciar que al aplicar el extracto a altas concentraciones (1 g/mL y 0.5 g/mL), los organismos no sobrepasaron los 15 minutos de sobrevivencia al exponerse al extracto. Sin embargo, para la concentración de 0.25 g/mL, los organismos llegaron a sobrevivir hasta 150 minutos de exposición. En el caso de las

concentraciones más diluídas, las cuales se presentaron en la Tabla VII, desde la más concentrada (0.125 g/mL) hasta la más diluida (0.007 g/mL) fueron aplicadas en rotíferos, y se observó que estos sobrevivieron por al menos 180 minutos de exposición.

A pesar de que los extractos acuosos de *P. guajava* se han utilizado en pruebas *in vitro* contra bacterias, no se ha descrito cómo este extracto afecta a organismos como *B. plicatilis*, si este se utiliza como desinfectante. Sin embargo, se han llevado a cabo ensayos de distintos productos comerciales como desinfectantes pero muy pocos utilizando fitogénicos como desinfectantes en rotíferos.

Una de las investigaciones que destaca fue la realizada por Stefanakis y colaboradores (2014), en esta investigación se probaron distintos aceites esenciales provenientes de distintas especies de orégano (*Origanum*), estos aceites fueron añadidas en distintas concentraciones (10, 20 y 50 mg/L) a alícuotas de rotíferos. Este autor encontró que la mayoría de los organismos sobrevivieron después de 24 horas de exposición a los aceites esenciales, excepto los organismos expuestos a uno de los aceites a 20 mg/L y para el caso de la concentración más alta (50 mg/L), no hubo sobrevivencia en ninguna réplica después de 24 horas de exposición, algo parecido a lo que se presentó en este ensayo con extracto de *P. guajava*.

Por otro lado, el uso de desinfectantes comerciales también se ha empleado para desinfectar rotíferos, como es el caso del estudio presentado por Giménez y colaboradores (2006), los cuales probaron el desinfectante comercial Ox-Aquaculture en rotíferos, a distintas concentraciones (40, 70 y 100 mg/L) tomando muestras cada 15 minutos, durante 45 minutos. Al final del experimento, encontraron que después de 45 minutos de exposición al desinfectante, todos los organismos mostraron un nado letárgico, y después de 15-30 minutos de exposición, disminuye la sobrevivencia de los organismos y para la concentración más alta, después de 45 minutos de exposición, la mortalidad sobrepasó el 50% de la población total.

Los resultados presentados por Stefanakis y colaboradores (2014), a comparación de los nuestros son distintos entre sí, desde el punto de vista de las concentraciones empleadas, ya que en su ensayo se emplearon aceites esenciales de orégano mucho menos concentrados, a pesar de esto, en la concentración de 50 mg/mL de

su experimento, los organismos murieron después de 24 horas de exposición. Esto sugiere que los rotíferos se ven afectados a este extracto dependiendo de la concentración, es decir existe una relación dosis-respuesta, lo cual, también se puede observar en los resultados expuestos en esta investigación en Tabla VI, donde los organismos expuestos a una menor concentración no presentan efectos de intoxicación al menos después de 3 horas de exposición, mientras que las concentraciones más altas, denotaron efectos de toxicidad a los rotíferos de manera casi instantánea (5 minutos de exposición).

Por otro lado, otro de los experimentos realizados en este trabajo de investigación, fue la disminución de carga bacteriana de los organismos después de aplicarles el extracto. Así, como se observa en los resultados, más específicamente en la Figura 19, el extracto EHF logró disminuir la carga bacteriana no específica (Medio TSA) hasta las 0 UFC/mL después de 30 minutos de exposición para la concentración más alta (0.25g/mL) y después de 90 minutos de exposición para la concentración de 0.2 g/mL del extracto.

Estos resultados expuestos, en comparación con experimentos similares, tienen un efecto más significativo. Por ejemplo, Stefanakis y colaboradores (2014) en su ensayo utilizando aceites esenciales de orégano a una concentración de 10 mg/L sobre rotíferos, encontraron que estos aceites no lograron disminuir la carga total bacteriana del cultivo utilizando de igual manera un medio de cultivo no específico (Agar de tripticasa de soya) a las 4 y 24 horas de exposición, encontrando incluso un aumento en las UFC/mL que en el tratamiento control.

Al observar los resultados de esta investigación, encontramos que al utilizar un medio de cultivo específico como es el medio agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) y *Vibrio* chrome, la carga bacteriana de presuntos vibrios disminuyó hasta las 0 UFC/mL, con tal solo 30 minutos de exposición a ambos extractos (0.25 y 0.2 g/mL), estas disminuciones en comparación con el tratamiento control, se puede observar para el caso del medio TCBS en la Figura 20 y para el caso del medio específico *Vibrio* chrome, se aprecia en la Figura 21.

Al observar esta disminución en el crecimiento de presuntos vibrios en este ensayo y compararla con otros autores, es remarcable el nulo crecimiento de bacterias tipo *Vibrio*, por ejemplo en el mismo ensayo realizado por Stefanakis y colaboradores

(2014) utilizando aceites esenciales de orégano, al realizar la prueba utilizando un medio de cultivo específico TCBS, encontraron una leve disminución en el crecimiento (No menor a 200 UFC/mL) de presuntos vibrios después de 4 y 24 horas de exposición al extracto.

Por otro lado, los autores Carbay y Sorroza (2019) utilizaron un extracto alcohólico de hoja de árbol de guayaba, el cual se colocó en el medio de cultivo de camarón (*Penaeus vannamei*) a una razón de 4 mL del extracto por cada litro de agua, después se tomaron muestras del agua en medios TCBS y agar CHROMAGAR. En su experimento se encontró que hubo una disminución significativa de la carga bacteriana, llegando de 2×10^6 UFC/mL en el control hasta las 2×10^5 UFC/mL para el tratamiento de *P. guajava* en TCBS y de igual forma, pasando de 1×10^6 UFC/mL en el tratamiento control a 6×10^4 UFC/mL en el tratamiento de *P. guajava* en agar CHROMAGAR. Al comparar nuestros resultados en rotíferos con los presentados por Carbay y Sorroza (2019) aplicados en medio de cultivo de camarón (*L. vannamei*), encontramos que nuestro extracto, presentó un mayor efecto en la disminución de la carga bacteriana de presuntos vibrios.

Al analizar los resultados obtenidos por otros autores, notamos que los efectos de los distintos extractos y productos comerciales probados en la desinfección de *B. plicatilis*, son menos significativos. Es decir, la carga bacteriana específica y no específica, disminuyó en menor proporción a comparación de la disminución que presentó nuestro ensayo al agregar el extracto acuoso de *P. guajava*.

6.3 Pruebas fitoquímicas

Por último, después de analizar el extracto EHF en cuanto a su bioactividad, se realizó un análisis para conocer el tipo de compuestos presentes en este extracto, así se llevaron a cabo una serie de pruebas fitoquímicas, y se encontró, como se observa en la Tabla IX, que el extracto EHF, fue positivo a la presencia de saponinas, terpenoides y flavonoides.

Como se ha mencionado antes por Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn (2010), los extractos acuosos de las hojas de árbol de guayaba, contienen diversos compuestos bioactivos, entre ellos algunos flavonoides como morin-3-O-lixósido, morin-3-O-arabinósido, quercetina-3-O-arabinósido y quercetina, así esto se

confirmó con lo que se encontró en esta investigación. De este modo, y como lo comentan estos autores, los flavonoides encontrados en los extractos de hoja de árbol de guayaba, son conocidos por poseer una actividad antimicrobiana importante, tanto para bacterias de tipo Gram positivas, como para aquellas Gram negativas, esto podría sustentar el efecto antimicrobiano que se encontró de este extracto, al realizar las pruebas de bioactividad.

De igual manera corroborando esta idea, el hecho de que el extracto analizado EHF, se haya encontrado la presencia de terpenoides, indica que este extracto posee actividad antimicrobiana, ya que como lo mencionó Zuhaira y colaboradores (2018), este tipo de compuestos encontrados en los extractos de hoja de árbol de *P. guajava*, a pesar de tener un uso más que nada por sus cualidades aromáticas, también es un grupo de sustancias que son un potencial agente inhibidor del crecimiento bacteriano.

Por otro lado, la presencia de saponinas encontradas, también puede ser otro punto que confirme la actividad antibacteriana de este extracto, ya que como lo menciona Martínez (2020) las saponinas tienen un uso en la industria farmacéutica, entre otras cosas, como antimicrobiano. Sin embargo, esta es una de las pruebas menos confiables, ya que es común que se malinterpreten resultados y se den falsos positivos, esto debido a que hay algunos compuestos que interfieren en esta prueba, como son la presencia de taninos y proteínas de bajo peso molecular.

A pesar de no haber realizado análisis con técnicas más especializadas como cromatografías para identificar los compuestos exactos en el extracto EHF, el realizar las pruebas fitoquímicas, nos da una perspectiva de los tipos de compuestos que se presentan en el extracto. Al analizar los usos y efectos que tienen este tipo de compuestos (saponinas, flavonoides y terpenoides) nos dimos cuenta que todos tienen un efecto antimicrobiano en una serie de bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas. Así, podemos aseverar que los efectos que se presentaron en las pruebas de bioactividad, fueron resultado de la presencia de estos compuestos.

7. Conclusiones

- Los extractos tienen un potencial como antimicrobiano, para bacterias tanto Gram+ como para aquellas Gram-. En especial para *B. cereus* y *V. alginolyticus*, pero no para *E. coli*.
- Se encontró que no existen diferencias significativas de los efectos dependiendo del tipo de extracto (EHF y EHS).
- Los extractos empleados producen un efecto *in vitro* contra las cepas bacterianas, al disminuir por completo la carga bacteriana general así como aquellas bacterias del género *Vibrio* del medio de cultivo de los rotíferos.
- El extracto EHF probado, puede ser utilizado como un potencial desinfectante de rotíferos para eliminar su carga bacteriana en un periodo corto de exposición.
- Los efectos que se presentaron tanto en las pruebas de antibiograma con las bacterias *B. cereus* y *V. alginolyticus*, así como las pruebas realizadas en la disminución de la carga bacteriana en rotíferos, se puede atribuir a la presencia de al menos tres tipos de fitogénicos (saponinas, flavonoides y terpenoides) que han reportado tener un uso potencial como antimicrobiano.

8. Recomendaciones

- Para poder tener una mejor perspectiva de los efectos antimicrobianos de este extracto en la industria acuícola, se podría probar empleando distintas especies de bacterias que afecten a la industria acuícola, para tener una mayor cantidad de información disponible de las especies bacterianas que afectan en acuicultura que son susceptibles a este extracto.
- Con el fin de tener información más detallada para comparar entre las distintas especies de bacterias empleadas en este ensayo con otras, es necesario tomar en cuenta los códigos genéticos de las cepas que se utilizan, ya que la patogenicidad de las cepas cambia entre una y otra.
- Recomendaría llevar a cabo pruebas de toxicidad del estilo LD50% donde los efectos de este extracto en rotíferos se evalúen de una manera cuantitativa,

para así tener más certeza de los efectos que produce este extracto, para hacerlo recomendaría filtrar y purificar el extracto para eliminar la mayor cantidad de pigmento y así sea posible cuantificar a los organismos.

- Además, otra de las cuestiones que sería idóneo tomar en cuenta es el realizar metodologías que permitan identificar los compuestos que se encuentran en el extracto, por ejemplo utilizar técnicas como HPLC.
- La última recomendación que propondría, sería llevar a cabo pruebas *in vivo*, donde se analice el efecto que tiene este extracto sobre otros organismos como son peces o camarones en cultivo, observar los efectos morfológicos por técnicas histológicas y finalmente, hacer un ensayo donde se infecte a los organismos y saber cómo afecta el extracto aplicado a los organismos.

9. Referencias

- Afroze, F. y Hossain, T. (2015) Proximate analysis, phytochemical screening and antioxidant activity of *Psidium guajava* leaves growing in coastal area of Bangladesh. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4(5), 2015. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Md-Tanvir-Hossain-2/publication/275954362_Proximate_analysis_phytochemical_screening_and_antioxidant_activity_of_Psidium_guajava_leaves_growing_in_coastal_area_of_Bangladesh/links/557631fa08ae75363751a86a/Proximate-analysis-phytochemical-screening-and-antioxidant-activity-of-Psidium-guajava-leaves-growing-in-coastal-area-of-Bangladesh.pdf
- Álvarez, J., Villegas, J., Yllera, M., Blanco-Penedo, I. y Rodríguez, E. (2017). BIENESTAR ANIMAL. Salud y enfermedad en relación con el comportamiento.
- Arévalo, Z., Clavijo, A., Rolo de, M., Álvarez, M., Conroy, D., Infante, D., y Santander, J. (2003). Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de lisas y tilapias en Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 23(2), 127-130. Recuperado de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000200005&lng=es&tlng=es.
- Ben, Y., Shangyu, Z., Xin, L., Jing, T., Qi, L., Hongwei, S. y Shikai, L. (2021) Identification of *Vibrio alginolyticus* as a causative pathogen associated with mass summer mortality of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in China. Aquaculture, Volume 535, 736363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736363>
- Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D., y Yadav, A. (2013). Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*Psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. International Journal of Microbiology, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/746165>
- Cánata, M., Navarro, R., Velázquez, G., Rivelli, S., Rodríguez, F., Céspedes, A., Espínola, C., Canese, J. y Guillén, R. (2016) Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. Pediatría (Asunción), 43(1), 13-17. <https://doi.org/10.18004/ped.2016.abril.13-17>
- Carbay Uyaguari, Y. A., y Sorroza Ochoa, L. (2019). Uso de extracto alcohólico de las plantas tomillo (*Thymus vulgaris*), guayaba (*Psidium guajava*) y eucalipto (*Eucalyptus melliodora*) frente a la vibriosis en

acuicultura. Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas, 2(3), 48-55. Recuperado de <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA>

Castro, S., Leal, C., Freire, F. R., Carvalho, D. A., Oliveira, D. F., y Figueiredo, H. (2008). Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(4), 756-760 • <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000400030>

Castro-Murrieta, S. (2022) Apariencia de una hoja de *Psidium guajava* [Figura].

Chah, K. F., Eze, C. A., Emuelosi, C. E., y Esimone, C. O. (2006). Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1-2), 164-167. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.070>

Chanu, T., Pai, V., Chakraborty, R., Raju, B., Lobo, R. y Ballal, M. (2011) Screening for antidiarrheal activity of *Psidium guajava*: A possible alternative in the treatment against diarrhea causing enteric pathogens. *Journal of chemical and pharmaceutical research*, 3(6), 961-967. Recuperado de <https://www.semanticscholar.org/paper/Screening-for-antidiarrheal-activity-of-Psidium-%3A-A-Chanu-Pai/1e031a9ec7226e610fbadbd06123415c8bf9365e>

Cortés-Sánchez, A, Díaz-Ramírez, M. y Salgado-Cruz, M. (2017) *Bacillus cereus*: ALIMENTOS, SALUD Y BIOTECNOLOGÍA. *Agroproductividad*: Vol. 10, Núm. 10 de octubre. 2017. pp: 3-9. Recuperado de <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1122/1/PUB-ARTICULO-3995.PDF>

DELACON. (2018) SIGUIENDO EL CAMINO NATURAL EL PODER DE LAS PLANTAS DA SUS FRUTOS. Recuperado de: https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/DECO21_DELACON-poder-plantas_IAAP_2021.pdf

De-Souza-Gazal, L., Tagliari-De-Brito, K., Takayama-Kobayashi, R., Nakazato, G., Souto-Cavalli, L., Kazue-Otutumi, L. y Guimarães-De-Brito, B. (2020). Antimicrobials and resistant bacteria in global fish farming and the possible risk for public health. *Arquivos do Instituto Biológico*, 87. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000362019>

Díaz-de-Cerio, E., Verardo, V., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., y Segura-Carretero, A. (2017). Health effects of *Psidium guajava* L. leaves: an overview of the last decade. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 897. <https://doi.org/10.3390/ijms18040897>

- El-Saadony, M., Swelum, A., Abo Ghanima, M., Shukry, M., Omarf, A., Taha, A., Salem, H., El-Tahan, A., El-Tarabily, K y El-Hack, M. (2022) Shrimp production, the most important diseases that threaten it, and the role of probiotics in confronting these diseases: A review. *Research in Veterinary Science* 144 (2022) 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.01.009>
- FAO (2022) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>.
- Gephart, J. A., Golden, C. D., Asche, F., Belton, B., Brugere, C., Froehlich, H. E., y Allison, E. H. (2020). Scenarios for global aquaculture and its role in human nutrition. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(1), 122-138. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1782342>
- Gil-Quintero, N. M. (2005). Importancia de *Vibrio cholerae* y otros vibrios como causante de ETA'S. Universidad De Los Andes Facultad De Ciencias Programa De Microbiología opción de Microbiología De Alimentos E Industria Bogotá. Recuperado de <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/22562/u270767.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Giménez, G., Padrós, F., Roque, A., Estévez, A., y Furones, D. (2006). Bacterial load reduction of live prey for fish larval feeding using Ox-Aquaculture©. *Aquaculture Research*, 37(11), 1130-1139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01537.x>
- Gómez Gil, B., Roque, A. y Guerra Flores, A. (2001). Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. Recuperado de <http://cesaibc.org/pdf/infointeres/crustaceos/enfermedadesmexico.pdf>
- Górniak, I., Bartoszewski, R. y Króliczewski, J. (2019) Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18, 241–272. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Hannan, M. A., Rahman, M. M., Mondal, M. N., Chandra, D. S., Chowdhury, G., y Islam, M. T. (2019). Molecular Identification of Causing Vibriosis in Shrimp and Its Herbal Remedy. *Polish Journal of Microbiology*, 68(4), 429-438. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-042>
- Jiang, J., Tang, M., Chen, J., y Yang, Y. (2019). Identification and degradation characteristics of *Bacillus cereus* strain WD-2 isolated from prochloraz-manganese-contaminated soils. *Plos one*, 14(8) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220975>

- Lacombe, D. (2021) Fitogénicos: aditivos naturales para el rendimiento animal. Revista TODOTAMBO 240 (2021) 34-40. Recuperado de <https://todoweb.com.uy/ToDoTambo/todotambo-240.pdf>
- Mailoa, M. N., Mahendradatta, M., Laga, A., y Djide, N. (2014). Antimicrobial activities of tannins extract from guava leaves (*Psidium guajava* L.) on pathogens microbial. International Journal of Scientific & Technology Research, 3(1), 236-241. Recuperado de: <http://www.ijstr.org/final-print/jan2014/Antimicrobial-Activities-Of-Tannin-s-Extract-From-Guava-Leaves-psidium-Guajava-L-On-Pathogens-Microbial.pdf>
- Martínez, J. (2020) Química de Productos Naturales. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia, 2020. Recuperado de: <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/16148>
- Mata-Torres, F. (2022) Identificación y caracterización de tres cepas de *Vibrio* spp. potencialmente patógenas aisladas en sistemas de cultivo cerrados de *Penaeus vannamei*. [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California]. Recuperado de <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/9893/1/ENS095521.pdf>
- Millán, L. M., y Pérez, J. C. F. (2017). Terapéutica en acuicultura. Panorama actual del medicamento, 41(404), 579-588. Recuperado de: <https://botplusweb.farmaceuticos.com/Documentos/2017/6/13/115952.pdf>
- Milyani, R. y Ashy, N. (2012). Inhibitory effect of some plant extracts on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. African Journal of Microbiology Research, 6(40), 6822-6829. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.119>
- Molina-Meza, D. A. (2022) Influencia del uso de aditivos fitogénicos sobre la salud intestinal y productividad de pollos de engorde. [Trabajo académico de segunda especialidad]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado. Recuperado de <https://hdl.handle.net/20.500.12672/17782>
- Montaño-Arias, N., Sandoval-Pérez, A., Camargo-Ricalde, S. y Sánchez-Yáñez, J. (2010) Los microorganismos: pequeños gigantes. Elementos: Ciencia y cultura, 17(77), 15-23. Recuperado de <https://elementos.buap.mx/directus/storage/uploads/00000002205.pdf>
- Nafiqoh, N., Sukenda, Zairin, M., Alimuddin, J., Lusiastuti, A., Sarter, S., Caruso, D. y Avarre, C. (2019) Antimicrobial properties against

Aeromonas hydrophila and immunostimulant effect on *Clarias gariepinus* of *Piper betle*, *Psidium guajava*, and *Tithonia diversifolia* plants. *Aquaculture International* (2020) 28:1–13
<https://doi.org/10.1007/s10499-019-00439-6>.

Naseer, S., Hussain, S., Naeem, N., Pervaiz, M., y Rahman, M. (2018). The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava* (guava). *Clinical Phytoscience*, 4(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1186/s40816-018-0093-8>

Haney, J. (2008) Under an extremely high magnification of 44, 818X, twice that of PHIL 10574 and 10575, this scanning electron microscopic (SEM) image revealed some of the morphologic details displayed by a single Gram-negative, rod-shaped, *Escherichia coli* bacterium. This bacterium was a member of the strain, 0:169 H41 ETEC (Enterotoxigenic *E. coli*) [Figura]. Recuperado de:
<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10576>

Novi-Rosmala, D., Huai-Ting, H., Yu-Sheng, W., Zhen-Hao, L., Yu-Ju, L., Po-Tsang, L. y Fan-Hua, N. (2021) Guava (*Psidium guajava*) leaf extract enhances immunity, growth, and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 118 (2021) 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.017>

Okunrobo, L., Imafidon, K. y Alabi, A. (2010) Phytochemical, Proximate and Metal Content Analysis of the Leaves of *Psidium guajava* Linn (Myrtaceae). *International Journal of Health Research*, 3(4): 217-221. DOI: [10.4314/ijhr.v3i4.70426](https://doi.org/10.4314/ijhr.v3i4.70426).

Omitoyin, B. O., Ajani, E. K., Orisasona, O., Basse, H. E., Kareem, K. O., y Osho, F. E. (2019). Effect of guava *Psidium guajava* (L.) aqueous extract diet on growth performance, intestinal morphology, immune response and survival of *Oreochromis niloticus* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 50(7), 1851-1861.
<https://doi.org/10.1111/are.14068>

Puntawong, S., Okonogi, S., y Pringproa, K. (2012) In vitro antibacterial activity of *Psidium guajava* Linn. Leaf extracts against pathogenic bacteria in pigs. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 11(2), 127-34. Recuperado de
<https://www.thaiscience.info/Journals/Article/CMUJ/10887409.pdf>

Rahim, N., Gomes, D. J., Watanabe, H., Rahman, S. R., Chomvarin, C., Endtz, H. P., y Alam, M. (2010). Antibacterial activity of *Psidium*

guajava leaf and bark against multidrug-resistant *Vibrio cholerae*: implication for cholera control. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 63(4), 271-274. <https://doi.org/10.7883/yoken.63.271>

Rameshkumar, P., Nazar, A., Pradeep, M., Kalidas, C., Jayakumar, R., Tamilmani, G., Sakthivel, M., Samal, A., Sirajudeen, S., Venkatesan, V. y Nazeera, B. (2017) Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from sea cage cultured cobia (*Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766)) in India. *Letters in Applied Microbiology* 65, 423-430. The Society for Applied Microbiology. DOI: [10.1111/lam.12800](https://doi.org/10.1111/lam.12800)

Rattanachaikunsopon, P. y Phumkhachorn, P. (2010) Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(5), 393-396. DOI: [10.5897/JMPR09.485](https://doi.org/10.5897/JMPR09.485)

Rivera-Arce, E., Chávez-Soto, M., Gattuso, M. y Lozoya-Legorreta, X. (2003) La hoja de guayabo en el tratamiento de afecciones gastrointestinales. *Revista de Fitoterapia* 2003; 3(2): 101-111. Recuperado de: <https://docplayer.es/40325937-La-hoja-de-guayabo-en-el-tratamiento-de-afecciones-gastrointestinales.html>

Rodríguez, D. M., Cárcamo, J. H., y Espinal, E. O. C. (2014). Efecto de la cadena de frío en la preservación de los productos pesqueros. *Portal de la Ciencia*, 93-106. <https://doi.org/10.5377/pc.v6i0.1845>

Rosado-Salazar, A. (2018) Resistencia antimicrobiana de bacterias del género *Vibrio* en langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) en centros de cultivo de la región tumbes. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú. Recuperado de https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/1686/Rosado_a.pdf?sequence=1

Sanches, N., Garcia-Cortez, D., Simone, M., Vataru, C. y Dias-Filho, V. (2005) . An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 429-436. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000300014>

Sivakamavalli, J., Park, K., Kwak, I., y Baskaralingam, V. (2021). Bacterial Disease Control Methods in Shrimp (*Penaeus*, 1798) Farming Sector in Asian Countries. In (Ed.), *Arthropods - Are They Beneficial for Mankind?*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93680>

- Soliman, F., Fathy, M., Salama, M y Saber, F. (2016) Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University (2016) 54, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.06.003>
- Stefanakis, M., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. y Makridis, P. (2014) Use of essential oils extracted from three *Origanum* species for disinfection of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*). Aquaculture Research, 2014, 45, 1861–1866. <https://doi.org/10.1111/are.12137>
- Travers, M., Miller, K., Roque, A. y Friedman, C. (2015) Bacterial diseases in marine bivalves. Journal of Invertebrate Pathology October 2015, Volume 131, Pages 11-31 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.010>
- Varela-Mejías, A. y Alfaro-Mora, R. (2018) Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 29(1): 01-14 Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-9117-2018000100001
- Vazquez-Cahuich, D., Espinosa-Moreno, J., Centurion, D., Velazquez-Martinez, J., Borges-Argaez, R. y Caceres, M. (2013) Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of *Malvaviscus arboreus* cav, *Pimenta dioica* (L.) merr., *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth and *Psidium guajava* L. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 16(3). Recuperado de <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1125/848>
- Vivanco-Font, E. (2021) Regulación de antibióticos en la acuicultura: Casos de Unión Europea, Noruega y Estados Unidos de Norte América (EEUU). Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. Recuperado de https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/32237/2/BCN_Regulacion_antibioticos_en_acuicultura_2021_FINAL.pdf.
- Yamanaka, F., Hatano, T., Ito, H., Taniguchi, S., Takahashi, E., y Okamoto, K. (2008). Antibacterial effects of guava tannins and related polyphenols on *Vibrio* and *Aeromonas* species. Natural Product Communications, 3(5), 1934578X0800300509. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300509>
- Yang, C., Chowdhury, J., Hou, Y. y Gong, J. (2015) Phytogetic Compounds as Alternatives to In-Feed Antibiotics: Potentials and Challenges in

Application. Pathogens 2015, 4, 137-156.
DOI:10.3390/pathogens4010137

Zuhaira, S., Mohd-Nizam, N. y Ridzuan, P. (2018) The efficacy of *Psidium guajava* linn leaf extracts from selangor region against gram-positive and gram-negative bacteria. Folia Medica Indonesiana, Vol. 54 No. 4: 294-30. Recuperado de <https://e-journal.unair.ac.id/FMI/>

10. Anexos

Anexo I.- Tabla ANOVA de prueba de actividad antimicrobiana de extractos.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	2	1	2	1.8	0.204550	4.747225
Columnas	92.444	2	46.222	41.6	0.000004	3.885294
Interacción	12	2	6	5.4	0.021256	3.885294
Dentro del grupo	13.333	12	1.111			
Total	119.778	17				

Anexo II.- Resultado de prueba de Tukey comparando las interacciones entre grupos.

	Tipo de hoja	Especie de bacteria	Halo de inhibición - Mean	1	2	3	4
1	Fresca	E.coli	6.33333			****	
4	Seca	E.coli	7.66667			****	****
6	Seca	V. alginolyticus	9.66667	****			****

5	Seca	B. cereus	12.00000	****	****		
3	Fresca	V. alginolyticus	12.33333	****	****		
2	Fresca	B. cereus	12.66667		****		