

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Ciencias Biológicas



EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA E IDENTIFICACIÓN PARCIAL DE  
MOLÉCULAS BIOACTIVAS DE *Salvia rosmarinus* SPENN. (1835), *Haematoxylum  
brasiletto* H. KARST. (1862) Y *Ocimum basilicum* L. (1753) SOBRE BACTERIAS  
PATÓGENAS EN LA PRODUCCIÓN DE *Oreochromis niloticus* L. (1758).

POR

Q.B.P LUIS FERNANDO MORA SAAVEDRA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO en Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos

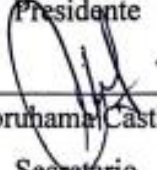
2024

EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA E IDENTIFICACIÓN PARCIAL DE  
MOLÉCULAS BIOACTIVAS DE *Salvia rosmarinus* SPENN. (1835), *Haematoxylum  
brasiletto* H. KARST. (1862) Y *Ocimum basilicum* L. (1753) SOBRE BACTERIAS  
PATÓGENAS EN LA PRODUCCIÓN DE *Oreochromis niloticus* L. (1758).

Comité de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Catalina Rivas Morales

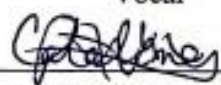
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Sandra Loruhama Castillo Hernández

Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María Julia Verde Star

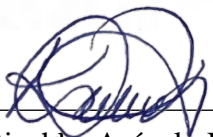
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Catalina Leos Rivas

Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. David Gilbert García Hernández

Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Katiushka Arévalo Niño  
SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO



EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA E IDENTIFICACIÓN PARCIAL DE  
MOLÉCULAS BIOACTIVAS DE *Salvia rosmarinus* SPENN. (1835), *Haematoxylum  
brasiletto* H. KARST. (1862) Y *Ocimum basilicum* L. (1753) SOBRE BACTERIAS  
PATÓGENAS EN LA PRODUCCIÓN DE *Oreochromis niloticus* L. (1758).

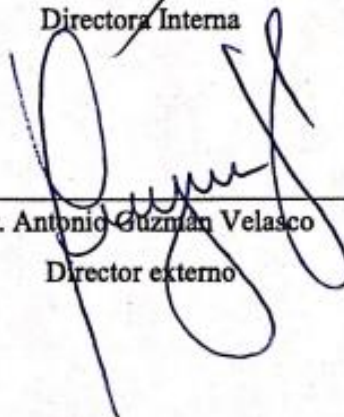
Dirección de Tesis



---

Dra. Catalina Rivas Morales

Directora Interna



---

Dr. Antonio Guzmán Velasco

Director externo

DERECHOS RESERVADOS©  
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Más profundo agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León, una institución que no solo me ha proporcionado una educación de calidad, sino que también ha fomentado un ambiente de crecimiento y descubrimiento. Su compromiso con la excelencia académica y la investigación ha sido una fuente constante de inspiración.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por su apoyo incondicional durante mi viaje académico. La infraestructura, los recursos y la orientación proporcionados por la facultad han sido fundamentales para la realización de esta investigación. La oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Química Analítica y Productos Naturales, y en el Laboratorio Biología de la Conservación y Desarrollo Sostenible ha sido invaluable, permitiéndome desarrollar habilidades prácticas y aplicar los conceptos teóricos aprendidos en el aula.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo otorgado con la beca 815666 para el desarrollo de este trabajo.

## DEDICATORIA

Primero que nada, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis padres, Fernando y Rebeca, quienes han sido mi guía y mi luz durante todo este proceso. Su apoyo constante, su amor incondicional y su fe inquebrantable en mí, incluso en los momentos más difíciles, han sido fundamentales para llegar a este punto. Sin su ayuda, no habría podido superar los obstáculos que se me presentaron a lo largo de mi camino. No tengo palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí, pero espero que estas pocas palabras sean un pequeño comienzo. Muchas gracias, los amo.

A Valeria Briones, quien ha sido mi apoyo incondicional en este largo y desafiante camino. Tu amor, paciencia y comprensión han sido mi refugio en los momentos más difíciles. Gracias por creer en mí, incluso cuando yo mismo dudaba, y por alentarme a seguir adelante.

A la Dra. Catalina Rivas Morales y a la Dra. Catalina Leos Rivas, quienes con su interés y curiosidad por mi trabajo de investigación han sido una fuente constante de inspiración. Su dedicación, paciencia y esmero para iniciarme en el oficio de la investigación han sido fundamentales durante los años de gestación de este trabajo. Su orientación y guía han sido invaluable, y estoy profundamente agradecido por su apoyo.

A mi comité de Tesis: Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández, Dra. María Julia Verde Star, Dra. Catalina Leos Rivas, Dr. David Gilberto García Hernández por el apoyo en la revisión de este trabajo, sus consejos y sus comentarios pertinentes para una mejora continua.

Al MC. Sergio García González, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica. Su consejo, paciencia, cariño y motivación constante han sido una fuente de fortaleza y orientación durante todo el proceso de investigación. Su apoyo ha sido invaluable, y estoy profundamente agradecido por su contribución a mi trabajo.

Al Dr. Antonio Guzmán, quien me brindó la invaluable oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Su confianza en mi capacidad y su apertura para permitirme aprender y crecer en un entorno profesional han sido fundamentales en mi desarrollo académico y profesional.

A mis amigos, en especial a Joaquín Saucedo, quien, con su amistad y apoyo, ha sido una fuente constante de aliento y motivación. Así como a todos los que formaron parte para que este trabajo pudiera hacerse realidad.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT .....	XIII
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES .....	2
3.- JUSTIFICACIÓN .....	11
4.- HIPÓTESIS .....	12
5.- OBJETIVO GENERAL.....	13
5.1.- Objetivos particulares .....	13
6.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
6.1 Material biológico .....	14
6.2.- Obtención de extractos metanólicos .....	14
6.3.- Perfil fitoquímico.....	15
6.3.1.- Esteroles y Triterpenos .....	15
6.3.2.- Cumarinas .....	15
6.3.3.- Sesquiterpenlactonas.....	15
6.3.4.- Quinonas .....	15
6.3.5.- Saponinas .....	15
6.3.6.- Flavonoides.....	15
6.3.7 Taninos.....	16
6.4.8.- Carbohidratos.....	16
6.4.9.- Alcaloides .....	16
6.4.- Determinación de la actividad antibacteriana.....	16
6.4.1.- Método de difusión en pozo .....	16
6.4.2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	17
6.5.- Cromatografía en capa fina.....	17
6.6.- Bioautografía .....	17
6.7.- Fraccionamiento de los extractos activos .....	18



6.8.- Elucidación parcial de los compuestos bioactivos.....	19
6.8.1.- Espectroscopía Ultravioleta visible .....	19
6.8.2.- Espectroscopía Infrarrojo.....	19
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
8.- CONCLUSIÓN.....	31
9.- PERSPECTIVA.....	32
10.- BIBLIOGRAFÍA .....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Material vegetal	14
2	Bacterias de importancia en la producción de tilapias	14
3	Rendimiento de los extractos metanólicos de las pantas en estudio	20
4	Perfil fitoquímico de los extractos en estudio	21
5	Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos en estudio	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Marcha de fraccionamiento de extracto bioactivo	18
2	Extracto de <i>H. brasiletto</i> vs. <i>E. coli</i>	22
3	Extracto de <i>H. brasiletto</i> vs. <i>P. aeruginosa</i>	23
4	Extracto de <i>H. brasiletto</i> vs. <i>S. typhimurium</i>	23
5	Extracto de <i>S. rosmarinus</i> vs. <i>S. aureus</i>	23
6	Extracto de <i>O. basilicum</i> vs. <i>P. aeruginosa</i>	24
7	Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria; (1) <i>E. coli</i> ; (2) <i>P. aeruginosa</i> ; (3) <i>S. typhimurium</i> ; (4) <i>S. aureus</i>	24
8	Cromatografías en diferentes sistemas	25
9	Placas cromatográficas (1) <i>S. rosmarinus</i> , (2) <i>H. brasiletto</i> , (3) <i>O. basilicum</i>	25
10	Extracto de <i>H. brasiletto</i> vs. <i>E. coli</i>	26
11	Extracto de <i>H. brasiletto</i> vs. <i>P. aureginosa</i>	26
12	Fracciones de extracción	27
13	Extr. <i>H. brasiletto</i> ; Fracc. 2 vs. <i>E. coli</i>	28
14	Extr. <i>H. brasiletto</i> ; Fracc. 2 vs. <i>P. aureginosa</i>	28
15	Extr. <i>H. brasiletto</i> ; Fracc. 2 vs. <i>S. aureus</i>	28
16	Extr. <i>H. brasiletto</i> ; Fracc. 2 vs. <i>S. typhimurium</i>	28
17	Espectro UV-vis de la Fracción 2 del Extr. <i>H. brasiletto</i>	29
18	Espectro UV-vis de Quercetina	29
19	Espectro IR de la Facción 2 del Extr. <i>H. brasiletto</i>	30

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>SÍMBOLO / ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
μL	Microlitros
nm	Nanómetros
m	Metros
mm	Milímetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
h	Horas
g	Gramos
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
Rf	Relación de Frente
ATCC	American Type Culture Collection
sp.	Especie
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
UV	Radiación UltraVioleta
IR	Infrarrojo
UV-Vis	Ultravioleta Visible
FTIR	Infrarrojo por transformada de Fourier

## RESUMEN

El aumento en la producción acuícola ha sido asociado con problemas ecológicos y patológicos, este último ha causado preocupación en el sector acuícola; debido a que las infecciones bacterianas pueden llegar a representar grandes pérdidas, el uso de antibióticos se pretende reducir ya que muchos de estos tratamientos tienen grandes restricciones en la producción acuícola y su uso prolongado ocasiona resistencia bacteriana, daños ecológicos, y restricción de las exportaciones. Una alternativa ecológica son los extractos de plantas medicinales *Salvia rosmarinus* (Romero), *Haematoxylum brasiletto* (Palo de Brasil) y *Ocimum basilicum* (Albahaca) para combatir microorganismos patógenos en el sector acuícola, respetando las normas nacionales e internacionales para la producción de especies de interés en este sector. El material vegetal que se utilizó es: *S. rosmarinus*, *H. brasiletto* y *O. basilicum*, las bacterias utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Los extractos metanólicos se obtuvieron mediante el método Soxhlet, se realizó una posterior eliminación del solvente, a los extractos obtenidos se llevó a cabo su perfil fitoquímico y se determinó la actividad antimicrobiana por difusión en pozo. De los extractos que presentan actividad significativa, se determinó la concentración mínima inhibitoria por microplaca y se realizó un fraccionamiento por cromatografía en capa fina (TLC), para posteriormente realizar una autobiografía, lo que permitió identificar las posibles moléculas bioactivas. **Resultados:** El extracto metanólico con mayor rendimiento fue palo de Brasil con 28.7%, mientras que el de albahaca fue el menor con 21.7%. El perfil fitoquímico mostró que los tres extractos presentan metabolitos similares con excepción de que palo de Brasil con cumarinas y la albahaca no presenta alcaloides. El extracto metanólico con mayor actividad antimicrobiana es el de palo de Brasil con un CMI de 1.8 mg/mL, el cual se sometió al fraccionamiento en un sistema Cloroformo-Metanol [7:3] y posterior a la bioautografía. La inhibición del crecimiento de la bacteria se presentó en la fracción con un  $R_f$  de 0.78. La fracción de importancia fue sometida a pruebas fitoquímicas en donde se observó la presencia de flavonoide, se puede inferir que se trata posiblemente de quercetina debido al espectro UV-vis y FTIR.

## ABSTRACT

The increase in aquaculture production has been associated with ecological and pathological problems, with the latter causing concern in the aquaculture sector, as bacterial infections can lead to significant losses. The use of antibiotics is intended to be reduced, as many of these treatments have significant restrictions in aquaculture production and their prolonged use causes bacterial resistance, ecological damage, and restrictions on exports. An ecological alternative is the use of medicinal plant extracts *Salvia rosmarinus* (Rosemary), *Haematoxylum brasiletto* (Brazilwood) and *Ocimum basilicum* (Basil) to combat pathogenic microorganisms in the aquaculture sector, respecting national and international regulations to produce species of interest in this sector. The plant material used was *S. rosmarinus*, *H. brasiletto* and *O. basilicum*, and the bacteria used were *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Methanolic extracts were obtained by Soxhlet method, solvent removal was carried out, and the obtained extracts underwent phytochemical profiling and antimicrobial activity determination by well diffusion. Of the extracts that show significant activity, the minimum inhibitory concentration was determined by microplate and subjected to thin-layer chromatography (TLC) for subsequent autography, which allowed the identification of possible bioactive molecules. Results: The methanolic extract with the highest yield was Brazilwood with 28.7%, while basil was the lowest with 21.7%. The phytochemical profile showed that the three extracts present similar metabolites except that Brazilian Guaiacum contains coumarins and basil does not contain alkaloids. The methanolic extract with the highest antimicrobial activity is Brazilwood with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1.8 mg/mL, which was subjected to fractionation in a Chloroform-Methanol system [7:3] and subsequent bioautography. The growth inhibition of the bacteria was observed in the fraction with a retention factor (Rf) of 0.78. The fraction of interest was subjected to phytochemical tests, where the presence of a flavonoid was observed, which can be inferred to be possibly quercetin due to the UV-vis and FTIR spectra

## 1.- INTRODUCCIÓN

El incremento de la producción acuícola está íntimamente relacionado con la problemática en el ámbito ecológico y patológico siendo de mayor relevancia los problemas patológicos en el sector acuícola. Hay diversas causas que ocasionan que los peces se inmunodepriman tales como el aumento de producción, manejo inadecuado de los peces, variaciones en las condiciones de producción, inadecuada calidad de agua y nutrición, estos factores incrementan la susceptibilidad a infecciones bacterianas (García-Pérez *et al.*, 2021).

En la acuicultura las infecciones bacterianas pueden llegar a significar grandes pérdidas, el uso de antibióticos como tratamiento aún es ampliamente utilizado, aunque se está intentando reducir su uso ya que muchos de estos antibióticos se han restringido en la producción acuícola debido a que ocasionan un incremento en la resistencia con el uso prolongado, genera daños en la ecológica, se limitan las exportaciones por remanentes en los tejidos de los peces y afección a la salud humana (Karunasagar *et al.*, 1994; Soto-Rodríguez *et al.*, 2008).

Por tal motivo se ha intensificado la búsqueda de estrategias para combatir infecciones ocasionadas por diversos microorganismos, dentro de las cuales se encuentran las plantas medicinales debido a que hay reportes de investigaciones realizadas en el área de salud humana y animal. Actualmente se ha incrementado la demanda de derivados de plantas que permitan controlar el desarrollo de microorganismos patógenos, debido a que las plantas producen metabolitos secundarios que impiden el desarrollo de los microorganismos (Syahidah *et al.*, 2015; Vatfák *et al.*, 2014).

Dado lo anterior, se considera importante realizar este estudio para generar una estrategia en la producción acuícola y ecológica para ayudar a controlar la presencia de patógenos. En esta investigación se propone evaluar la actividad e identificar parcialmente las moléculas activas en los extractos de *S. rosmarinus* (romero), *H. brasiletto* (Palo de Brasil) y *O. basilicum* (Albahaca) sobre cepas patógenas de importancia en acuicultura.

## **2.- ANTECEDENTES**

### **2.1.- Importancia de la acuicultura**

La acuicultura es importante por varias razones, en primer lugar, es uno de los métodos más eficientes y sostenibles a nivel mundial para producir proteínas de buena calidad. Además, con el pronóstico de que la población mundial se incrementará en más de 2 mil millones de habitantes en el 2050, la acuicultura requiere cerrar la brecha entre la oferta y la demanda a largo plazo, mientras hace todo lo posible para disminuir las actividades de pesca silvestre (Nutreco Company, 2023).

La acuicultura ha experimentado un incremento significativo a nivel nacional y mundial en las últimas décadas. A nivel global, la producción acuícola continental, para el año 2020, fue de 54.4 millones de toneladas, representando un 44.4% de la producción acuícola total mundial (FAO, 2022b). En 2020, el 49% del consumo mundial de pescado y mariscos se cultivó en lugar de capturarse, frente al 13% de 1990 y el 26% de 2000 (Mena, 2022).

En el año 2020, la producción global de acuicultura alcanzó las 122.6 millones de toneladas, evidenciando un crecimiento de 6.7 millones de toneladas respecto al registro de 115.9 millones de toneladas en 2018. En términos de valor económico, se calculó que la industria generó un total de 281,500 millones de dólares estadounidenses en 2020, lo que representa un aumento de 18,500 millones de USD en comparación con los datos de 2018, y un incremento de 6,700 millones de USD en relación con 2019.(FAO, 2022b).

En México, la acuicultura ha cobrado gran importancia en los últimos 15 años debido a la derrama económica y permite mejorar la calidad de vida de las comunidades por los empleos que genera. La producción de peces en el país incrementó de tres a 20 millones en los últimos 10 años, especialmente en la producción de especies de agua dulce con un crecimiento anual de 14%. La acuicultura se lleva a cabo en más de 250 granjas distribuidas en 23 estados, siendo el principal Morelos con un total de 30 millones de peces anuales (Fideicomiso de Riesgo Compartido, 2016; Hydro Environment, 2016).



## **2.2.- Bacterias de importancia en la producción de tilapia**

Como se ha mencionado anteriormente, la producción de tilapia se ha incrementado significativamente en los últimos años, especialmente en países como México, sin embargo, el aumento de la producción de tilapia también ha llevado a un aumento en la prevalencia de enfermedades producidas por patógenos.

Las enfermedades bacterianas son importantes en la acuicultura de tilapia, ya que pueden generar pérdidas de hasta el 100% del cultivo producido. Algunas bacterias patogénicas de la tilapia se desarrollan a temperaturas de 20 a 30°C, y pueden ser zoonóticas, es decir, también son peligrosas para los humanos, especialmente cuando presentan lesiones en la piel y están inmunocomprometidos (Milthon, 2023b).

Un estudio realizado en Guatemala, reporta que las familias bacterianas de mayor prevalencia son: Aeromonadaceae, Pseudomonadaceae, Pasteurellaceae, Aerococcaceae, Comamonadaceae, Streptococcaceae, Alteromonadaceae y Enterobacteriaceae, las cuales pueden llegar a presentar una mortalidad entre el 20% y 30%, y en algunos casos más graves hasta el 90% (García-Pérez *et al.*, 2021).

Las pérdidas en la producción de tilapias por bacterias patógenas representan un riesgo para la sustentabilidad de este cultivo. El Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa (CESASIN) estima que existen pérdidas de 50% en el lote por mortalidad causadas por infecciones bacterianas. De acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación la cifra llega a 3,000 toneladas de producción de tilapia, con un valor promedio de 54 millones de pesos (Soto-Rodríguez *et al.*, 2008).

En los sistemas acuícola las bacterias Gram negativas, en gran parte, son las que ocasionan el síndrome de la septicemia hemorrágica bacteriana, en cuanto a las bacterias Gram positivas en su mayoría ocasionan infecciones granulomatosas (García-Pérez *et al.*, 2021).

La estreptococosis se posiciona como uno de los principales desafíos infecciosos en la cría de tilapias (*Oreochromis spp.*), siendo catalogada como una enfermedad de gran relevancia y que ha resurgido en la industria piscícola (Sandoval Mirafuentes, 2019). Esta

enfermedad se considera como la de mayor impacto económico en los centros acuícolas de tilapia en el mundo, se estima que anualmente hay una derrama económica encima de los 150 millones de dólares asociado a esta bacteria a nivel mundial (Proaqua, 2021). La estreptococosis puede ser causada por diferentes bacterias del género *Streptococcus* sp., en la cual está incluida *Staphylococcus aureus*.

La Septicemia Hemorrágica Bacteriana es provocado por bacterias del género *Pseudomonas*, la cual puede provocar pérdidas desde el 5% hasta el 100% en tilapias cultivadas en agua dulce y salobre (Soto-Rodríguez, 2009). La gravedad de la infección variará según la salud inmunológica de los peces. En situaciones extremas, las bacterias pueden invadir varios órganos, interrumpiendo funciones vitales y eventualmente causando la muerte. (Proaqua, 2021).

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria patógena que causa enfermedades significativas en la tilapia, esta bacteria es responsable de pérdidas económicas considerables en la acuicultura comercial (Thomas *et al.*, 2014), aunque no se cuente con un registro exacto en cuestión económicas, se sabe que la mortalidad puede llegar hasta un 90%.

En la producción de tilapia, *P. aeruginosa* ha sido identificada como una de las bacterias patógenas que pueden afectar a esta especie. En un estudio realizado en Kenia, se encontró que *P. aeruginosa* fue el tercer patógeno más prevalente en tilapia, después de *Proteus* spp. y *Staphylococcus aureus* (Mumbo *et al.*, 2023).

*Salmonella* es una bacteria patógena que puede afectar a la producción de tilapia, causando enfermedades y mortalidad en estos peces. A pesar de que la infección por *Salmonella* puede manifestarse con pocos signos clínicos de enfermedad, los brotes en la acuicultura comercial de tilapia pueden desencadenar una infección grave, llegando incluso a ocasionar la muerte de hasta el 80% de los ejemplares afectados.(FAO, 2022a)

Un estudio realizado en Costa Rica encontró la presencia de *Salmonella* sp. en la tilapia, lo que confirmó la contaminación fecal de las aguas donde se cría la tilapia. (Morales *et al.*, 2004). Este hallazgo es relevante para la salud pública, ya que la presencia de *Salmonella* en los alimentos puede causar enfermedades en los humanos.

En Malasia, se reportó que la prevalencia de *E. coli* y *Salmonella* sp. en tilapia era del 44.5% y 0.6% respectivamente. En el agua de los estanques de tilapia, la presencia de estas bacterias era del 100% y 15.7% respectivamente (Dewi *et al.*, 2022).

*Escherichia coli* es una bacteria que puede ser patógena para la tilapia, esta ha sido aislada de tilapias aparentemente sanas, lo que sugiere que puede ser parte de la microflora normal de estos peces. Sin embargo, también puede causar enfermedades, lo que puede llevar a pérdidas económicas significativas en la acuicultura (Pié, 2021).

En México, se ha encontrado *E. coli* en tilapias y en el agua de los estanques donde se crían. En un estudio realizado en Sinaloa, se encontró *E. coli* en 48 de las muestras analizadas (Báez Flores *et al.*, 2022). Aunque no se proporcionan datos específicos sobre la mortalidad causada por *E. coli*, se sabe que las enfermedades bacterianas pueden causar altas tasas de mortalidad en esta especie.

### **2.3.- Uso de antibióticos en la acuicultura**

El uso de antibióticos en granjas acuícolas es una práctica común para prevenir y tratar enfermedades bacterianas en los organismos acuáticos cultivados. Los antibióticos más utilizados en la industria acuícola a nivel mundial incluyen tetraciclina, oxitetraciclina, ácido oxolínico, flumequina, sarafloxacin, enrofloxacin, amoxicilina, eritromicina, sulfadimetoxina, ormetoprima y florfenicol (Milthon, 2023a)

En muchos países desarrollados, como Estados Unidos, la Unión Europea, Canadá y Noruega, la mayoría de los antibióticos aprobados pueden comprarse y utilizarse solo por prescripción y bajo la dirección de un profesional calificado. Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos es muy frecuente, especialmente en países menos desarrollados.

El uso de antibióticos en la acuicultura presenta varios riesgos, uno de los más importantes es la generación de resistencia a los antibióticos, que puede dificultar el tratamiento de enfermedades bacterianas comunes en las granjas acuícola. Además, los residuos de antibióticos pueden permanecer en el ambiente durante meses (FAADA, 2020)

La resistencia a los antimicrobianos es un problema creciente en la producción animal, incluyendo la acuicultura. El mal uso y el uso excesivo de antimicrobianos en la producción agropecuaria está acelerando este proceso (OMS, 2022). En muchos lugares, los antibióticos son utilizados sin un uso apropiado en animales de producción, y a menudo se administran sin supervisión profesional. Este uso indebido de los antibióticos puede contribuir a la generación de bacterias resistentes. La resistencia a los antibióticos no sólo dificulta el tratamiento de las enfermedades en los peces, sino que también puede tener implicaciones para la salud humana, ya que las bacterias resistentes pueden transferirse a los humanos a través del consumo de pescado contaminado.

En un estudio realizado en tilapias cultivadas en jaulas, se encontró que el 50% de las 198 cepas de *S. aureus* aisladas eran resistentes a la meticilina (MRSA) (Hernández *et al.*, 2018). En México, la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina es alta, con una frecuencia de cepas resistentes que oscila entre el 50% y el 85% (Miranda, 2011). La presencia de bacterias resistentes a múltiples fármacos en peces de cultivo es motivo de preocupación debido al riesgo de propagación de resistencia a nivel mundial.

En la gestión de *P. aeruginosa*, la resistencia a los antibióticos está incrementando, ya que esta bacteria muestra resistencia intrínseca a múltiples familias de antibióticos y tiene la capacidad de adquirir resistencia a prácticamente cualquier antibiótico disponible. (Díaz Santos *et al.*, 2022). Por ejemplo, en Guatemala solo existen dos antibióticos registrados para su uso en la producción de tilapia: oxitetraciclina y florfenicol, sin embargo, se ha observado resistencia a la oxitetraciclina (García-Pérez *et al.*, 2021).

En México, se encontró que *P. aeruginosa* mostró altos índices de resistencia a antibióticos como la ampicilina, ceftriaxona y cloranfenicol, con el 100% de los aislados resistentes. Además, se observó que las bacterias eran multirresistentes, ya que resistieron entre 8 y 11 compuestos distintos (Gutiérrez *et al.*, 2017)

Un estudio en Cuba encontró que la *Salmonella* presentó resistencia a varios antibióticos, incluyendo ceftazidima, cloranfenicol y tetraciclina (Puig Peña *et al.*, 2019). Este patrón de multirresistencia es preocupante, ya que limita las opciones de tratamiento para las infecciones causadas por esta bacteria.

*Escherichia coli* puede adquirir resistencia a varios antibióticos, lo que complica su control en la acuicultura. Un estudio realizado en el noroeste de México encontró cepas de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos, incluyendo aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprima (Magaña-Lizárraga *et al.*, 2022)

Para combatir la resistencia a los antibióticos, es necesario tomar medidas a nivel global. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha emitido una alerta epidemiológica global solicitando a los Estados Miembros que tomen medidas para prohibir el uso de ciertos antimicrobianos como profilácticos y promotores del crecimiento en la cría de animales (OMS, 2022).

Estos hallazgos sugieren que la presencia de bacterias patógenas, tales como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. representan un desafío significativo para la producción de tilapia tanto a nivel nacional como mundial.

#### **2.4.- Uso de plantas como alternativa verde**

La resistencia a los antibióticos en la acuicultura es un problema creciente que ha llevado a la búsqueda de alternativas naturales para combatir las bacterias patógenas. El uso de plantas medicinales en la acuicultura tiene una larga historia, aunque la investigación formal en este campo es relativamente reciente. Las plantas medicinales han sido utilizadas por diversas culturas alrededor del mundo durante miles de años, tanto para consumo humano como animal. Sin embargo, ha habido poca investigación sobre el uso de plantas medicinales en la acuicultura y existen pocos remedios comerciales para su uso en la acuicultura a gran escala.

Las plantas medicinales ofrecen una serie de beneficios para la salud, que incluyen propiedades antibacterianas y antifúngicas, así como la capacidad de equilibrar las hormonas y apoyar los sistemas inmunológico y digestivo. Se ha demostrado que las plantas medicinales poseen efectos antibacterianos significativos, y se cree que compuestos como los fenoles, polisacáridos, proteoglicanos y flavonoides desempeñan un papel crucial en la prevención y control de las infecciones bacterianas. (Kolkovski, 2016).

En la acuicultura, se ha demostrado que las plantas medicinales pueden tener efectos antiestresantes, promotores del crecimiento, estimuladores del apetito, tónicos, inmunopotenciadores y antimicrobianos (Pérez *et al.*, 2014). El uso de estos extractos de plantas en la acuicultura podría reducir la dependencia de los antibióticos, disminuyendo así la presión selectiva que conduce a la resistencia a los antibióticos. Además, los extractos de plantas pueden tener menos efectos secundarios y ser más sostenibles y económicos que los antibióticos convencionales.

*Salvia rosmarinus*, también conocida como *Rosmarinus officinalis* (Kew Science, 2022), es una planta de hojas fragantes, perennes y de color verde, que produce flores azul blanquecinas. Es nativa del Mediterráneo, así como del norte y sur de África y Asia Occidental, y se encuentra en muchos lugares del planeta, especialmente en suelos secos o moderadamente húmedos. El romero puede alcanzar una altura de 1 a 2 metros. No tolera suelos anaeróbicos o muy mojados, pero sí los de salinidad media. Su período de floración suele ser entre mayo y junio, mientras que el de fructificación ocurre durante la primavera y el verano. (Ali *et al.*, 2019; Basheer, 2023; Borges *et al.*, 2019).

El romero ha despertado interés en los campos alimentario y farmacéutico debido a sus propiedades antimicrobianas. Se utiliza por sus efectos como antimicrobiano natural, con la extracción de sus hojas siendo un método común. Un estudio realizado en Bolivia evaluó la eficacia antimicrobiana del extracto oleoso crudo de romero sobre *Escherichia coli*, revelando que el romero contiene más de 40 principios antibacterianos y más de 20 antivíricos. Entre sus componentes se encuentran terpenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, pequeñas cantidades de alcaloide rosmaricina y aproximadamente un 2% de aceite esencial. Este estudio concluyó que el extracto de romero posee compuestos activos con efectos antimicrobianos sobre bacterias asociadas a la contaminación alimentaria. (Montero Recalde *et al.*, 2017). Además, se conoce que su aceite esencial y extractos son antimicrobianos con propiedades antioxidantes, antihelmínticos, antifúngicos, antiinfecciosos, entre otros más (Basheer, 2023; Gomes *et al.*, 2020).

La actividad antimicrobiana en el aceite esencial del romero es atribuida principalmente al  $\alpha$ -pineno, el acetato de bornilo, el alcanfor y el 1,8-cineol (Ebrahimi *et al.*, 2020).

*Haematoxylum brasiletto* conocido comúnmente como "Palo de Brasil", es una especie de árbol de madera dura tropical en la familia de las leguminosas, crece en las selvas bajas caducifolias y bosques entre los 100 msnm y los 1000 msnm, en terrenos abiertos de suelos someros y pedregosos y en espinoso de 3 m a 10 m de alto con el tronco profundamente acanalado (Ávila-Calderón & Rutiaga-Quiñones, 2014). Esta planta es nativa de México y se utiliza en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones, incluyendo infecciones y úlceras gástricas (Bello-Martínez *et al.*, 2017)

El extracto acuoso del duramen es reconocido como un antibiótico efectivo, mientras que el extracto metanólico de la corteza es inhibidor de bacterias y levaduras (Ávila-Calderón & Rutiaga-Quiñones, 2014).

En la investigación realizada por Rivero, los resultados indicaron que el extracto inhibió el crecimiento de ocho de los microorganismos probados a una concentración límite de 128 µg/mL (Rivero-Cruz, 2008).

Además, otro estudio realizado en Perú encontró que el extracto metanólico de *Haematoxylum brasiletto* mostró actividad contra cepas de *Clostridium perfringens* y *Vibrio cholerae* (Cano & Saucedo, 2023). Lo que proporciona información de referencia prometedora para el uso potencial de los extractos de *H. brasiletto*, así como algunos de los compuestos aislados en el tratamiento de infecciones bacterianas.

*Ocimum basilicum*, comúnmente conocida como albahaca, es una planta que ha sido utilizada en la medicina tradicional en muchas culturas debido a sus propiedades medicinales. En particular, la albahaca ha demostrado tener actividad antimicrobiana.

*O. basilicum* es una planta con un color verde intenso, un aroma aromático y un sabor picante. Sus tallos son cuadrangulares y tienen hojas pecioladas, opuestas, de forma ovalada, generalmente dentadas y ligeramente vellosas en los nervios. Las hojas tienen un ápice agudo y la base es redondeada. (Sánchez *et al.*, 2000).

Un estudio realizado en India evaluó la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Ocimum basilicum* contra varias bacterias patógenas, incluyendo aislados de *Staphylococcus*. Los resultados indicaron que el extracto inhibió el crecimiento de estas bacterias (Pabón Baquero *et al.*, 2023).

Cáceres nos menciona que el aceite esencial de *O. basilicum* es activo contra patógenos como bacterias y hongos (Cáceres, 1996)

Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de los aceites esenciales para inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos patógenos, lo que los convierte en una fuente potencial de interés. (Beltrán *et al.*, 2013).

Además, un estudio en la Universidad de Cádiz, se encontró que el extracto metanólico de *Ocimum basilicum* mostró actividad antimicrobiana contra una variedad de bacterias, lo que sugiere su potencial aplicación en el control de enfermedades bacterianas en la acuicultura (Márquez, 2018).

Las plantas de romero, palo de Brasil y albahaca ha demostrado tener actividad antimicrobiana en varios estudios, lo que sugiere que podría tener aplicaciones potenciales en la acuicultura para el control de infecciones bacterianas. Además, la tendencia hacia la producción verde en la industria acuícola ha aumentado a nivel global, ya que está estrechamente relacionada con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas.

Se relaciona con el ODS 3, que nos habla sobre Salud y Bienestar, al reducir la dependencia de los antibióticos y prevenir la resistencia a estos. Además, contribuye al ODS 12 (Producción y Consumo Responsables), al promover prácticas de acuicultura más sostenibles y reducir el impacto ambiental de la industria al disminuir el uso desmedido de fármacos para prevenir enfermedades en la producción. Aunado a esto el uso de extractos de plantas en la acuicultura puede contribuir al ODS 14 (Vida Subacuática), al mejorar la salud de los ecosistemas acuáticos y reducir la contaminación del agua por antibióticos y otros productos químicos.



### 3.- JUSTIFICACIÓN

La producción acuícola se ha incrementado tanto en México como a nivel mundial y con ello el área de sanidad animal. La búsqueda de alternativas para el control de infecciones bacterianas en acuicultura la cual produce pérdidas económicas considerables. Para combatirlas se utilizan antibióticos, los cuales con el uso prolongado de estos ocasionan resistencia bacteriana, provocando restricciones en la exportación por presencia de residuos en los tejidos y su posible riesgo en la salud del consumidor.

Una alternativa amigable con el medio ambiente son los extractos de plantas medicinales (*S. rosmarinus*, *H. brasiletto* y *O. basilicum*) para combatir microorganismos patógenos en el sector acuícola, respetando las normas nacionales e internacionales para la producción de especies de interés en este sector.

#### **4.- HIPÓTESIS**

Los extractos metanólicos de plantas utilizadas en la medicina tradicional *Salvia rosmarinus*, *Haematoxylum brasiletto* y *Ocimum basilicum* presentan actividad bactericida sobre microorganismos patógenos en la producción de *Oreochromis niloticus*.

## **5.- OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad bactericida e identificar parcialmente las fracciones bioactivas de tres plantas medicinales para su aplicación en el control bactericida en acuicultura.

### **5.1.- Objetivos particulares**

1. Obtener los extractos metanólicos por el método Soxhlet de 3 plantas medicinales *S. rosmarinus*, *H. brasiletto* y *O. basilicum*.
2. Obtener el perfil fotoquímico de los extractos en estudio.
3. Evaluar la actividad bactericida de los extractos obtenidos por el método de difusión en pozo sobre cepas de importancia en la producción de tilapia.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos metanólicos estudiados de mayor bioactividad en el método de difusión en pozo.
5. Fraccionar por cromatografía el o los extractos de mayor bioactividad.
6. Evaluar las fracciones bioactivas por bioautografía.
7. Identificar parcialmente el (los) compuestos bioactivos por reacciones químicas y técnicas espectroscópicas.

## 6.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico

- Material vegetal

Se seleccionaron tres plantas medicinales de uso tradicional de la casa comercial PACALLI®.

Tabla 1: Material vegetal

Nombre científico	Nombre común
<i>Salvia rosmarinus</i>	Romero
<i>Haematoxylum brasiletto</i>	Palo de Brasil
<i>Ocimum basilicum</i>	Albahaca

- Bacterias en estudio

Se seleccionaron bacterias Gram negativas como Gram positivas.

Tabla 2: Bacterias de importancia en la producción de tilapias

	Nombre científico	Cepa
Gram negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado clínico
	<i>Escherichia coli</i>	25922 ATCC
	<i>Salmonella typhimurium</i>	14028 ATCC
Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923 ATCC

### 6.2.- Obtención de extractos metanólicos

Se pesaron 300 g de material vegetal seco y molido, se colocaron en un equipo Soxhlet con 500 mL de metanol hasta agotar la extracción. Al extracto obtenido se le eliminó el solvente con ayuda de un rotavapor. Cada extracto crudo se llevó a sequedad completa en una estufa de secado a una temperatura menor de 50 °C. Posteriormente, se determinó su rendimiento y se almacenó en frascos, hasta su uso. (D'Sousa' Costa *et al.*, 2015).

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{(g \text{ extracto seco})(100)}{g \text{ de la planta seca}}$$

### **6.3.- Perfil fitoquímico (García-González, 1992)**

#### **6.3.1.- Esteroles y Triterpenos**

Se disolvió 1 mg de la muestra en cloroformo, posterior se le agregó una gota del reactivo Liebermann-Burchard. Como resultado positivo para esteroles es la aparición de un color azul/morado, mientras que para triterpenos es un color rojizo.

#### **6.3.2.- Cumarinas**

Se disolvió 1 mg del extracto en hidróxido de sodio al 10% en agua, si vira a una coloración amarilla y desaparece al acidular el medio, la prueba se considera positiva.

#### **6.3.3.- Sesquiterpenlactonas**

realizó mediante la prueba de Baljet, en donde se pesó 2 mg del extracto, y se añadieron 3 a 4 gotas del reactivo, se considera positivo cuando se forma una coloración anaranjada o roja oscura.

#### **6.3.4.- Quinonas**

Se pesó 1 mg del extracto disuelto en etanol, se añadió ácido sulfúrico y se tornó de color rojo, es positivo si al añadir hidrosulfito de sodio al 5% se decolora y se regenera el color al agregar gotas de agua oxigenada al 30%.

#### **6.3.5.- Saponinas**

A 2 mg de la muestra se le agregó 1 mL de agua en un tubo de ensaye, y se sacudió vigorosamente, si se forma una espuma abundante y esta no desaparece en unos segundos, la prueba puede considerarse positiva.

#### **6.3.6.- Flavonoides**

Se realizó la prueba de Shinoda, se disolvió 1 mg del extracto en 1 mL de etanol agregando unas gotas de Ácido Clorhídrico concentrado, posterior a esto se agregaron 2-

3 limaduras de magnesio, el positivo para esta prueba es cuando la solución torna a un color rojo intenso.

### **6.3.7 Taninos**

La prueba de cloruro férrico consistió en disolver 2 mg de la muestra en 1 mL de etanol, agregando 2-3 gotas de cloruro férrico al 5% en etanol, tomando una coloración verde oscura o negra como positivo.

### **6.4.8.- Carbohidratos**

En la prueba llamada Antrona, se colocaron 2 mg de la muestra en un tubo de ensaye disuelta en agua, por las paredes del tubo, se dejó resbalar la solución de Antrona al 0.2% en Ácido Sulfúrico concentrado, se considera positivo si en la interface aparece un anillo de tonalidad azul-verdosa o violeta.

### **6.4.9.- Alcaloides**

Para esta prueba se realizó una cromatoplaca del extracto, con un sistema de Cloroformo:Metanol [7:3], y se utilizó el reactivo de Dragendorff como agente revelador, al asperjar el reactivo sobre la placa, si se observan puntos de tonalidad naranjas, se considera positivo.

## **6.4.- Determinación de la actividad antibacteriana**

Con los extractos ya obtenidos, se llevaron a cabo pruebas para determinar la actividad antimicrobiana sobre las bacterias previamente mencionadas utilizando el método de difusión en placa. El ensayo microbiológico se realizó mediante el método de difusión en placa en pozo.

### **6.4.1.- Método de difusión en pozo**

En este método, se colocaron sobre una placa con medio Muller Hinton previamente inoculada con 100 µL de una suspensión bacteriana, y se realizaron pocillos de 6 mm de diámetro a los cuales se les agregaron 100 µL de cada uno de los extractos a diferente concentración. Como control se utilizaron 100 µL del solvente empleado para disolver el extracto. La placa se incubó durante 24 h a 37 °C; después de este período se

midieron los halos de inhibición del crecimiento expresados en mm para cada extracto, en el cual se restó la medida del radio del pozo (Sánchez-García *et al.*, 2016).

#### **6.4.2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

El extracto que presentara mayor actividad de inhibición por el método de difusión en pozo se le determinó la CMI. En una microplaca de 96 pozos se agregaron 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana, y se añadieron 100  $\mu$ L de cada una de las muestras de los extractos con su dilución seriada y llevada a 1:50 (20  $\mu$ L de extracto + 980  $\mu$ L de medio de cultivo). Posteriormente la microplaca se incubó por 24 h a 37 °C. Para determinar la concentración mínima inhibitoria de cada una de las fracciones se tomó la lectura de la absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 540 nm, la concentración más baja en la cual la absorbancia fue igual a la del blanco se consideró como la CMI de las diluciones probadas (Clinical and Laboratory Standards Institute, 1999; Drummond & Waigh, 2000).

#### **6.5.- Cromatografía en capa fina**

Aquellos extractos que se obtuvieron resultados positivos se llevó a un fraccionamiento, utilizando una cromatografía en capa fina (TLC), se utilizó sistemas de solventes de menor a mayor polaridad, siendo cloroformo y metanol los que se eligieron en una proporción de 7:3. Las placas de vidrio para TLC fueron de 25 x 75 mm con sílica gel sin indicador de fluorescencia; una vez obtenidas las cromatoplas se revelaron con luz UV y con cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), para obtener las relaciones de frente de las bandas que se separaron.

#### **6.6.- Bioautografía**

Las cromatoplas se esterilizaron con luz UV por 30 min en una campana de flujo laminar colocada dentro de una caja de Petri, luego sobre la cromatoplas se colocó una tira de Agar Muller Hinton mismo que se inoculó con 100  $\mu$ L de la solución estandarizada de bacterias ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL); a la caja Petri se le colocó su tapa y se llevó a incubar 24 h a 37 °C. Luego de este período se observó el crecimiento o zonas de inhibición. Esta

inhibición en zonas específicas nos permitió identificar las posibles moléculas bioactivas (García-Hernández, 2016).

### 6.7.- Fraccionamiento de los extractos activos

Al extracto metanólico de *Haematoxylum brasiletto* se le realizó el fraccionamiento con los solventes: Hexano, Alcohol Isopropílico, Benceno, Acetona, Cloroformo y Metanol, basándonos en la polaridad de cada uno de ellos se utilizó el solvente más adecuado, esperando que resulte una fracción insoluble y otra soluble, continuando con las fracciones solubles se probó algunos de los solventes anteriores para encontrar con cual precipita y seguir repitiendo la misma técnica (Figura 1) para finalmente realizar las actividades biológicas de cada una de las particiones, realizando las pruebas químicas correspondiente a la fracción que nos llegara a dar mayor actividad y tener idea del tipo de compuesto químico que lleve dicha fracción.

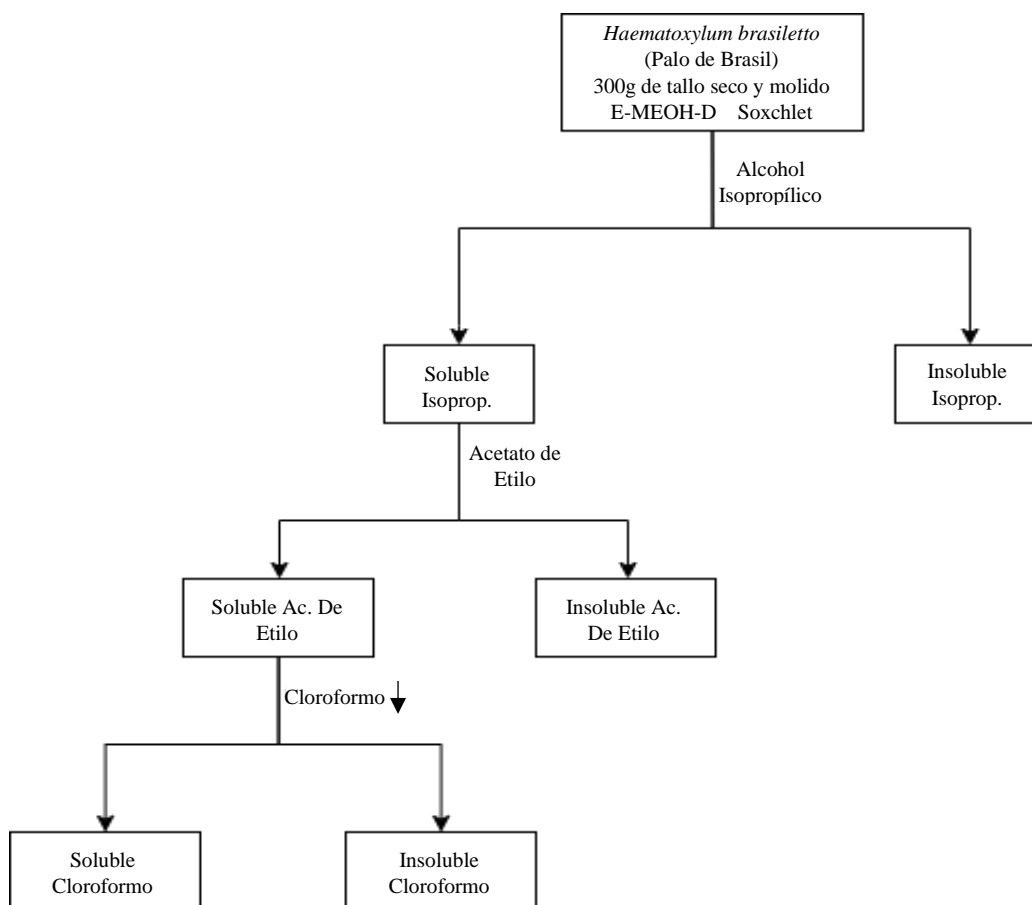


Fig. 1: Marcha de fraccionamiento de extracto bioactivo



## **6.8.- Elucidación parcial de los compuestos bioactivos**

Para realizar la elucidación parcial se utilizaron reacciones químicas (referidas anteriormente) y métodos de espectroscopía, Infrarroja y Ultravioleta-visible.

### **6.8.1.- Espectroscopía Ultravioleta visible**

se basa en la absorción de radiación ultravioleta y visible por moléculas. Esta técnica permite detectar y cuantificar una amplia variedad de compuestos, identificar grupos funcionales en moléculas, la longitud de onda es de entre 200 y 800 nm (Toledo, 2022), la muestra se disolvió en etanol absoluto y se utilizó el equipo HPLC-DAD-ELSD, Agilent Technologies, 1200 Series Agilent HPLC System.

### **6.8.2.- Espectroscopía Infrarrojo**

La espectroscopía infrarroja (IR) se fundamenta en que la mayoría de las moléculas absorben la luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, lo que las lleva a vibrar molecularmente. Esta absorción es distintiva de los enlaces químicos presentes en una muestra, lo que permite identificar y analizar la estructura molecular de manera precisa (Bruker, 2024). La fracción activa purificada se llevó a espectrometría IR en un espectrómetro Frontier FT-IR 97668 de la marca PerkinElmer, la muestra fue disuelta en acetona. Los datos fueron analizados en el software PerkinElmer Spectrum Versión 10.4.00.

## 7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas utilizadas se obtuvieron comercialmente por PACALLI®. Con respecto al porcentaje de rendimiento se logró observar que el extracto metanólico de palo de Brasil fue el que mostró mayor rendimiento con 28.7%, mientras que el extracto metanólico de albahaca fue el menor con 21.7% (Tabla 3). Se ha observado que los extractos obtenidos por el método de extracción Soxhlet pueden tener una mayor actividad biológica en comparación con otros métodos de extracción (Taborda *et al.*, 2019). Se decidió utilizar metanol para la extracción debido a que se encontró que el rendimiento de los extractos de Soxhlet obtenidos con metanol fue mayor que el de los obtenidos con otros solventes, como el hexano y el acetato de etilo (Taborda *et al.*, 2019).

Tabla 3: Rendimiento de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.

<b>Planta</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>% Rendimiento</b>
Romero	Hojas	27.9
Palo de Brasil	Corteza	28.7
Albahaca	Hojas	21.7

El perfil fitoquímico para el Palo de Brasil es positivo para triterpenos, sesquiterpeno, quinonas, flavonoides, taninos, azúcares y alcaloide, mientras que para el romero presenta el mismo perfil con la excepción de que es negativo para triterpenos y positivo para esteroides y cumarinas. La albahaca presenta metabolitos de esteroides, cumarinas, sesquiterpeno, quinonas, flavonoides, taninos y azúcares (Tabla 4).

Para el extracto del romero, lo reportado coincide con lo mencionado por Ali, que los componentes que confieren las propiedades farmacológicas del romero pueden agruparse en las categorías de flavonoides, terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos) y derivados hidroxycinámicos (Ali *et al.*, 2019). En otro estudio se reportaron resultados similares, en donde mencionan que Los dos principales constituyentes activos son los flavonoides y los terpenos. Los flavonoides incluyen diosmetina, diosmina, hispidulina, apigenina, luteolina, entre otros (Flores-Villa *et al.*, 2020).

En el caso del extracto de palo de Brasil, existe una investigación similar en donde se determinó la presencia de taninos, flavonoides, quinonas, lactonas, sesquiterpenlactonas, cumarinas, esteroides y terpenos (Pablo-Alvarado, 2018), como metabolitos secundarios. En otro estudio, sobre plantas medicinales de mayor uso en Julián Blanco, Guerrero, México, identificó la presencia de alcaloides, terpenos, flavonoides, cumarinas y triterpenos en *Haematoxylum brasiletto* (Sotelo-Leyva *et al.*, 2022). El único metabolito que difiere con lo obtenido son las cumarinas ya que en este estudio fue negativo, esta variabilidad en los perfiles fitoquímicos posiblemente es debido a diferencias en las condiciones de crecimiento de la planta, así como también el solvente utilizado para la extracción.

Por último, para el extracto de albahaca existe una discrepancia con los metabolitos secundarios obtenidos por (Arrieta, 2020) ya que menciona que la albahaca es positiva para saponinas y negativa para taninos, mientras que aquí se observó lo contrario. Mientras que (Salas *et al.*, 2022) nos mencionan que los compuestos fenólicos, flavonoides y taninos son algunos de los metabolitos secundarios más destacados en la albahaca, lo cual coincide con lo reportado en esta investigación.

Tabla 4: Perfil fitoquímico de los extractos en estudio

Prueba	Extr. PB	Extr. R	Extr. A
<b>Liebermann-Burchard</b>	+	+	+
T: Triterpenos	T	E	E
E: Esteroides			
<b>Cumarinas</b>	-	+	+
<b>Baljet</b> (Sesquiterpenos)	+	+	+
<b>Quinonas</b>	+	+	+
<b>Saponinas</b>	-	-	-
<b>Shinoda</b> (Flavonoides)	+	+	+
<b>Taninos</b>	+	+	+
<b>Antrona</b> (Azúcares/Carbohidratos)	+	+	+
<b>Dragendorff</b> (Alcaloides)	+	+	-

Positivo (+); Negativo (-); Extr. PB: Palo de Brasil; Extr. R: Romero; Extr. A: Albahaca

El extracto metanólico de palo de Brasil presentó mayor actividad en bacterias como *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *S. typhimurium* en comparación con los extractos de romero y albahaca, mientras que para *S. aureus* presentó una mayor inhibición con el extracto de romero, lo cual podemos observar en la tabla 5.

Tabla 5: Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos en estudio

Microorganismos	Halo de Inhibición (mm)		
	Ext. Palo de Brasil	Ext. Romero	Ext. Albahaca
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 ± 0.8	<b>5.25 ± 0.5</b>	5.0 ± 0.8
<i>Escherichia coli</i>	<b>4.75 ± 0.5</b>	1.25 ± 0.5	4.5 ± 0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>3.5 ± 0.5</b>	2.75 ± 0.5	0.25 ± 0.5
<i>Salmonella typhimurium</i>	<b>3.75 ± 0.5</b>	1.75 ± 0.5	3.75 ± 0.5

(Promedio ± desviación estándar de 4 repeticiones)

En la figura 2,3 y 4 se observan los halos de inhibición del extracto de Palo de Brasil sobre *E.coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* respectivamente, los resultados son comparables con estudios similares que reportaron actividad del extracto metanólico de la corteza de *Haematoxylum brasiletto*, contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros (Rivero-Cruz, 2008). Así mismo en 2016 se reportó actividad antimicrobiana de *H. brasiletto* contra *E. coli* en alimentos (García-Heredia *et al.*, 2016).

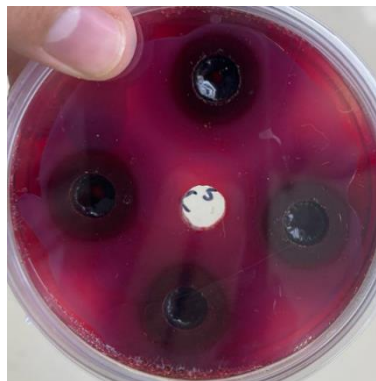


Fig. 2: Extracto de *H. brasiletto* vs. *E. coli*



Fig. 3: Extracto de *H. brasiletto* vs. *P. aeruginosa*



Fig. 4: Extracto de *H. brasiletto* vs. *S. typhimurium*

En el caso del extracto de romero, se observó una mayor actividad antimicrobiana en *S. aureus* con un halo de 5.25 mm (Figura 5) mientras que para las demás bacterias oscila entre 1.25 mm y 2.75 mm, lo cual concuerda con un estudio en donde los extractos de romero tiene actividad antimicrobiana en cepas Gram positiva (Solano *et al.*, 2016). El extracto metanólico de romero cuenta de manera clara con compuestos activos de efectos antimicrobianos sobre bacterias (Castaño *et al.*, 2010).



Fig. 5: Extracto de *S. rosmarinus* vs. *S. aureus*

En comparación de los extractos antes mencionados, la albahaca fue el que menor efecto antimicrobiano presentó en las 4 bacterias puestas a ensayo, obteniendo un halo de 0.25 mm para *P. aeruginosa* (Figura 6), teniendo una oscilación hasta de 5 mm para *S. aureus*, aún por debajo en comparación con el extracto de romero. Estos resultados obtenidos difieren con un estudio relacionado a al mismo género de la planta de albahaca

en donde las hojas de la especie *O. gratissimum* actuó tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas con halos de entre 16 mm y 17 mm (Nakamura *et al.*, 1999).

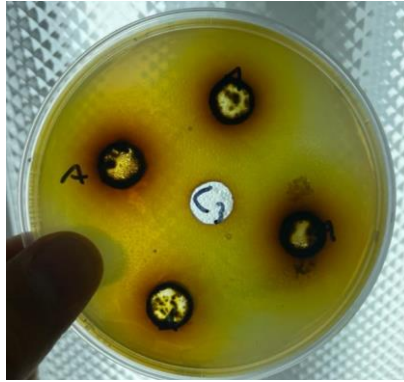


Fig. 6: Extracto de *O. basilicum* vs. *P. aeruginosa*

El extracto metanólico de Palo de Brasil mostró una CMI de 1.8 mg/mL contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *S. typhimurium*, mientras que para *S. aureus* tuvo una CMI de 2.5 mg/mL (Figura 7).

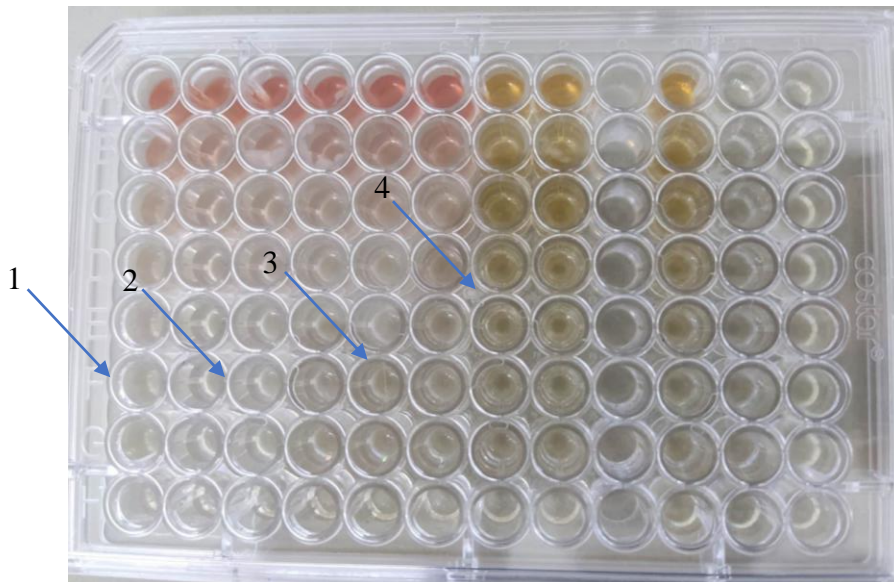


Fig. 7: Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria; (1) *E. coli*; (2) *P. aeruginosa*; (3) *S. typhimurium*; (4) *S. aureus*.



Se realizó cromatografía en capa fina (Figura 8) con una serie de eluentes para analizar qué sistema era el más apropiado para el fraccionamiento de cada extracto obtenido, en el caso del romero (1) y albahaca (3) se utilizó Benceno:Acetona [8:2] y para el extracto de palo de Brasil (2) se utilizó Cloroformo:Metanol [7:3].

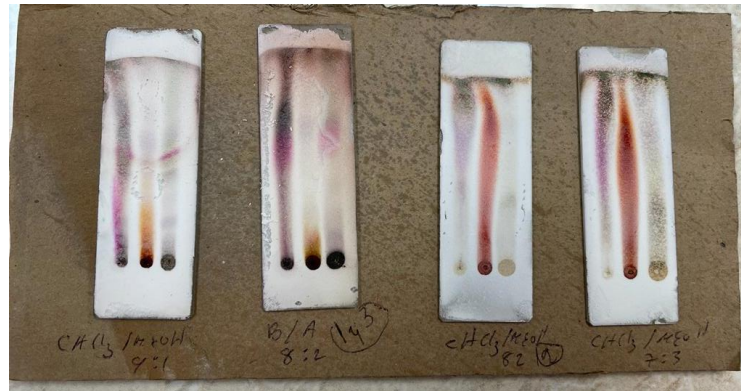


Fig. 8 Cromatografías en diferentes sistemas

Se realizaron placas cromatográficas (Figura 9) en un sistema Cloroformo:Metanol [7:3] de los 3 extractos para someterlos a estudio con las bacterias en cuestión. Los resultados de esta prueba confirmaron que el palo de Brasil es el que presenta un mayor efecto antimicrobiano sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* y *S. aureus*.

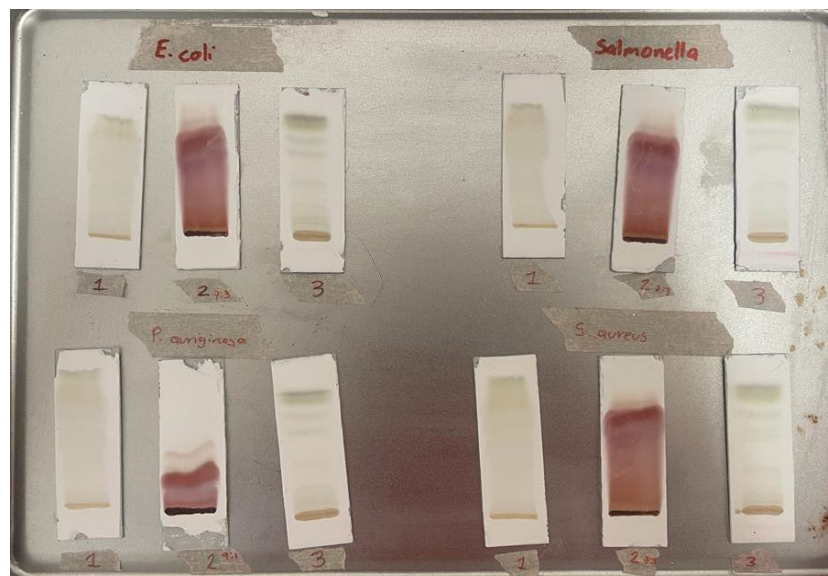


Fig. 9: Placas cromatográficas (1) *S. rosmarinus*, (2) *H. brasiletto*, (3) *O. basilicum*

Con los resultados obtenidos de estas pruebas, se observó en que parte del corrido de los extractos se presentó el efecto de inhibición. En la figura 10 se evaluó la placa de extracto de Palo de Brasil con *E. coli*, y en la figura 11 podemos observar la placa del extracto de Palo de Brasil puesto a prueba contra *P. aureginosa*, teniendo como resultado un efecto antimicrobiano en la fracción 2. Dicha fracción es de importancia en este estudio presenta un Rf de 0.78 en un sistema de Cloroformo:Metanol (7:3), el cual corresponde al compuesto Terpeno obtenido por pruebas fitoquímicas.



Fig. 10: Extracto de *H. brasiletto* vs. *E. coli*



Fig. 11: Extracto de *H. brasiletto* vs. *P. aureginosa*

Al realizar el fraccionamiento directo para el extracto de palo de Brasil. Como primer solvente se utilizó alcohol isopropílico, en donde se obtuvo dos particiones, la parte soluble e insoluble, se realizó el filtrado y llevado a sequedad completa, y se pesó. Posteriormente se utilizó acetato de etilo en la parte soluble en isopropanol para volver a obtener dos particiones, se repitió el filtrado, se secó y pesó. La parte soluble en acetato de etilo se utilizó para una precipitación con cloroformo, primero la fracción se solubiliza con acetona, se calienta hasta punto de ebullición e inmediatamente agregar cloroformo



para cristalizar y obtener dos fracciones, los pesos obtenidos de los precipitados se encuentran en la Figura 12.

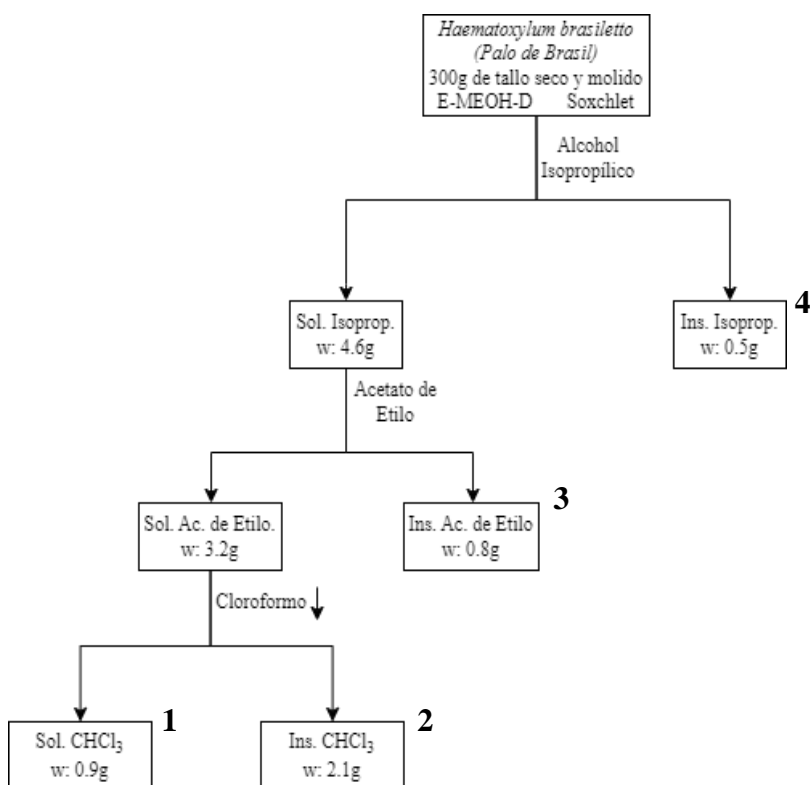


Fig. 12: Fracciones de extracción

Al realizar el fraccionamiento del extracto, de cada partición obtenida, se evaluó por autobiografía su actividad antimicrobiana. De las 4 fracciones evaluadas se observó que la fracción es la que presenta actividad en la inhibición de las bacterias en estudio.

La partición 2 obtenida es un polvo de color café soluble en acetona o metanol, se realizó las pruebas fitoquímicas y se obtuvo positivo para flavonoide, posterior a esto se realizó la confirmación de la actividad presente y se obtuvo inhibición en *E. coli*, en la figura 13 se puede observar la zona donde no presentó crecimiento bacteriano el cual es el más susceptible ya que es el que presentó mayor área de inhibición, después se encuentra la actividad contra *P. aureginosa* (Figura 14), mientras que la inhibición de *S. typhimurium* (Figura 15) y *S. aureus* (Figura 16) se observa en menor cantidad, a pesar de esto, se cuenta con la actividad.



Fig. 13: Extr.  
*H. brasiletto*; Fracc. 2  
vs. *E. coli*



Fig. 14: Extr.  
*H. brasiletto*; Fracc. 2  
vs. *P. aureginosa*



Fig. 15: Extr.  
*H. brasiletto*; Fracc. 2  
vs. *S. aureus*



Fig. 16: Extr.  
*H. brasiletto*; Fracc. 2  
vs. *S. typhimurium*

Se realizó una espectroscopia ultravioleta visible de la fracción 2 del extracto de Palo de Brasil, en donde se obtuvo una banda en 260 nm, como se observa en la figura 17.

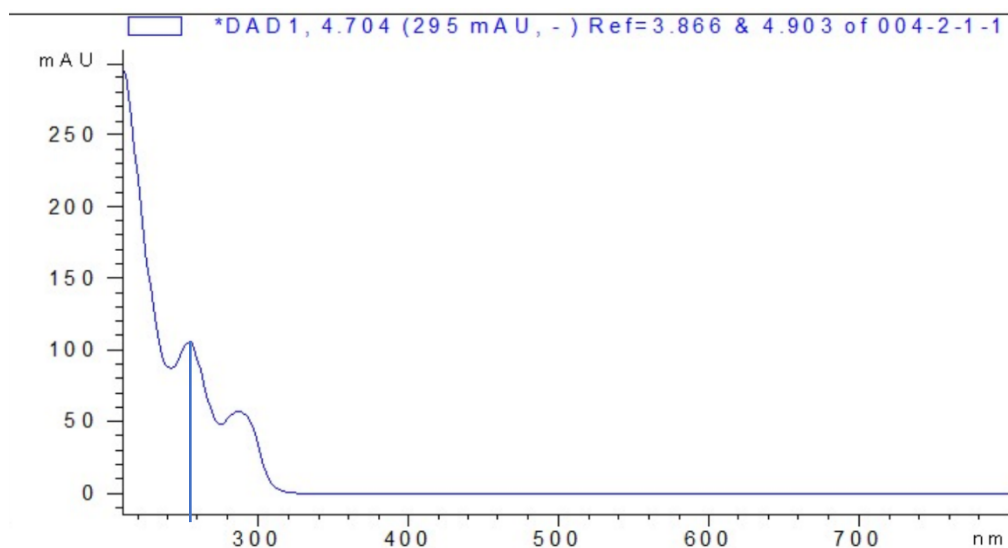


Fig. 17: Espectro UV-vis de la fracción 2 del Extr. *H. brasiletto*

Una investigación en 2015 se centró en analizar flavonoides y obtuvieron un de espectro UV-vis donde caracterizaron la quercetina y obtuvieron una banda en 255.8139 nm como se puede observar en la figura 18 (Tallini *et al.*, 2015), la cual podemos comparar que el espectro obtenido de la fracción 2 es similar con el de Tallini y colaboradores.

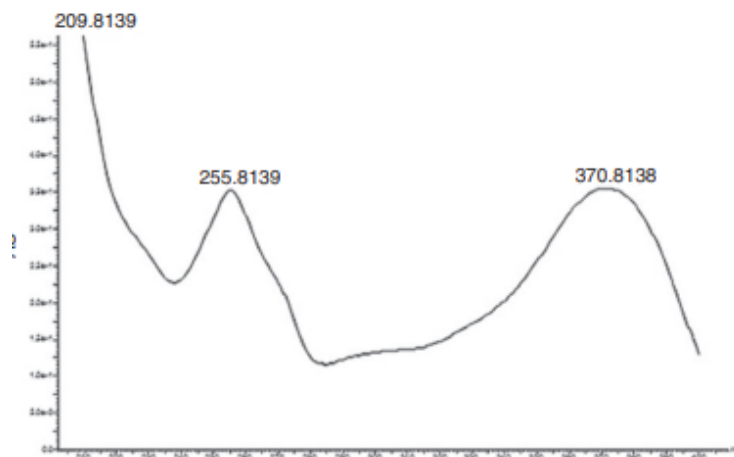


Fig. 18: Espectro UV-vis de Quercetina

Al realizar una espectroscopía Infrarroja (Figura 19), se observó un pico en  $3400\text{ cm}^{-1}$ , la cual se puede observar un pico similar en un espectro FTIR realizado con quercetina pura, obtuvieron un pico en  $3406\text{ cm}^{-1}$  que representa los grupos funcionales -OH, otra coincidencia en el espectro FTIR obtenido de la fracción 2 y el espectro de quercetina pura es en el pico  $1610\text{ cm}^{-1}$ ,  $1560\text{ cm}^{-1}$  y  $1510\text{ cm}^{-1}$ , los responsables de estos picos es el grupo de los anillos aromáticos presentes en la quercetina (Catauro *et al.*, 2015).

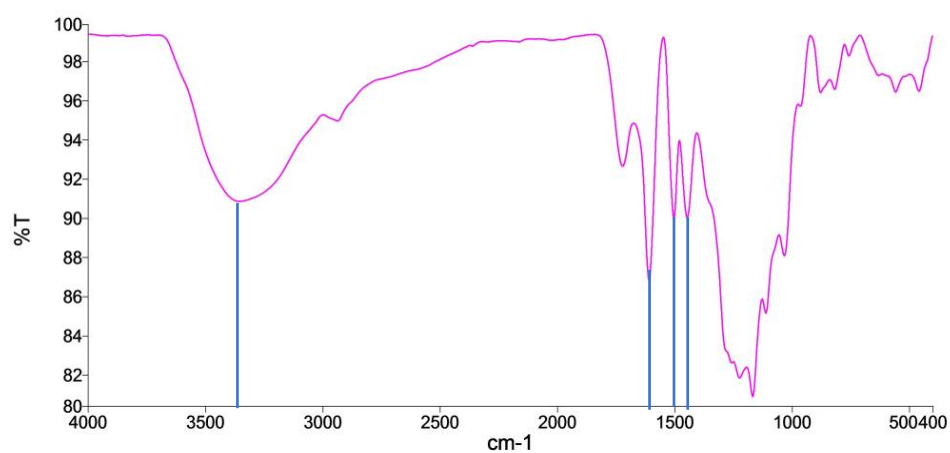


Fig. 19: Espectro IR de la fracción 2 del Extr. *H. brasiletto*

## 8.- CONCLUSIÓN

Se obtuvieron los tres extractos de las plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana, obteniendo el mayor rendimiento para el extracto metanólico de Palo de Brasil con 28.7%, mientras el menor rendimiento fue de 21.7% para albahaca.

Se observó que los tres extractos presentan metabolitos similares con excepción en el Palo de Brasil que presenta con cumarinas y en la albahaca no cuenta con alcaloides.

El extracto metanólico que presentó mayor actividad antimicrobiana es el de *H. brasiletto* contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *S. typhimurium*. con un CMI de 1.8 mg/mL y para *S. aureus* se obtuvo un CMI de 2.5 mg/mL.

Se determinó que la fracción 2 de TLC del extracto de *H. brasiletto* es el responsable de la actividad antimicrobiana con un RF de 0.78, al realizar la partición directa se concluyó que la fracción 2 es de importancia debido a la actividad antimicrobiana presente, el perfil fitoquímico de la fracción determinó que corresponde a un flavonoide.

Con la ayuda de la prueba cuantitativa Shinoda, los espectros Ultravioleta-Visible e Infrarrojo de la fracción 2, se pudo realizar la identificación parcial de la molécula bioactiva responsable de la actividad antimicrobiana, la cual se puede inferir que puede corresponder a quercetina.

## **9.- PERSPECTIVA**

El avance de este proyecto abre nuevas posibilidades para el desarrollo de opciones innovadoras en el tratamiento de enfermedades que afectan al sector acuícola. Se ha demostrado que las moléculas bioactivas de las plantas en estudio tienen un efecto significativo sobre las bacterias patógenas, lo cual se podrían utilizar como una alternativa natural y sostenible a los antibióticos en la acuicultura.

Además, este estudio podría contribuir a la química verde y a la medicina, ya que la identificación de nuevas moléculas bioactivas podría llevar al desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos así evitando la resistencia a antibióticos y evitar pérdidas económicas en el sector industrial.

De igual manera, es importante continuar con estudios donde se apliquen otros métodos espectroscópicos para elucidar la estructura del compuesto bioactivo.

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

- Ali, A., Chua, B. L., & Chow, Y. H. (2019). An insight into the extraction and fractionation technologies of the essential oils and bioactive compounds in *Rosmarinus officinalis* L.: Past, present and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 338–351. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.040>
- Arrieta, E. J. (2020). Fitoquímica de *Ocimum campechianum* (albahaca), *Cnidioscolus aconitifolius* (árnica) y *Lippia alba* (quitador), en Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 25(2).
- Ávila-Calderón, L. E. A., & Rutiaga-Quiñones, J. (2014). Componentes químicos de la madera y la corteza de *Haematoxylum brasiletto* Karsten (Leguminosae). *Madera y Bosques*, 20(2), 153–158. <https://doi.org/10.21829/myb.2014.202171>
- Báez Flores, M. E., Magaña Lizárraga, A., & Valenzuela Armenta, A. (2022). ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN EL CULTIVO DE LA TILAPIA *Oreochromis spp.* EN EL ESTADO DE SINALOA, MÉXICO Y USO DE HERRAMIENTAS NGS PARA LA CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE CEPAS BACTERIANAS RECOBRADAS EN GRANJAS ACUÍCOLAS. <https://www.was.org/MeetingAbstracts/ShowAbstract/155987>
- Basheer, A. (2023). Effect of alcoholic extract of *rosmarinus* against some type of *entrobacteriaceae*. *Tikrit Journal of Pure Science*, 23(7), 18–21. <https://doi.org/10.25130/tjps.v23i7.689>
- Bello-Martínez, J., Jiménez-Estrada, M., Rosas-Acevedo, J. L., Avila-Caballero, L. P., Vidal-Gutierrez, M., Patiño-Morales, C., Ortiz-Sánchez, E., & Robles-Zepeda, R. E. (2017). Antiproliferative activity of *Haematoxylum brasiletto* H. Karst.

*Pharmacognosy Magazine*, 13(Suppl 2), S289–S293.

[https://doi.org/10.4103/pm.pm\\_466\\_16](https://doi.org/10.4103/pm.pm_466_16)

Beltrán, M. C., Maldonado, M. P. C., & Castaño, A. M. V. (2013). *Actividad antibacteriana de los aceites obtenidos de Ocimum basilicum L. var. Cinammom, O. album, O. thrysiflorum, para uso potencial en fitocosmética*. 15(27).

Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., & Carvalho, J. C. T. (2019). Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038>

Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Cano, W., & Saucedo, M. (2023). *Proyecto de Tesis 8 | PDF | Antimicrobiano | Las bacterias*. Scribd. <https://es.scribd.com/document/588882456/PROYECTO-DE-TESIS-8-3>

Castaño, H. I., Ciro G., G., Zapata M., J. E., & Jiménez R., S. L. (2010).

BACTERICIDAL ACTIVITY OF ETHANOLIC LEAF EXTRACT AND LEAF ESSENTIAL OIL OF *Rosmarinus officinalis* L. ON SOME FOODBORNE BACTERIA. *Vitae*, 17(2), 149–154. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.6334>

Catauro, M., Papale, F., Bollino, F., Piccolella, S., Marciano, S., Nocera, P., & Pacifico, S. (2015). Silica/quercetin sol–gel hybrids as antioxidant dental implant materials. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(3), 035001. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/035001>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (1999). *M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline*.



- Dewi, R. R., Hassan, L., Daud, H. M., Matori, Mohd. F., Nordin, F., Ahmad, N. I., & Zakaria, Z. (2022). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Vibrio* Derived from Farm-Raised Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis spp.*) and Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*, Bloch 1970) on the West Coast of Peninsular Malaysia. *Antibiotics*, *11*(2), 136.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11020136>
- Díaz Santos, E., Mora Jiménez, C., del Río-Carbajo, L., & Vidal-Cortés, P. (2022). Treatment of severe multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Medicina Intensiva (English Edition)*, *46*(9), 508–520.  
<https://doi.org/10.1016/j.medine.2022.06.014>
- Drummond, A. J., & Waigh, R. D. (2000). The development of microbiological methods for phytochemical screening. *Recent Research Developments in Phytochemistry*, *4*, 143–152.
- D'Sousa' Costa, C. O., Ribeiro, P. R., Loureiro, M. B., Simões, R. C., de Castro, R. D., & Fernandez, L. G. (2015). Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. *Pharmacognosy Magazine*, *11*(43), 607–614. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.160459>
- Ebrahimi, E., Haghjou, M., Nematollahi, A., & Goudarzian, F. (2020). Effects of rosemary essential oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture*, *521*, 734909.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734909>

- FAADA. (2020). *El uso de antibióticos en la acuicultura está fuera de control*.  
Fundación FAADA. <https://faada.org/actualidad-1342-el-uso-de-antibioticos-en-la-acuicultura-esta-fuera-de-control>
- FAO. (2022a). *Perfil de riesgo—Estreptococo del grupo B (EGB) / Streptococcus agalactiae tipo de secuencia (ST) 283 en pescado de agua dulce*. FAO.  
<https://doi.org/10.4060/cb5067es>
- FAO. (2022b). *Producción acuícola*. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Fideicomiso de Riesgo Compartido. (2016). *Acuicultura, actividad de gran importancia*. gob.mx. <http://www.gob.mx/firco/articulos/acuicultura-actividad-de-gran-importancia>
- Flores-Villa, E., Sáenz-Galindo, A., Castañeda-Facio, A. O., Narro-Céspedes, R. I., Sáenz-Galindo, A., Castañeda-Facio, A. O., & Narro-Céspedes, R. I. (2020). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): Su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266>
- García-González, S. (1992). *Estudio Químico de Cnidocolus urens*. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. ITESM.
- García-Heredia, A., García, S., Merino-Mascorro, J. Á., Feng, P., & Heredia, N. (2016). Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 59, 124–132.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.001>
- García-Hernández, D. G. (2016). *Actividad biológica, separación, aislamiento e identificación de metabolitos activos de plantas utilizadas en la medicina*

*tradicional mexicana* [Phd, Universidad Autónoma de Nuevo León].

<http://eprints.uanl.mx/17902/>

- García-Pérez, J., Ulloa-Rojas, J. B., & Mendoza-Elvira, S. (2021). Patógenos bacterianos y su resistencia a los antimicrobianos en los cultivos de tilapia en Guatemala. *Uniciencia*, 35(2), 46–59. <https://doi.org/10.15359/ru.35-2.4>
- Gomes, P. G., Veloso, A. F., Maynard, I. F., Marques, M. N., Souza, R. L., Pereira, M. M., Soares, C. M., & Lima, Á. S. (2020). Integrative process to extract chlorophyll and purify rosmarinic acid from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(5), 1503–1510. <https://doi.org/10.1002/jctb.6343>
- Gutiérrez, O., Navarro, L., & Loeza, P. (2017). *Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en Pseudomonas aeruginosa potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola*. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-07052017000200097&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-07052017000200097&script=sci_arttext)
- Hernández, A., Yagüe, G., Vázquez, E. G., Simón, M., Parrado, L. M., Canteras, M., & Gómez, J. (2018). Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: Factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(2), 123–130.
- Hydro Environment. (2016, agosto 11). *¿CUÁL ES LA IMPORTANCIA DE LA ACUICULTURA EN MÉXICO?* <https://hidroponia.mx/cual-es-la-importancia-de-la-acuicultura-en-mexico/>

- Kew Science. (2022). *Salvia rosmarinus* Spenn. / *Plants of the World Online* / Kew Science. Plants of the World Online.  
<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:457138-1>
- Kolkovski, S. (2016). *Medicina verde en Acuicultura*.  
<https://aquafeed.co/entrada/medicina-verde-en-acuicultura-20325/>
- Magaña-Lizárraga, J. A., Gómez-Gil, B., Rendón-Maldonado, J. G., Delgado-Vargas, F., Vega-López, I. F., & Báez-Flores, M. E. (2022). Genomic Profiling of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Surface Water of Agricultural Drainage in North-Western Mexico: Detection of the International High-Risk Lineages ST410 and ST617. *Microorganisms*, *10*(3), 662.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10030662>
- Márquez, J. G. (2018). *SELECCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES COMO INHIBIDORES DE BACTERIAS PATÓGENAS DE PECES Y UTILIZACIÓN EN ACUICULTURA*.
- Mena, M. (2022, noviembre 25). *Infografía: La acuicultura representa la mitad del suministro mundial de pescado*. Statista Daily Data.  
<https://es.statista.com/grafico/28823/produccion-mundial-estimada-de-la-pesca-y-la-acuicultura>
- Milthon. (2023a, febrero 28). *¿Cuáles son las alternativas al uso de antibióticos en la acuicultura?* <https://aquahoy.com/cuales-son-alternativas-uso-antibioticos-acuicultura/>
- Milthon. (2023b, junio 19). *Enfermedades bacterianas de la tilapia y su potencial zoonótico*. <https://aquahoy.com/enfermedades-bacterianas-tilapia-potencial-zoonotico/>

- Miranda, M. (2011). Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 68(4), 262–270.
- Montero Recalde, M. A., Martínez Jiménez, J. A., Avilés Esquivel, D. F., Valle Velástegui, E. L., & Pazmiño Miranda, N. D. P. (2017). Efecto antimicrobiano del extracto crudo oleoso de *Rosmarinus Officinalis* sobre cepa de *Escherichia coli*. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(2), 168–175.
- Morales, G., Blanco, L., Arias, M. L., & Chaves, C. (2004). Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(4), 433–437.
- Mumbo, M. T., Nyaboga, E. N., Kinyua, J., Muge, E. K., Mathenge, S. G. K., Muriira, G., Rotich, H., Njiraini, B., & Njiru, J. M. (2023). Prevalence and antimicrobial resistance profile of bacterial foodborne pathogens in Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) at points of retail sale in Nairobi, Kenya. *Frontiers in Antibiotics*, 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frabi.2023.1156258>
- Nakamura, C. V., Ueda-Nakamura, T., Bando, E., Melo, A. F. N., Cortez, D. A. G., & Dias Filho, B. P. (1999). Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 675–678. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000500022>
- Nutreco Company. (2023). *¿Por qué es importante la acuicultura?* Skretting. <https://www.skretting.com/es-ec/transparencia-y-confianza/preguntas-frecuentes/Por-que-es-importante-la-acuicultura/>
- OMS. (2022). *Resistencia Antimicrobiana en Producción Animal—OPS/OMS / Organización Panamericana de la Salud.*

<https://www.paho.org/es/panaftosa/resistencia-antimicrobiana-produccion-animal>

Pablo-Alvarado, M. K. (2018). *Caracterización del extracto de Haematoxylum brasiletto encapsulado en hidroxapatita para evaluar su efecto cicatrizante.*

<https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/7774>

Pabón Baquero, L., Granados Flórez, J., Velasco, W. J., Rodríguez Álvarez, M. F., & Hernández-Rodríguez, P. (2023). Actividad antimicrobiana de extractos de plantas frente a Staphylococcus aislados de pacientes con conjuntivitis bacteriana. *Revista Ciencias de la Salud*, 21(1), 1–14.

<https://doi.org/10.12804/revistas.urosario.edu.co/revsalud/a.10242>

Pérez, R., Romeu, B., Lastre, M., Morales, Y., Cabrera, O., Reyes, L., González, E., & Sifontes, S. (2014). *Inmunopotenciadores para la acuicultura.*

Pié, J. (2021). *El cultivo de tilapia a nivel mundial y patologías más importantes.*

Veterinaria Digital - Avicultura, Porcicultura, Rumiantes y Acuicultura.

<http://https%253A%252F%252Fwww.veterinariadigital.com%252Farticulos%252Fel-cultivo-de-tilapia-a-nivel-mundial-y-patologias-mas-importantes%252F>

Proaqua. (2021, abril). *Principales enfermedades bacterianas en criaderos comerciales de peces en latinoamérica.* ProAqua México | Proveedora de Insumos Acuícolas, S.A. de C.V. <https://proaqua.mx/blog-y-noticias/principales-enfermedades-bacterianas-en-criaderos-comerciales-de-peces-en-latinoamrica/>

Puig Peña, Y., Leyva Castillo, V., Aportela López, N., Camejo Jardines, A., Tejedor Areas, R., Puig Peña, Y., Leyva Castillo, V., Aportela López, N., Camejo

Jardines, A., & Tejedor Areas, R. (2019). Resistencia antimicrobiana en bacterias

aisladas de pescados y mariscos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(3), 500–512.

Rivero-Cruz, J. F. (2008). Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 99–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.005>

Salas, L., Moncayo, M., & Borroel, V. (2022). *Composición fitoquímica y actividad antioxidante en tres variedades de albahaca por efecto de distintos solventes / Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*.  
<https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/3267>

Sánchez, E., López, I. M. L., Hernández, L. F., & Ferrada, R. (2000). *ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE OCIMUM BASILICUM L.*

Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S. L., & García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En C. Rivas-Morales, M. A. Oranday-Cárdenas, & M. J. Verde-Star, *Investigación en plantas de importancia médica* (1a ed., pp. 77–100). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.334>

Sandoval Mirafuentes, H. (2019). *ESTREPTOCOCCOSIS EN TILAPIAS (Oreochromis spp)*. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/105419>

Solano, X. K., Silva, T. J. M., & Gutiérrez, M. I. Z. (2016). Inhibición del streptococcus mutans, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* “romero”. *Revista Odontología*, 18(2), Article 2.

Sotelo-Leyva, C., Tagle-Emigdio, L. J., Aniceto-Teofilo, C., Galeana-Hernández, J., Condori-Cordero, S., Flores-Blanco, G., & Salinas-Sánchez, D. O. (2022). Estudio etnofarmacológico y fitoquímico de las plantas medicinales de mayor

- uso en Julián Blanco, Guerrero, México. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 8(1).  
<https://doi.org/10.30973/aap/2022.8.0081012>
- Soto-Rodríguez, S. (2009). Calidad del agua y bacterias presentes en tilapia cultivada. *Fundación Produce Sinaloa, A.C.*
- Soto-Rodríguez, S., Gil, B. G., & Lozano, R. (2008). MICs to antibiotics of *Vibrio* spp. Isolated from *L. vannamei* cultivated in Mexico. *Panorama Acuícola*, 14(1), 52–57.
- Taborda, B., Telles, I., Pareja, L., Niell, S., Jesús, F., & López, A. (2019). Comparación de diferentes métodos de extracción para la determinación del perfil lipídico en semillas de quinoa. *INNOTEC*, 17, 78–87.
- Tallini, L. R., Pedrazza, G. P. R., Bordignon, S. A. D. L., Costa, A. C. O., Steppe, M., Fuentefria, A., & Zuanazzi, J. A. S. (2015). Analysis of flavonoids in *Rubus erythrocladus* and *Morus nigra* leaves extracts by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(3), 219–227.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.04.003>
- Thomas, J., Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Acharya, K., Shinge, D., Seelan, T. S. J., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2014). Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in *Oreochromis mossambicus* and treatment using lime oil nanoemulsion. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 116, 372–377.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.019>
- Toledo, M. (2022). *Espectroscopia ultravioleta-visible: Conceptos básicos*.  
[https://www.mt.com/mx/es/home/applications/Application\\_Browse\\_Laboratory\\_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html](https://www.mt.com/mx/es/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html)