



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Evaluación del efecto antibacteriano del extracto de  
*Salvia officinalis* L. en 7 bacterias de importancia  
médica.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**CHAVEZ MAYA DIANA**

**ASESORES:**

**MVZ. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ**

**MVZ. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA**

**MC. SOFÍA GONZÁLEZ GALLARDO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Estimado profesor **Gerardo** desde el día que llegue al laboratorio y me recibió con mucho cariño desde ese momento me sentí parte de su equipo, con usted aprendí mucho, mil gracias!

Maestra **Sofía** me la pase muy bien, gracias por enseñarme, pero sobre todo gracias por brindarme de su valioso tiempo ya que se que Microscopia no es nada fácil y solo con la ayuda de una experta como usted pude lograrlo.

Un agradecimiento especial a **Mario Arturo** y **Brígida** por sus grandes observaciones y se muy bien que son grandiosos en su materia y nadie podrá igualarlos me llevo un gran recuerdo de ustedes.

Maestra **Leti** gracias por ser tan linda conmigo =)

Profesora **Beatriz** aunque no la conocí mucho me demostró ser una persona muy responsable gracias!

Queridas chicas! **Nelly, Bere, Lulú, Ale** y **Sra. Erika** les agradezco mucho su amistad me la pase muy bien en el laboratorio!

## DEDICATORIAS

*Querido Papá tú siempre creíste en mí, siempre estuviste apoyándome en todo momento, Mami siempre me brindaste mucho cariño y me dabas consejos por eso los amo y esta tesis es para ustedes!*

*Mis queridísimos hermanos la queridita y el nano son muy importantes para mí gracias por estar toda esta vida a mi lado, póngale ganas a su escuela!*

*A mi tíos Alejandro, Leticia y Maru por escucharme y tener esperanzas en mí, por quererme y apoyarme, y se que esto también los hace feliz como a mí.*

*Tía Paty tu has demostrado ser un excelente y responsable medico, gracias por ser linda y cuidarnos, esta tesis también es tuya.*

*Gracias a mis abuelos que siempre fueron acogedores y se preocupaban por mí y mi familia los quiero mucho.*

*A todos mis tíos Rene Sergio y Gama tengo un buen recuerdo de ustedes!*

*Queridos amigos July, Bety, Yadira, Miguel y Karina gracias por hacerme pasar buenos tiempos, muy divertidos dentro y fuera de la facultad y sobre todo por escucharme!*

*Y no creas que me olvide de ti querido Hugo Axel, no encuentro palabras en como explicarte que te adoro, me ayudaste mucho en esta tesis mas de lo que todos se imaginan, en este tiempo que llevamos juntos todo ha sido genial, gracias por tu apoyo, cariño y comprensión TQM!*

## ÍNDICE

Figuras y Tablas.....	VI y VII
Abreviaturas.....	IX
Resumen.....	X
1. Introducción.....	1
1.1. Infecciones bacterianas.....	2
1.2. Herbolaria.....	2
2. Generalidades de <i>Salvia officinalis</i> L.....	3
2.1. Descripción.....	3
2.2. Hábitat.....	4
2.3.Recolección.....	6
2.4. Composición química de <i>Salvia officinalis</i> L.....	6
2.5. Componentes del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> .....	6
2.6. Propiedades medicinales de <i>Salviaofficinalis</i> .....	7
2.7. Uso tradicional.....	7
2.8.Contraindicaciones.....	7
2.9. Efectossecundarios.....	8
3.Justificación.....	9
4.Objetivo general.....	10
4.1. Objetivos particulares.....	10
5. Plan General de Trabajo.....	11
6. Materiales y Equipo.....	12
7. Metodología experimental.....	13
7.1. Obtención e identificación de cepas.....	13

7.2. Obtención del extracto de <i>Salvia officinalis</i> L.....	13
7.3. Esterilización del extracto de <i>Salvia officinalis</i> L.....	14
7.4. Prueba cualitativa para visualizar el crecimiento de las cepas bacterianas.....	14
7.5. Prueba bactericida–bacteriostática empleando diferentes diluciones del extracto de <i>S. officinalis</i> .....	16
7.6. Prueba cuantitativa de Mosmann.....	17
7.7. Microscopia electrónica de transmisión (MET).....	19
7.7.1. Preparación del material biológico para MET.....	19
7.7.2. Preparación de las rejillas con membranas fomvar.....	21
7.7.3. Tinción Negativa.....	22
8. Resultados.....	23
8.1. Prueba cualitativa para evaluar susceptibilidad.....	23
8.2. Ensayo cuantitativo empleando MTT.....	26
8.3. Ensayo bactericida-bacteriostático.....	34
8.4. Microscopia electrónica de transmisión (MET).....	38
9. Discusión.....	41
10. Conclusiones.....	45
11. Perspectivas.....	46
12. Apéndice.....	47
13. Anexos.....	49
14. Referencias.....	54

## Índice de Tablas

Tabla 2.1. Clasificación científica de <i>Salvia officinalis</i> .....	5
Tabla 7.1. Preparación de la microplaca para el ensayo cualitativo.....	15
Tabla 7.2. Preparación de la microplaca para el ensayo cuantitativo de Mosmann.....	18
Tabla 7.3. Preparación del material biológico para Microscopia Electrónica de Transmisión.....	20
Tabla 8.1. Prueba cualitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana empleando el extracto de <i>S. officinalis</i> .....	23
Tabla 8.2.1. Resultado del ensayo en microplaca de <i>Streptococcus pyogenes</i> tratado con <i>Salvia officinalis</i> .....	25
Tabla 8.2.2. Resultado del ensayo en microplaca de <i>Streptococcus agalactiae</i> tratado con <i>Salvia officinalis</i> .....	28
Tabla 8.2.3. Resultado del ensayo en microplaca de <i>Staphylococcus aureus</i> tratado con <i>Salvia officinalis</i> .....	30
Tabla 8.2.4. Resultado del ensayo en microplaca de <i>Salmonella typhi</i> tratado con <i>Salvia officinalis</i> .....	32

## Índice de Figuras

Figura 2.1. Planta de <i>Salvia officinalis</i> .....	4
Figura 2.2. Flores de <i>Salvia officinalis</i> .....	4
Figura 7.2. Técnica de sembrado para el ensayo bactericida-bacteriostático.....	16
Figura 7.3. Tipo de rejilla para MET.....	21
Figura 7.4. Tinción negativa.....	22
Figura 8.1.1. Prueba de susceptibilidad bacteriana empleando un extracto de <i>Salvia officinalis</i> contra <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	24
Figura 8.1.2. Prueba de susceptibilidad bacteriana empleando un extracto de <i>Salvia officinalis</i> contra <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	25
Figura 8.1.3. Prueba de susceptibilidad bacteriana empleando un extracto de <i>Salvia officinalis</i> contra <i>Salmonella typhi</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
Figura 8.2.1. Representación grafica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>S. officinalis</i> en <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	27
Figura 8.2.2. Representación grafica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>S. officinalis</i> en <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	29
Figura 8.2.3. Representación grafica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>S. officinalis</i> en <i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
Figura 8.2.4. Representación grafica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de <i>S. officinalis</i> en <i>Salmonella typhi</i> .....	33
Figura 8.3.1 Representación del efecto bacteriostático de <i>S. aureus</i> tratado con <i>Salvia officinalis</i> a diferentes diluciones.....	34
Figura 8.3.2. Representación del efecto bactericida de <i>Streptococcus agalactiae</i> tratado con <i>Salvia officinalis</i> a diferentes diluciones.....	35

Figura 8.3.3. Representación del efecto bacteriostático de <i>Salmonella typhi</i> tratado con <i>Salvia officinalis</i> .....	36
Figura 8.3.4. Representación del efecto bacteriostático de <i>Streptococcus pyogenes</i> tratado con <i>Salvia officinalis</i> .....	37
Figura 8.4.1. Efecto bactericida producido a la cepa <i>Streptococcus pyogenes</i> sometida al extracto de <i>S. officinalis</i> a una concentración de 42.7 mg/mL.....	38
Figura 8.4.2. Efecto bactericida producido a la cepa <i>Streptococcus agalactiae</i> sometida al extracto de <i>S. officinalis</i> a una concentración de 42.7 mg/mL.....	39
Figura 8.4.3. Imagen de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> sometida al extracto de <i>S. officinalis</i> a una concentración de 42.7 mg/mL .....	40

## RESUMEN

Las enfermedades respiratorias, intestinales y vaginales son ocasionadas por bacterias y otros microorganismos, desde la antigüedad han surgido nuevas formas para prevenir y tratar estos padecimientos, sin embargo, como estas van en aumento, nos vemos en la necesidad de buscar nuevas alternativas, uno de los recursos más importantes es la aplicación de la herbolaria. México es un país que cuenta con una diversa variedad en climas, que permite el crecimiento de diversas plantas.

Según la literatura, *Salvia officinalis* posee muchas propiedades medicinales, y se ha demostrado experimentalmente que el aceite esencial presenta actividad antioxidante, antimicrobiana, hipoglucemiante, entre otras.

La finalidad de esta investigación es demostrar que esta planta presenta actividad bactericida y que puede ser una buena alternativa para el tratamiento de estas infecciones.

Las bacterias utilizadas fueron *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Enterobacter cloacae* las cuales fueron enfrentadas al extracto acuoso de *Salvia officinalis* a una concentración de 42.7mg/mL para evaluar la susceptibilidad, y resultó que solo el 57.14% (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*) de nuestras bacterias fueron sensibles al extracto mientras que el 42.86% (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*) no fueron inhibidas por el extracto.

Las CMI's obtenidas fueron *Streptococcus pyogenes* 2.66 mg/mL, *Streptococcus agalactiae* 5.33 mg/mL, *Staphylococcus aureus* 10.67 mg/mL, y *Salmonella typhi* 21.35 mg/mL estas concentraciones difieren de otras investigaciones, ya que dependen del clima, época del año, y zona de recolección.

La microscopia electrónica de transmisión (MET) fue una herramienta más que logró demostrar que *Salvia officinalis* ocasiono daños en la pared celular de *S. pyogenes* y *S. agalactiae*.

En base a los resultados obtenidos consideramos que el extracto de *Salvia officinalis* puede ser utilizado para la elaboración y desarrollo de una nueva forma farmacéutica segura y confiable de origen natural para tratar dichos padecimientos.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Infecciones bacterianas

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son padecimientos infecciosos de las vías respiratorias con evolución menor a 15 días y en ocasiones se complican con neumonía. Las IRA constituyen un importante problema de salud pública en México (31).

Generalmente, se manifiestan con fiebre y se localiza en el aparato respiratorio. Este está formado por una porción alta y una baja. El sector alto comprende la nariz (fosas nasales), los senos paranasales (cavidades de la cara y de la base del cráneo que se comunican con la nariz), la garganta (faringe) con las amígdalas y el oído medio. Mientras que la porción baja comprende: laringe, traquea, bronquios y pulmones (32).

Las bacterias más comunes que afectan las vías respiratorias son: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Haemophilus influenzae*.

Los *Streptococcus agalactiae* (EGB) son bacterias que se pueden encontrar en el aparato digestivo, urinario y genital de los adultos.

Una de cada cuatro o cinco mujeres embarazadas tiene estreptococos grupo B en el recto o la vagina. En una persona embarazada, una infección por EGB puede causar corioamnionitis (infección severa de las membranas placentarias) e infección postparto (después del nacimiento). Las infecciones del aparato urinario causadas por los EGB pueden provocar trabajo de parto y nacimiento prematuros.

Los bebés recién nacidos contraen la infección durante el embarazo o al pasar por el tracto genital durante el trabajo de parto y el nacimiento. Los EGB son la causa más frecuente de infecciones que ponen en peligro la vida de los recién nacidos, incluyendo la neumonía y la meningitis (36).

Las enfermedades intestinales generalmente son causadas por bacterias tan comunes como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *Shigella spp.* y *Enterobacter spp.*

Los padecimientos en el tracto intestinal también son un serio problema ya que 6 de cada 10 consultas diarias corresponden a enfermedades intestinales, de las cuales casi 60% se debe a alteraciones que inflaman estómago e intestinos, procesos conocidos como gastroenteritis.

Los sectores de la población que más se ven afectados por gastroenteritis son el infantil y la tercera edad, principalmente en los países en desarrollo, como México. Esta enfermedad por lo general se manifiesta con diarrea, fiebre y es la causa de gran número de fallecimientos, ya sea por las complicaciones del padecimiento, mal atendido, o por no haber recibido tratamiento oportuno; las estadísticas hablan de aproximadamente 4.6 millones de decesos por este mal en menores de cinco años, en los últimos cinco años. Cabe destacar que bajo el término gastroenteritis se engloban diversos tipos de irritaciones e infecciones del tracto digestivo, es decir, estómago e intestinos (33).

## **1.2. Herbolaria**

La herbolaria es un conjunto de conocimientos relativos a las propiedades curativas de las plantas, en la actualidad constituye el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana, incluso la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas públicos de salud.

Desde la antigüedad las plantas han sido utilizadas para desarrollar fármacos, cosméticos, y saborizantes, conocimientos que han sido transmitidos de una generación a otra y que en la actualidad son reconocidos e investigados a profundidad por diferentes disciplinas científicas (5).

La aplicación de la herbolaria se ha practicado tanto en prevención como en curación y es óptima por ser de origen natural.

Sin embargo, la Secretaría de Salud ha alertado a la población sobre los posibles peligros de automedicarse con plantas, esto es consecuencia de personas no profesionales sin conocimiento del área, que desconocen las reacciones adversas y secundarias por utilización indiscriminada de remedios en base a plantas, sin tomar en cuenta la dosis, duración del tratamiento o para qué casos están indicadas (13).

## 2. Generalidades de *Salvia officinalis* L.

### 2.1. Descripción

*Salvia officinalis* es una planta perenne aromática mide aproximadamente 70 cm. de altura, leñosa en la base y con los vástagos herbáceos que se renuevan todo el año, con las hojas enfrentadas y forma diversa, a veces lanceoladas, esto es, relativamente anchas o muy estrechas y blancas, por el pelo corto y espeso que las cubre, siempre sostenidas por un rabillo bastante largo y a veces con un par de orejuelas en la base de la lamina y por lo regular con fentoncitos marginales poco profundos. Las flores son de color blanco-violáceas en espigas y se agrupan en rodajuelas más o menos aproximadas en la sumidad del tallo. El cáliz es bilabiado, y tiene tres dientes en el labio superior y solo dos en el inferior (3).



Figura 2.1. Planta de *Salvia officinalis* (10).



Figura 2.2. Flores de *Salvia* (11).

En otros lugares la planta es conocida como: savia, selina o salina fina; port y gall, salva, salva-da catalunha, ervasacra, cha-da-europa, sarxa, xarxa; cat. Salvia, sáuvia; vasc., sobe (14).

La clasificación científica de *S. officinalis* se describe a continuación:

Tabla 2.1. Clasificación científica de *Salvia officinalis* L. (3).

Clasificación científica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>Salvia officinalis</i>
Nombre binomial : <i>Salvia officinalis</i> L.	

## 2.2. Hábitat

*Salvia officinalis* crece en llanuras áridas y sitios rocosos, desde el nivel del mar hasta zonas montañosas teniendo preferencia por los terrenos poco fértiles, por lo que habita comúnmente en Europa Mediterránea y América (3)

## 2.3. Recolección

Para realizar la recolección, se cortan las hojas de los brotes jóvenes o las sumidades a punto de abrir sus flores, un día despejado y durante la mañana. Posteriormente, las hojas o las flores recolectadas se desecan en la sombra (14).

## 2.4. Composición química de *Salvia officinalis* L.

Es una planta medicinal que contiene una gran cantidad de compuestos bioactivos la composición química de la planta *Salvia officinalis* varía en porcentajes dependiendo la zona y época de recolección.

Dentro de este género se encuentran: resina, fécula y albuminoides, ácido fosfórico, oxálico y nítrico, en forma de sales, cerca del 10% de pentosanas, así como pequeñas cantidades de asparagina. La planta también contiene:

Ácidos fenólicos: caféico, clorogénico, elágico, ferulico, galico y rosmarinico.

Flavonoides: 5-metoxisalvigenina, glucósidos de luteolol y apigenol.

Taninos 3-8 % hidrolizables y condensados.

Principios amargos: picrosalvina.

Diterpenos como ácido carnosico y carnosol.

Triterpenos como ácido oleanólico, ácido ursínico, uvaol, ácido betulínico, betulina (1).

## **2.5. Componentes del aceite esencial de *Salvia officinalis***

El aceite esencial esta formado principalmente por monoterpenos como:  $\alpha$ -pineno, camfeno,  $\beta$ -pineno, limoneno, p-cimeno, 1,8 cineol, linalool,  $\alpha$ -tujona,  $\beta$ -tujona, camfor, borneol, neomentol, terpinen-4-ol, myrtenol, acetato de bornil, longifoleno.

Sesquiterpenos como: longifoleno, cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, ledol, carifilinol, cariofileno oxidado, viridiflorol.

También algunos compuestos alifáticos como; pentadecano, heptadecano y eicosano.

## **2.6. Propiedades medicinales de *Salvia officinalis***

Diversas literaturas reportan que *Salvia officinalis* presenta las siguientes propiedades como: antiviral, antifungica, antioxidante, anticoagulante, anticarcinogenica, inmunoestimulante, carminativa, actividad diurética, antiespasmódica, febrífuga, hipoglucemiante, hepatoprotector, emenagoga, actividad colerética, anticolinérgica, acción estrogénica, antitusiva, antisudoral, estimulante del apetito, tónico general, astringente, cicatrizante, antiséptico, y antiinflamatorio.

## **2.7. Usos tradicionales**

*S.officinalis* ha sido recomendada para el tratamiento de: inapetencia, astenia, dispepsias hiposecretoras, disquinesias hepato biliarias, gastroenteritis, hipersudoración, diabetes, hipertensión arterial, amenorrea, dismenorrea, flatulencias, gingivitis, estomatitis, faringitis, heridas, y vulvovaginitis (15).

## **2.8. Contraindicaciones**

No se debe utilizar bajo las siguientes circunstancias: embarazo, lactancia, insuficiencia renal, tumores mamarios, estrógenodependientes, hiperfoliculinemia, tratamientos farmacológicos con estrógenos (37).

No administrar, ni aplicar tópicamente a niños menores de seis años ni a personas con alergias respiratorias o con hipersensibilidad conocida a éste u otros aceites esenciales. No prescribir formas de dosificación orales con contenido alcohólico a niños menores de dos años ni a consultantes en proceso de deshabitación etílica.

## **2.9. Efectos secundarios**

En dosis elevadas, el aceite esencial puede resultar neurotóxico y convulsivante; por vía tópica puede producir irritaciones cutáneas.

### **3. Justificación**

*Salvia officinalis* es una planta que ha sido utilizada en muchas partes del mundo debido a que posee propiedades medicinales como antimicrobianas, antioxidantes, antisudoral e hipoglucemiante.

Durante el año 2008, en el Estado de México se han reportado 3556 casos de faringitis/amigdalitis estreptocócica (6), 7537 casos de neumonía/bronco pulmonía (7), así como 314 casos de fiebre tifoidea (8) y 1378 casos de paratifoidea/salmonelosis (9). Por eso es necesario buscar un remedio alternativo de origen natural que ayude en el tratamiento de dichas infecciones, por lo tanto en el presente trabajo se empleara el extracto acuoso de *Salvia officinalis* para verificar sus propiedades bactericidas y bacteriostáticas, además de poder establecer la concentración mínima inhibitoria de cada una de nuestras bacterias, para poder desarrollar con el extracto alguna forma farmacéutica y poder ofrecer una alternativa mas para el tratamiento de infecciones bacterianas.

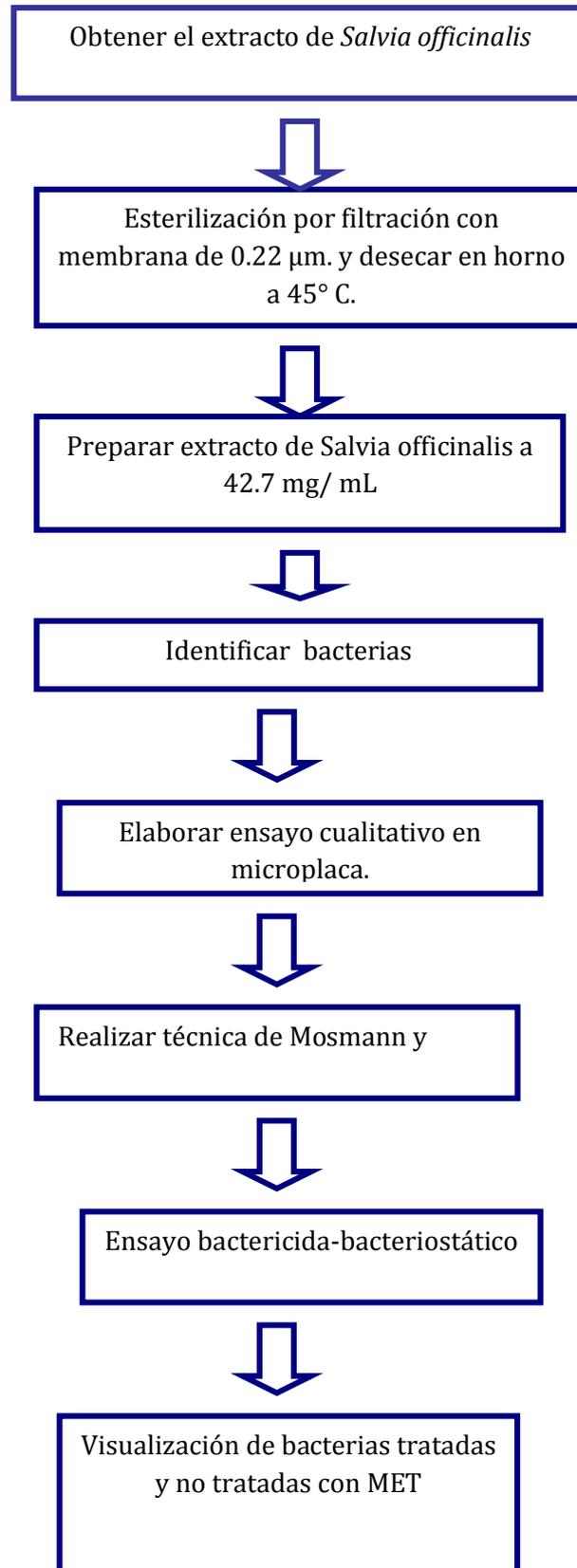
#### **4. Objetivo general**

Determinar el efecto antibacteriano del extracto de *Salvia officinalis* L. en 7 bacterias de importancia médica utilizando el método de Mosmann y la microscopía electrónica de transmisión.

##### **4.1. Objetivos particulares.**

- Obtener extracto seco estéril de *Salvia officinalis* para poder realizar una solución de concentración conocida.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Salvia officinalis* L. empleando el método de Mosmann sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella typhi*.
- Evaluar las propiedades bactericidas y/o bacteriostáticas del extracto de *Salvia officinalis* realizando una prueba de crecimiento en placa.
- Evidenciar mediante la ayuda de microscopía electrónica de transmisión el efecto del extracto de *Salvia officinalis*. en las bacterias antes mencionadas.

## 5. Plan General de Trabajo



## 6. Materiales y Equipo

- Autoclave @Presto
- Campana de flujo laminar
- Filtro Bala de acero inoxidable
- Bomba de vacío
- Elisometro
- Microscopio electrónico de transmisión @JEOL: JEM 1005.
- Microscopio óptico @Westover
- Balanza granataria
- Embudo de vidrio
- Papel millipore 0.4  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$
- Matraz Erlenmeyer @ pirex de 500 mL
- Vaso de precipitado @ kimax de 100 y 500mL
- Pipetas graduadas de 2 mL, 3 mL y 10 mL @ kimax
- Micropipetas de capacidad 10  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$
- Puntas de plástico para micropipetas estéril
- Microplacas estériles de 96 pocillos, con fondo plano
- Cajas petri desechables
- Tubos de ensaye 100x5, 85x13 mm

Material biológico: Tubos con medio de conservación con las cepas de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*.

- Sangre desfibrinada de carnero o bovino
- Extracto etanólico acuoso de *Salvia officinalis*

Reactivos:

- Benzal o Cloro
- MTT (5mg/ml)
- Agar sangre
- Agar BHI
- Caldo selección estreptococos
- Caldo BHI a doble concentración
- Solución salina fisiológica estéril
- Ácido fosfotúngstico
- Membranas con membrana fomvar

## **7. Metodología experimental**

### **7.1. Obtención e identificación de cepas**

Las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella Typhi* empleadas en el presente trabajo fueron proporcionadas por el Laboratorio 10 de Microbiología en Posgrado de la F. E. S. Cuautitlán.

Las cepas de *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*. y *Staphylococcus aureus*, fueron sembrados en agar sangre en ambiente anaerobio, a 37 ° C durante 24 hrs. Las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella typhi* fueron sembradas en placas de agar Mc Conkey a 37° C durante 24 hrs.

Posteriormente a todas las bacterias se les realizó la tinción de Gram, la prueba de Catalasa y Oxidasa para verificar género. Por otra parte, para identificar las especies se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Indol, Voges Proskauer, Rojo de Metilo, Citrato, Prueba de Bacitracina/Optoquina, Hidrólisis de Hipurato y Coagulasa.

### **7.2. Obtención del extracto de *Salvia officinalis* L.**

El extracto de *Salvia officinalis* L. fue proporcionado por laboratorios Extractos SIGMA  $\Sigma$  (código 3012HC), el cual estaba resuspendido en etanol y el contenido aproximado fue de 1L.

### **7.3. Esterilización del extracto de *Salvia officinalis* L.**

El extracto de *Salvia officinalis* L. fue filtrado con membranas millipore, el tipo de filtro AA, diámetro del poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y 0.45  $\mu\text{m}$ ; este procedimiento se realizó para esterilizar la muestra debido a que puede ocasionar interferencias en nuestro estudio.

Después el extracto fue recibido en un cristizador estéril y se dejó en un horno entre 50-56° C, hasta sequedad durante una semana, esto se realizó con el fin de evaporar el etanol que ocasiona efectos no deseados en nuestras pruebas siguientes.

Una vez obtenido el extracto seco de *Salvia officinalis* se pesaron 427 mg y se disolvieron en 1 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) aforando a 10 mL con agua destilada estéril. La solución de *Salvia officinalis* a concentración de 42.7 mg/mL se guardó en frasco ámbar a temperatura de 4 ° C.

### **7.4. Prueba cualitativa para visualizar el crecimiento de las cepas bacterianas**

Esta prueba se realizó con el fin de observar si existió crecimiento bacteriano en cada uno de los pozos empleando diferentes diluciones de extracto de *S. officinalis*, para ello se preparó una microplaca utilizando las siguientes cepas : *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella typhi* estas fueron tratadas con diferentes concentraciones de *Salvia officinalis*. y fueron incubadas a 37 ° C durante 24 hrs.

En la **Tabla 7.1.** se aprecia como se preparó la microplaca, la cual se muestra a continuación.

**Tabla 7.1. Preparación de la microplaca para el ensayo cualitativo**

Pozo	Dilución del extracto	Solución salina fisiológica 0.5%	<i>S. officinalis</i> **	Suspensión bacteriana en caldo BHI 2X	BHI 2X
1	Extracto**	-	100 µl	100µl	-
2	1:2	100 µl	100 µl	100µl	-
3	1:4	100 µl	pa	100µl	-
4	1:8	100 µl	pa	100µl	-
5	1:16	100 µl	pa	100µl	-
6	1:32	100 µl	pa	100µl	-
7	1:64	100 µl	pa	100µl	-
8	1:128	100 µl	pa	100µl	-
9	1:256	100 µl	pa	100µl	-
10	C+	-	-	100µl	100 µl
11	C-	100µl	-	-	100 µl
12	Blanco	-	100µl	-	100µl

pa ( se toma 100µl del pozo anterior y se adiciona al siguiente pozo, desechar el excedente del pozo 9). 2X, se refiere a doble concentración.; \*\* (42.7 mg/mL).; C-, control negativo; C+, control positivo.

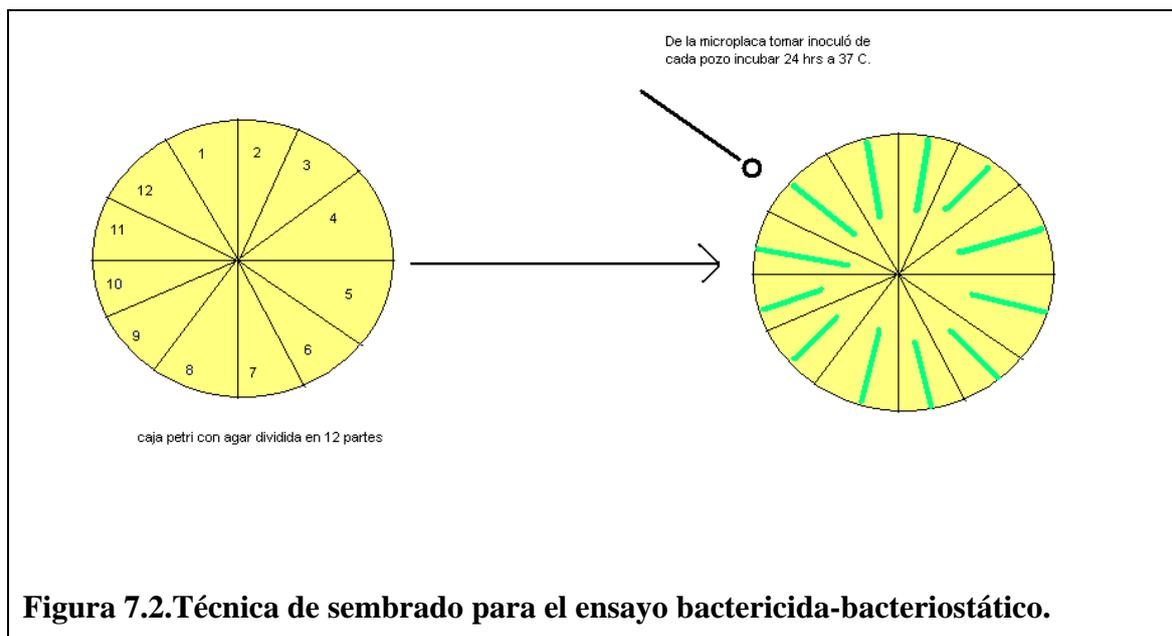
**7.5. Prueba bactericida–bacteriostática empleando diferentes diluciones del extracto de *S. officinalis*.**

El siguiente ensayo fue realizado para evidenciar si el extracto de *Salvia officinalis* tenia propiedades bacteriostáticas o bactericidas; para ello, a partir de una microplaca donde

se encontraban suspendidas en BHI a doble concentración (previamente estandarizadas a 0.5 con ayuda del nefelómetro) las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella typhi*, las cuales se trataron con diferentes diluciones del extracto de *S. officinalis L* y se incubaron durante 24 horas. Pasado el tiempo mencionado anteriormente, se tomó un inóculo de cada pozo de la microplaca sembrando sobre placas de BHI a doble concentración para observar si existía crecimiento bacteriano y después se dejó incubando otras 24 horas.

La **Figura 7.2.** muestra el procedimiento de sembrado de los inóculos mencionados anteriormente, como se puede apreciar, la siembra fue por estría.

Las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* empleadas en el presente estudio, requirieron un ambiente anaerobio de crecimiento, por lo que se procedió a sembrar de la misma manera pero en placas de agar sangre en ambiente anaerobio.



## 7.6. Prueba cuantitativa de Mosmann

Se realizó la prueba cuantitativa de Mosmann para encontrar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *S. officinalis L*. realizando una lectura a una longitud de onda de 655 nm.

Para ello se emplearon las siguientes bacterias estandarizadas; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella typhi* cada una fue cultivada en placas de microtitulación de 96 pozos, con un volumen final de 200  $\mu$ l a 37° C, el período de incubación de los cultivos de bacterias fue de 24 hrs.

Después del período de incubación se añadió 10  $\mu$ l del reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) a cada uno de los pocillos y una vez que se formaron los cristales púrpura de formazan, se midió la absorbancia de las muestras utilizando un Elisometro (Modelo 680) filtro de lectura: 655nm.

A continuación se muestra la **Tabla 7.2.** que indica puntualmente como se prepararon las microplacas para hacer el estudio cuantitativo.

**Tabla 7.2. Preparación de la microplaca para el ensayo cuantitativo de Mosmann**

Pozo	Dilución	Solución salina fisiológica 0.5%	<i>Salvia officinalis</i> 427mg/mL	Suspensión bacteriana en caldo BHI a doble concentración.	Reactivo de MTT (5mg/mL)	BHI a doble concentración.
1	extracto concentrado **	-	100 µl	100µl	10µL	-
2	1:2	100 µl	100 µl	100µl	10µL	-
3	1:4	100 µl	<b>pa</b>	100µl	10µL	-
4	1:8	100 µl	<b>pa</b>	100µl	10µL	-
5	1:16	100 µl	<b>pa</b>	100µl	10µL	-
6	1:32	100 µl	<b>pa</b>	100µl	10µL	-
7	1:64	100 µl	<b>pa</b>	100µl	10µL	-
8	1:128	100 µl	<b>pa</b>	100µl	10µL	-
9	1:256	100 µl	<b>pa</b>	100µl	10µL	-
10	Control positivo	-	-	100µl	10µL	100 µl
11	Control negativo	100µl	-	-	10µL	100 µl
12	Blanco	-	100µl	-	10µL	100µl

pa ( se toma 100µl del pozo anterior y se adiciona al siguiente pozo, desechar el excedente del pozo 9).

\*\* (42.7 mg/mL)

## **7.7. Microscopia electrónica de transmisión (MET)**

El siguiente trabajo fue realizado en laboratorio L-501 de la F.E.S. Cuautitlán, el microscopio electrónico de transmisión utilizado para el siguiente estudio fue el modelo JEOL: JEM 1005.

### **7.7.1. Preparación del material biológico para MET**

Este procedimiento se realizó con la finalidad de tener un material de óptima calidad para ser detectado por el microscopio electrónico de transmisión y para ello se inocularon tubos que contenían caldo Selección Streptococcus (CSE), con las siguientes cepas *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*, por otro lado sembramos *Staphylococcus aureus* en caldo BHI incubando a 37° C por 24 hrs respectivamente. En la siguiente Tabla se muestra como fue preparado cada uno de los tubos.

**Tabla 7.3 Preparación del material biológico para MET**

	<b>CONTROL</b>	<b>PROBLEMA</b>
<i>Streptococcus pyogenes</i> (CSE)	1 mL suspensión bacteriana 0.5NMcFarland en CSE	1 mL suspensión bacteriana 0.5NMcFarland en CSE
	S/extracto	1 mL extracto de <i>Salvia officinalis</i> (42.7 mg/mL)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (CSE)	1 mL suspensión bacteriana 0.5NMcFarland S/extracto	1 mL suspensión bacteriana 0.5NMcFarland +1 mL extracto de <i>Salvia officinalis</i> (42.7 mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> (BHI)	1 mL suspensión bacteriana 0.5 NMcFarland S/extracto	1 mL suspensión bacteriana 0.5 NMcFarland +1 mL extracto de <i>Salvia officinalis</i> (42.7 mg/mL)

Una vez incubados los tubos anteriores, se eliminaron impurezas lavando con 1mL SSF 0.5% estéril y centrifugando a 2000 rpm durante 10 minutos, esto se realizó por triplicado.

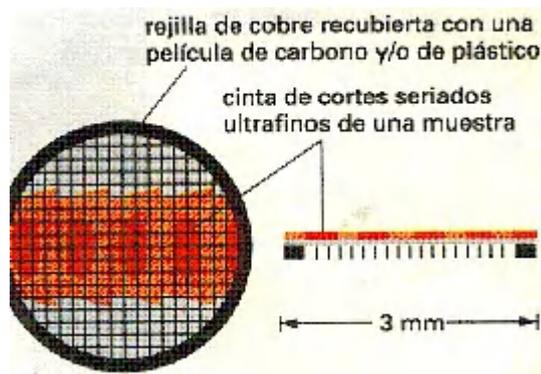
Para conservar las bacterias se le agrego SSF 0.5% estéril y se refrigeraron a 6° C.

### 7.7.2. Preparación de las rejillas con membranas fomvar

Las rejillas de cobre se lavaron con acetona y se desecaron en horno, posteriormente se impregno un portaobjetos con fomvar al 1% con cloroformo y se dejo reposar hasta que se secura la película.

Se corto las 4 orillas del porta y sobre un vaso con agua destilada sumergimos poco a poco hasta separar la película plástica y finalmente se colocaron las rejillas sobre la membrana y se recogieron en un papel filtro y se dejaron secar nuevamente.

Nota: Las rejillas deben ionizarse mediante la aplicación de una ligera descarga y deben estar bien secas para evitar interferencias.

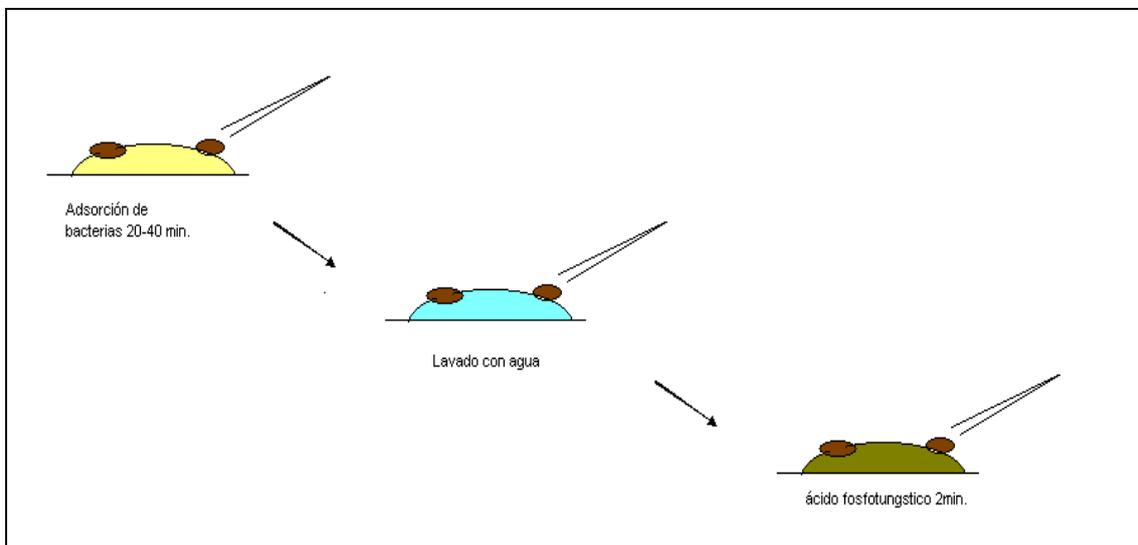


**Figura 7.3. Tipo de rejilla para MET (30)**

### 7.7.3. Tinción Negativa

Esta tinción se realizó colocando una gota de muestra en un papel parafilm y luego se colocaron 2 rejillas con membrana, estas rejillas se dejaron alrededor de 30 minutos para su adsorción. Posteriormente se lavaron con otra gota de agua para quitar el excedente.

Finalmente se colocaron las rejillas en una gota de ácido fosfotúngstico durante 3 minutos; en la siguiente **Figura 7.4** se esquematiza la forma en como se efectuó la tinción negativa.



**Figura 7.4 Tinción negativa**

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Prueba cualitativa para evaluar susceptibilidad

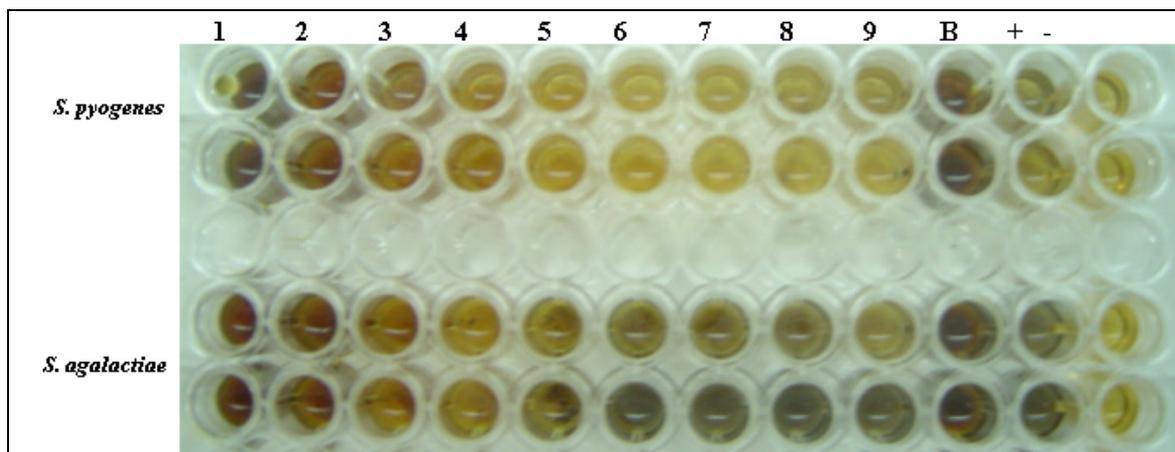
La prueba cualitativa para evaluar susceptibilidad permitió conocer cuales bacterias fueron susceptibles al extracto de *Salvia officinalis* para que posteriormente se utilizaran en la prueba cuantitativa (ensayo con MTT) que determinaría la CMI. Los resultados se muestran en la **Tabla 8.1** que se aprecia a continuación.

**Tabla 8.1 Prueba cualitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana empleando el extracto de *S. officinalis***

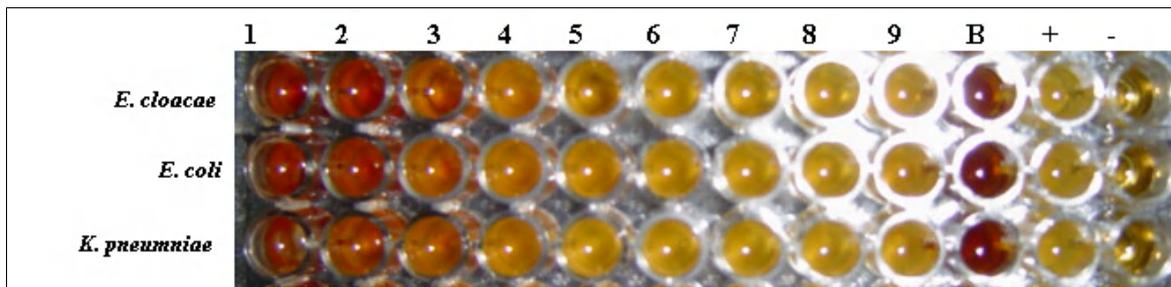
Pozo \ Bacteria	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c	+	+	+	s/c	+	s/c
<i>Streptococcus pyogenes</i>	s/c	+	+	s/c	+	s/c						
<i>Streptococcus agalactiae</i>	s/c	+	+	s/c	+	s/c						
<i>K. pneumoniae</i>	*	+	+	+	+	+	+	+	+	s/c	+	s/c
<i>E. coli</i>	*	+	+	+	+	+	+	+	+	s/c	+	s/c
<i>Salmonella typhi</i>	s/c	s/c	+	+	+	+	+	+	+	s/c	+	s/c
<i>Enterobacter cloacae</i>	*	+	+	+	+	+	+	+	+	s/c	+	s/c
* Dudoso; s/c no hubo crecimiento; + crecimiento notorio; pozo 10=blanco: 11=control positivo; 12 =control negativo.												

Los resultados descritos anteriormente, también se pueden observar en las siguientes Figuras, donde se puede apreciar que *S. pyogenes* comenzó a crecer a partir del pozo 8 y *S. agalactiae* a partir del pozo 8 (**Figura 8.1**). Por otra parte, hubo crecimiento de *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en todos los pozos empleando las diferentes diluciones de extracto de *Salvia officinalis* (**Figura 8.2**). Finalmente, *Salmonella typhi* comenzó a crecer a partir del pozo 5 y *Staphylococcus aureus* se desarrolló a partir del pozo 7 (**Figura 8.3**).

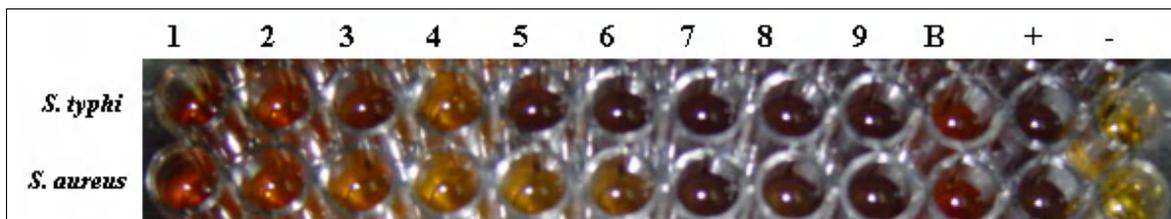
Cabe destacar que a partir de lo observado en la **Tabla 8.1**, se apreció que las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* empleadas en el presente trabajo, no fueron inhibidas por el extracto, corroborándose también estos resultados mediante un ensayo bactericida-bacteriostático (resultados no mostrados), por lo que se descartó el uso de estas cepas para estudios posteriores.



**Figura 8.1.1.** Prueba de susceptibilidad bacteriana empleando un extracto de *Salvia officinalis* contra *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*. Pozo 1= extracto *S. officinalis* concentrado, 2= dilución 1:2, 3= 1:4, 4= 1:8, 5= 1:16, 6= 1:32, 7= 1:64, 8= 1: 128, 9= 1: 256, pozo B= blanco, pozo + y - = control positivo y negativo, respectivamente.



**Figura 8.1.2. Prueba de susceptibilidad bacteriana empleando un extracto de *Salvia officinalis* contra *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.** Pozo 1= extracto *S. officinalis* concentrado, 2= dilución 1:2, 3= 1:4, 4= 1:8, 5= 1:16, 6= 1:32, 7= 1:64, 8= 1: 128, 9= 1: 256, pozo B= blanco, pozo + y - = control positivo y negativo, respectivamente.



**Figura 8.1.3. Prueba de susceptibilidad bacteriana empleando un extracto de *Salvia officinalis* contra *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*.** Pozo 1= extracto *S. officinalis* concentrado, 2= dilución 1:2, 3= 1:4, 4= 1:8, 5= 1:16, 6= 1:32, 7= 1:64, 8= 1: 128, 9= 1: 256, pozo B= blanco, pozo + y - = control positivo y negativo, respectivamente.

Nota: se agrego 5µl de MTT en cada uno de los pozos de la microplaca.

## 8.2. Ensayo cuantitativo empleando MTT

Una vez identificadas las bacterias susceptibles al extracto de *Salvia officinalis* L., se realizó el ensayo con MTT, el cual consistió en exponer las bacterias a diferentes concentraciones de *S. officinalis* empleando 5µl de MTT para evaluar la proliferación celular y así poder determinar la concentración mínima inhibitoria para cada una de las bacterias utilizadas en el presente estudio.

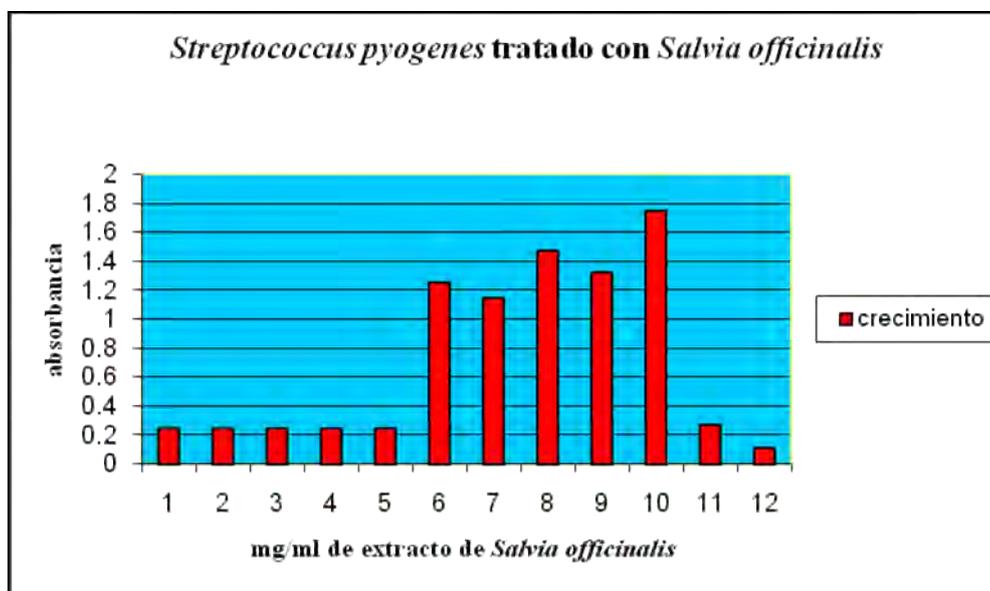
En la **Tabla 8.2.1.** y la **Figura 8.2.1.** se muestran los resultados obtenidos mediante el ensayo cuantitativo en microplaca para *Streptococcus pyogenes* tratado con *Salvia officinalis*, con su respectiva representación grafica, las cuales se presentan a continuación.

**Tabla 8.2.1. Resultado del ensayo en microplaca de *Streptococcus pyogenes* tratado con *Salvia officinalis***

Pozo	<i>S. officinalis</i> (mg/mL)	Absorbancia
1	42.7	0,247
2	21.35	0,247
3	10.67	0,247
4	5.33	0,247
5	2.66	0,247
6	1.33	1,25
7	0.66	1,148
8	0.33	1,472
9	0.16	1,319
10	Control positivo	1,746
11	Control negativo	0,274
12	Blanco	0,114

Los resultados observados en la **Figura 8.2.1.**, reflejaron que del pozo 1 al pozo 5 (concentraciones (mg/mL) de extracto de *S. officinalis* de 42.7, 21.35, 10.67, 5.33, 2.66, respectivamente), presentaron un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano de la cepa de *Streptococcus pyogenes*, mientras que del pozo 6 al 9 (concentraciones de 1.33, 0.66, 0.33 y 0.16, respectivamente) hubo proliferación bacteriana.

**Figura 8.2.1. Representación grafica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *S. officinalis* en *Streptococcus pyogenes***



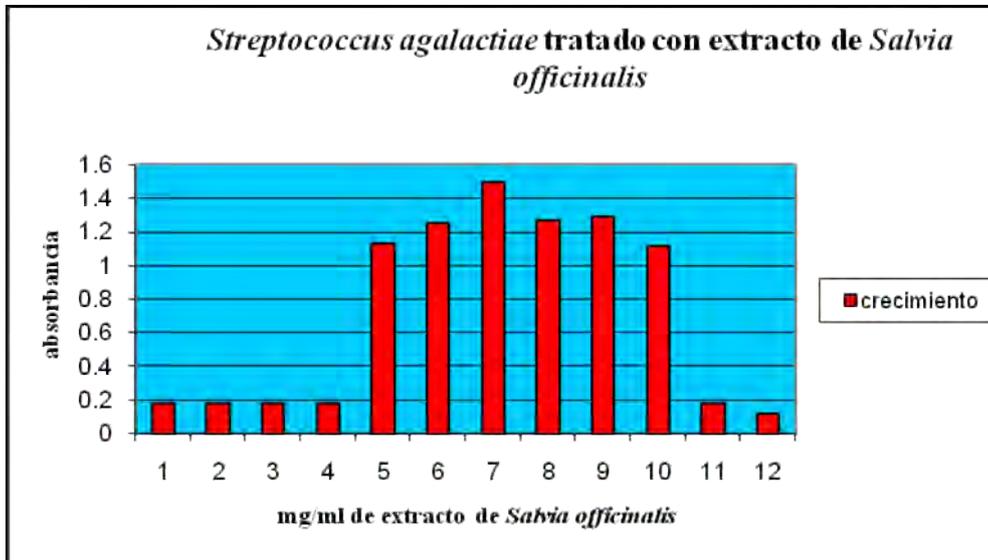
Por otra parte, en la **Tabla 8.2.2.** y la **Figura 8.2.2.** se muestran los resultados obtenidos mediante el ensayo cuantitativo en microplaca para *Streptococcus agalactiae* tratado con *Salvia officinalis*, con su respectiva representación grafica, las cuales se presentan a continuación.

**Tabla 8.2.2. Resultado del ensayo en microplaca de *Streptococcus agalactiae* tratado con *Salvia officinalis*.**

<b>Pozo</b>	<b><i>S. officinalis</i> (mg/mL)</b>	<b>Absorbancia</b>
1	42.7	0,185
2	21.35	0,185
3	10.67	0,185
4	5.33	0,185
5	2.66	1,13
6	1.33	1,253
7	0.66	1,493
8	0.33	1,266
9	0.16	1,289
10	Control positivo	1,112
11	Control negativo	0,185
12	Blanco	0,119

Los resultados observados en la **Figura 8.2.2.**, reflejaron que del pozo 1 al pozo 4 (concentraciones (mg/mL) de extracto de *S. officinalis* de 42.7, 21.35, 10.67 y 5.33 respectivamente), presentaron un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano de la cepa de *Streptococcus agalactiae*, mientras que del pozo 5 al 9 (concentraciones de 2.66, 1.33, 0.66, 0.33 y 0.16, respectivamente) hubo proliferación bacteriana.

**Figura 8.2.2. Representación grafica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *S. officinalis* en *Streptococcus agalactiae*.**



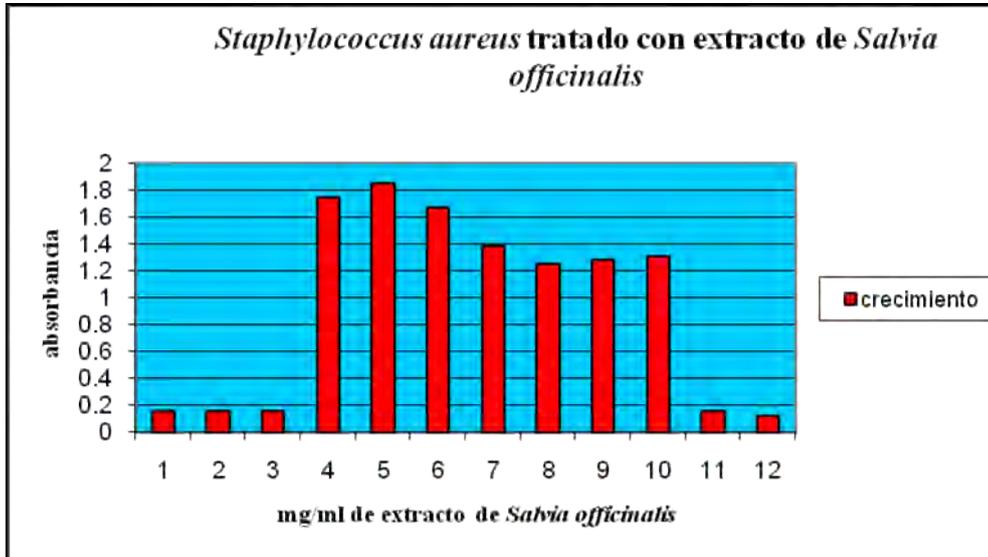
Por otro lado, en la **Tabla 8.2.3** y la **Figura 8.2.3.** se muestran los resultados obtenidos mediante el ensayo cuantitativo en microplaca para *Staphylococcus aureus* tratado con *Salvia officinalis*, con su respectiva representación grafica, las cuales se presentan a continuación.

**Tabla 8.2.3. Resultado del ensayo en microplaca de *Staphylococcus aureus* tratado con *Salvia officinalis*.**

Pozo	<i>S. officinalis</i> (mg/mL)	Absorbancia
1	42.7	0,161
2	21.35	0,161
3	10.67	0,161
4	5.33	1,742
5	2.66	1,846
6	1.33	1,669
7	0.66	1,388
8	0.33	1,254
9	0.16	1,283
10	Control positivo	1,309
11	Control negativo	0,161
12	Blanco	0,127

Los resultados observados en la **Figura 8.2.3.**, reflejaron que del pozo 1 al pozo 3 (concentraciones (mg/mL) de extracto de *S. officinalis* de 42.7, 21.35, y 10.67 respectivamente), presentaron un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano de la cepa de *Staphylococcus aureus*, mientras que del pozo 4 al 9 (concentraciones de 5.33, 2.66, 1.33, 0.66, 0.33 y 0.16, respectivamente) hubo proliferación bacteriana.

**Figura 8.2.3. Representación grafica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *S. officinalis* en *Staphylococcus aureus*.**



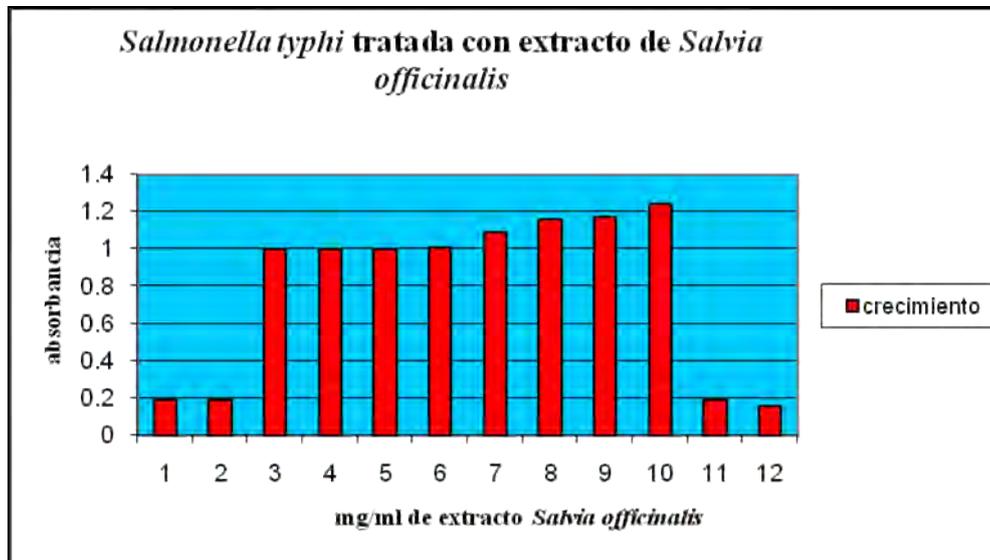
Por otra parte, en la **Tabla 8.2.4** y la **Figura 8.2.4** se muestran los resultados obtenidos mediante el ensayo cuantitativo en microplaca para *Salmonella typhi* tratado con *Salvia officinalis*, con su respectiva representación grafica, las cuales se presentan a continuación.

**Tabla 8.2.4. Resultado del ensayo en microplaca de *Salmonella typhi* tratado con *Salvia officinalis*.**

<b>Pozo</b>	<b><i>S. officinalis</i> (mg/mL)</b>	<b>Absorbancia</b>
1	42.7	0,192
2	21.35	0,192
3	10.67	1
4	5.33	1,003
5	2.66	1,005
6	1.33	1,007
7	0.66	1,09
8	0.33	1,16
9	0.16	1,176
10	Control positivo	1,244
11	Control negativo	0,192
12	Blanco	0,16

Los resultados observados en la **Figura 8.2.4.**, reflejaron que del pozo 1 al pozo 2 (concentraciones (mg/mL) de extracto de *S. officinalis* de 42.7 y 21.35, respectivamente) ocasionaron un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano de la cepa de *Salmonella typhi*, mientras que del pozo 3 al 9 (concentraciones de 10.67 5.33, 2.66, 1.33, 0.66, 0.33 y 0.16, respectivamente) hubo proliferación bacteriana.

**Figura 8.2.4. Representación grafica del ensayo cuantitativo mostrando el efecto antibacteriano de *S. officinalis* en *Salmonella typhi*.**



### 8.3. Ensayo bactericida-bacteriostático

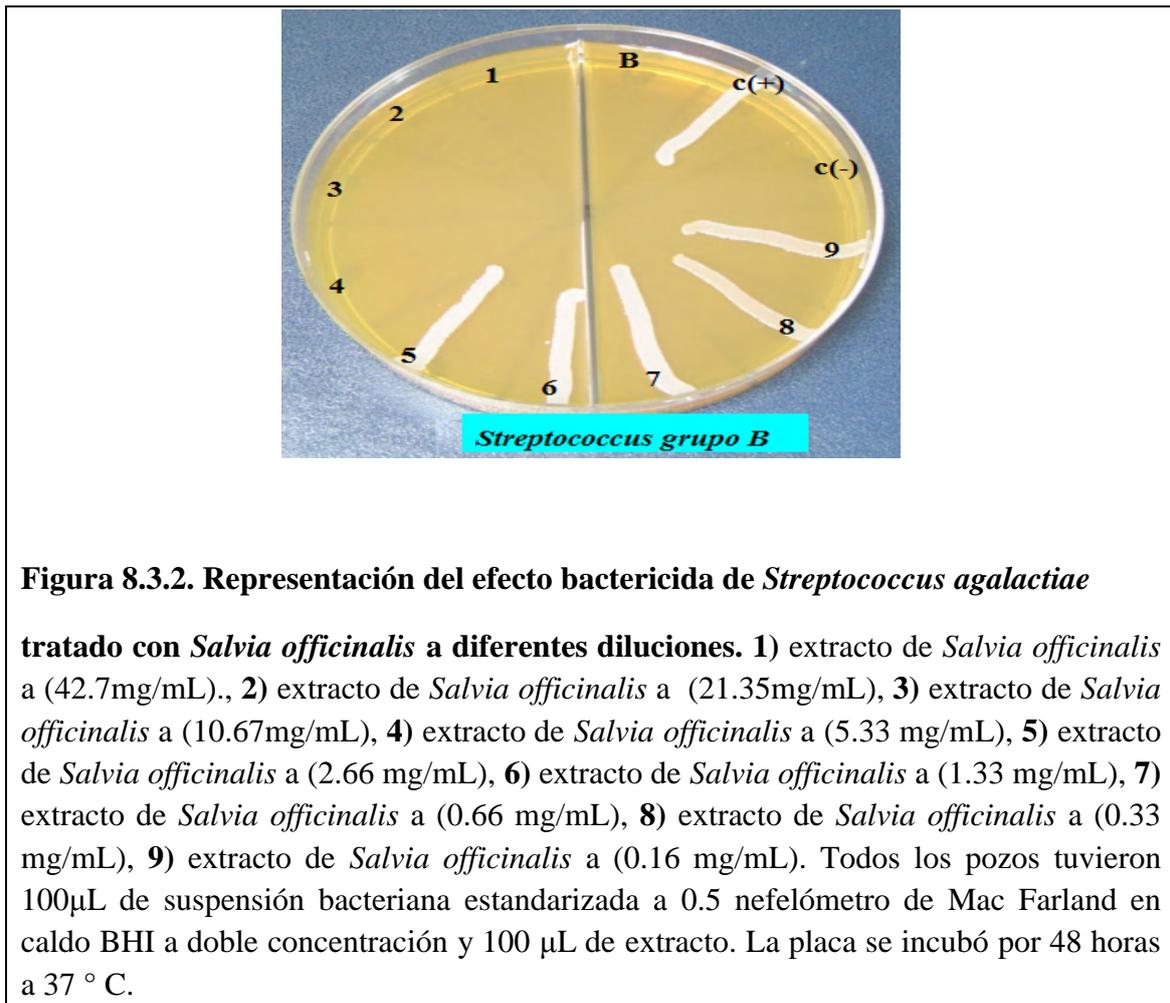
Para evaluar y determinar el efecto bactericida o bacteriostático que presentó el extracto utilizado en el presente trabajo, cada una de las bacterias que fueron susceptibles al mismo, se inocularon en placas de agar BHI usando diferentes diluciones de *Salvia officinalis*.

En la **Figura 8.3.1** se muestran los resultados obtenidos en el ensayo, donde se aprecia que hay menor crecimiento en la estría número 2 que representa la concentración de 21.35 mg/mL, mientras que en las otras concentraciones se puede apreciar el crecimiento típico de la cepa de *Staphylococcus aureus*, indicando así un efecto bacteriostático.



**Figura 8.3.1 Representación del efecto bacteriostático de *S. aureus* tratado con *Salvia officinalis* a diferentes diluciones.** 1) extracto de *Salvia officinalis* a (42.7 mg/mL), 2) extracto de *Salvia officinalis* a (21.35 mg/mL), 3) extracto de *Salvia officinalis* a (10.67 mg/mL), 4) extracto de *Salvia officinalis* a (5.33mg/mL), 5) extracto de *Salvia officinalis* a (2.66 mg/mL), 6) extracto de *Salvia officinalis* a (1.33 mg/mL), 7) extracto de *Salvia officinalis* a (0.66 mg/mL), 8) extracto de *Salvia officinalis* a (0.33 mg/mL), 9) extracto de *Salvia officinalis* a (0.16 mg/mL). Todos los pozos tuvieron 100µL de suspensión bacteriana estandarizada a 0.5 nefelómetro de Mac Farland en caldo BHI a doble concentración y 100 µL de extracto. La placa se incubó por 48 horas a 37 ° C.

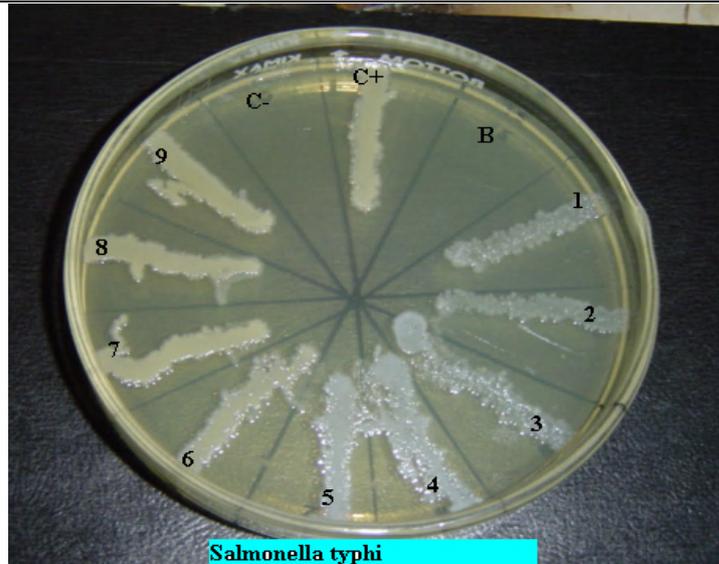
En la **Figura 8.3.2** se aprecia que el crecimiento se dio a partir de la estría 5 que corresponde a 2.66 mg/mL del extracto de *Salvia officinalis*, mientras que en los primeros 4 pozos se ve claramente el efecto bactericida ocasionado sobre la cepa de *Streptococcus agalactiae*.



**Figura 8.3.2. Representación del efecto bactericida de *Streptococcus agalactiae***

**tratado con *Salvia officinalis* a diferentes diluciones.** 1) extracto de *Salvia officinalis* a (42.7mg/mL), 2) extracto de *Salvia officinalis* a (21.35mg/mL), 3) extracto de *Salvia officinalis* a (10.67mg/mL), 4) extracto de *Salvia officinalis* a (5.33 mg/mL), 5) extracto de *Salvia officinalis* a (2.66 mg/mL), 6) extracto de *Salvia officinalis* a (1.33 mg/mL), 7) extracto de *Salvia officinalis* a (0.66 mg/mL), 8) extracto de *Salvia officinalis* a (0.33 mg/mL), 9) extracto de *Salvia officinalis* a (0.16 mg/mL). Todos los pozos tuvieron 100µL de suspensión bacteriana estandarizada a 0.5 nefelómetro de Mac Farland en caldo BHI a doble concentración y 100 µL de extracto. La placa se incubó por 48 horas a 37 ° C.

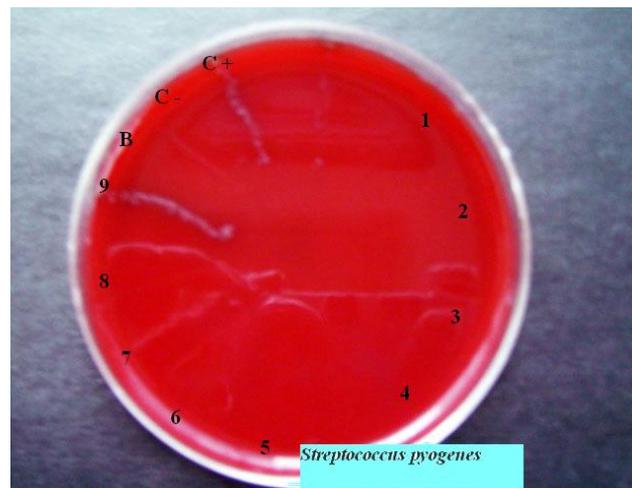
En la **Figura 8.3.3** se nota el efecto bacteriostático que presenta *Salvia officinalis* en *Salmonella typhi*, además de que en las primeras 5 estrías se aprecia un efecto atípico en la morfología colonial.



**Figura 8.3.3.** Representación del efecto bacteriostático de *Salmonella typhi*

**tratado con *Salvia officinalis*.** 1) extracto de *Salvia officinalis* a (42.7 mg/mL), 2) extracto de *Salvia officinalis* a (21.35 mg/mL), 3) extracto de *Salvia officinalis* a (10.67 mg/mL), 4) extracto de *Salvia officinalis* a (5.33 mg/mL), 5) extracto de *Salvia officinalis* a (2.66 mg/mL), 6) extracto de *Salvia officinalis* a (1.33 mg/mL), 7) extracto de *Salvia officinalis* a (0.66 mg/mL), 8) extracto de *Salvia officinalis* a (0.33 mg/mL), 9) extracto de *Salvia officinalis* a (0.16 mg/mL). Todos los pozos tuvieron 100  $\mu$ L de suspensión bacteriana estandarizada a 0.5 nefelómetro de Mac Farland en caldo BHI a doble concentración y 100  $\mu$ L de extracto. La placa se incubó por 48 horas a 37 ° C.

En la **Figura 8.3.4** se muestra el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* en agar sangre, se aprecia que en la estría 9 que corresponde a la concentración 0.16mg/mL de *Salvia officinalis*, mientras que en todas las demás concentraciones la bacteria fue inhibida de forma bactericida (1 a la 8).

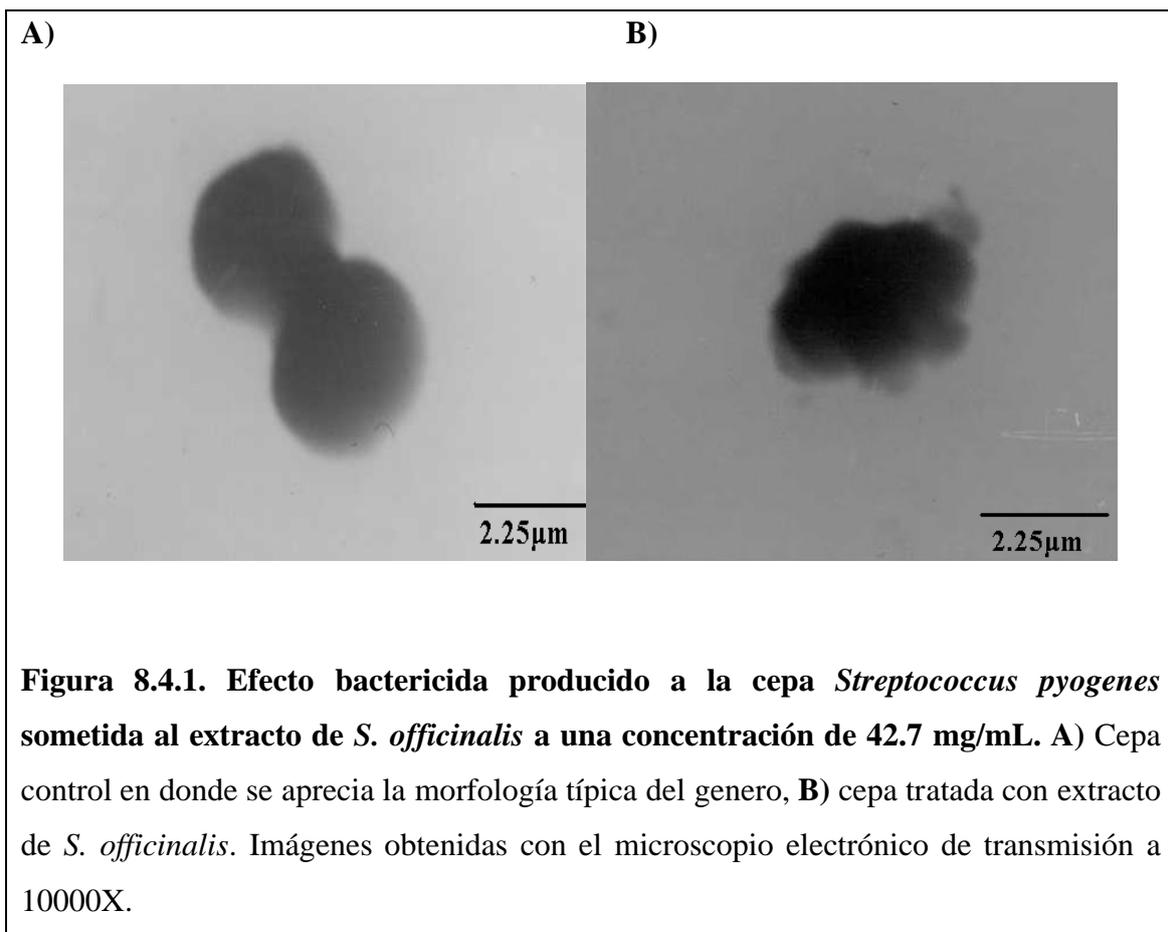


**Figura 8.3.4. Representación del efecto bacteriostático de *Streptococcus pyogenes* tratado con *Salvia officinalis*.** 1) extracto de *Salvia officinalis* a (42.7 mg/mL), 2) extracto de *Salvia officinalis* a (21.35 mg/mL), 3) extracto de *Salvia officinalis* a (10.67 mg/mL), 4) extracto de *Salvia officinalis* a (5.33 mg/mL), 5) extracto de *Salvia officinalis* a (2.66 mg/mL), 6) extracto de *Salvia officinalis* a (1.33 mg/mL), 7) extracto de *Salvia officinalis* a (0.66 mg/mL), 8) extracto de *Salvia officinalis* a (0.33 mg/mL), 9) extracto de *Salvia officinalis* a (0.16 mg/mL). Todos los pozos tuvieron 100µL de suspensión bacteriana estandarizada a 0.5 nefelómetro de Mac Farland en caldo BHI a doble concentración y 100 µL de extracto. La placa se incubó por 48 horas a 37 ° C.

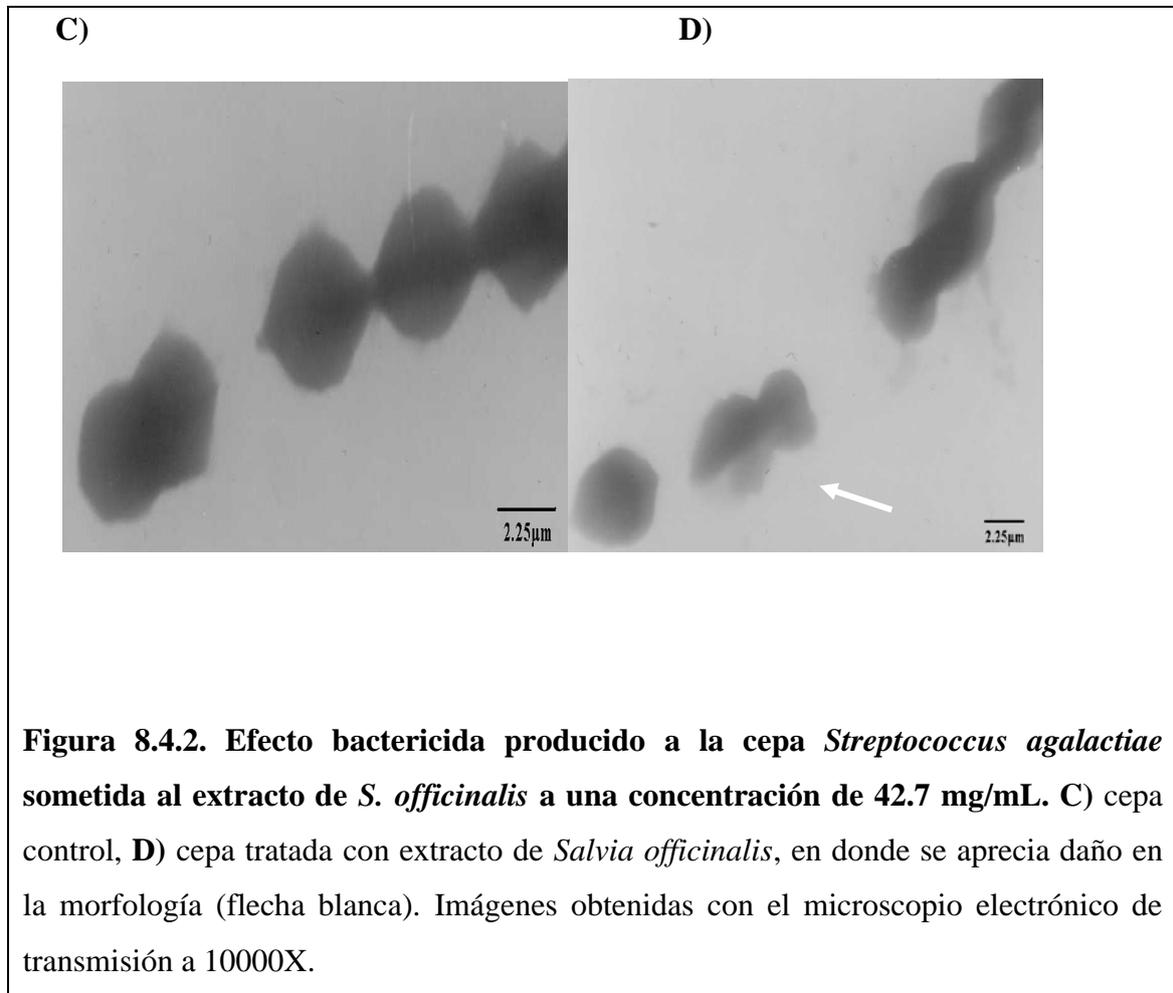
#### 8.4. Microscopia electrónica de transmisión (MET)

Para evaluar el daño que se ocasiona en la estructura celular, se visualizaron tres bacterias gram positivas tratadas con *Salvia officinalis* a una concentración de 42.7 mg/mL y se compararon con su respectivo control.

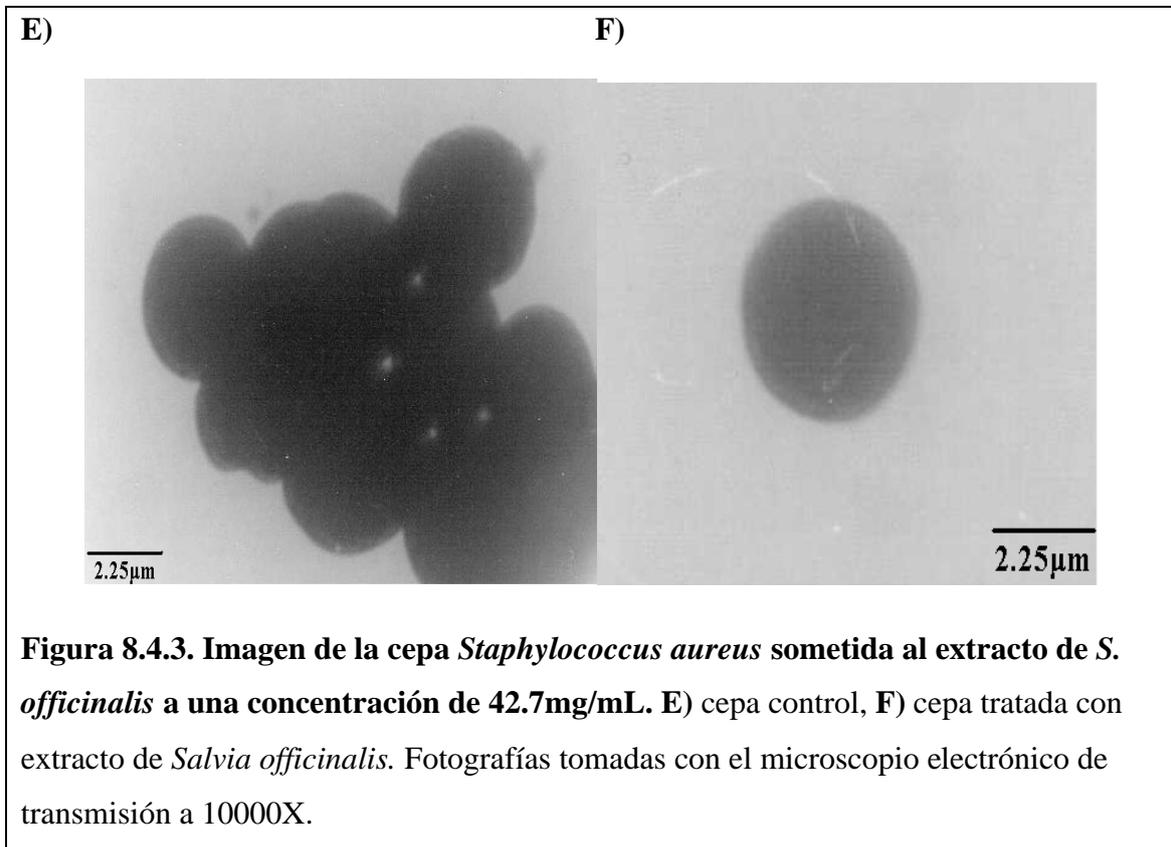
Las bacterias fueron sembradas en caldo selección estreptococos durante 24 horas, se lavaron con solución salina fisiológica estéril y fueron teñidas con ácido fosfotúngstico, mediante la técnica de tinción negativa para llevar a cabo la observación en el microscopio electrónico de transmisión. En la **Figura 8.4.1** se muestran las bacterias de *Streptococcus pyogenes*, las cuales presentaron cambios en su morfología, debido a que el extracto aparentemente provoca rompimiento en la membrana bacteriana (foto **B**).



Por otra parte en la **Figura 8.4.2** muestra que *Streptococcus agalactiae* presentó daño en su morfología, debido a que el extracto de *Salvia officinalis* tiene propiedad bactericida demostrado en experimentos anteriores del presente estudio (foto **D**).



Finalmente, en la **Figura 8.4.3.** se observó la bacteria *Staphylococcus aureus*, la cual no presentó ningún cambio en su fenotipo, por lo tanto el extracto de *Salvia officinalis* a la concentración empleada, no produjo daños en la estructura bacteriana utilizada.



**Figura 8.4.3. Imagen de la cepa *Staphylococcus aureus* sometida al extracto de *S. officinalis* a una concentración de 42.7mg/mL. E) cepa control, F) cepa tratada con extracto de *Salvia officinalis*. Fotografías tomadas con el microscopio electrónico de transmisión a 10000X.**

## 9. Discusión

En base a las estadísticas reportadas en el 2008 las enfermedades respiratorias y las enfermedades gastrointestinales son un problema de salud pública en el Estado de México, en este contexto, el desarrollo de una nueva alternativa natural permitirá influir de manera directa en el tratamiento de estas.

*Salvia officinalis* ha sido estudiada por diversos autores durante los últimos años debido a que ellos reportan actividad antimicrobiana propias de esta planta, principalmente en el extracto etanólico se encuentran partículas como flavonoides, taninos y alcaloides los cuales tienen propiedades medicinales diversas, es por eso que uno de los principales objetivos del presente trabajo, fue demostrar y evaluar las propiedades bacteriostáticas-bactericidas del extracto de *Salvia officinalis*.

En el presente trabajo se buscó la concentración mínima inhibitoria y la actividad bactericida de *Salvia officinalis* para que posteriormente pueda desarrollarse alguna forma farmacéutica y así ayudar a combatir el tratamiento de enfermedades infecciosas.

El primer paso para realizar este estudio fue buscar bacterias que sean susceptibles a diferentes diluciones del extracto de *Salvia officinalis*. De acuerdo a los resultados reportados en la **Tabla 8.1**, el 57.14% de las bacterias (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*) mostraron sensibilidad al extracto, mientras que el 42.86% de las cepas (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*) fueron mas resistentes a el extracto; un factor que pudo influir en la susceptibilidad fue las diferencias bioquímicas.

Se seleccionaron las bacterias *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* que fueron las más sensibles al extracto de *S. officinalis*, posteriormente se realizó ensayo cuantitativo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), cuyo fundamento se basa en la reducción de la sal tetrazolium (MTT) por medio de la enzima lactato deshidrogenasa o aspartato aminotransferasa, dando como producto de reacción el formazan que es una sal insoluble en agua de color violeta. El color es directamente proporcional a la proliferación celular.

Con este ensayo se pudieron analizar estadísticamente los gráficos de barras y se obtuvieron las CMI's de las bacterias susceptibles a *Salvia officinalis* las cuales fueron *S. pyogenes* con 2.66 mg/mL; *Streptococcus agalactiae* con 5.33 mg/mL; no se encontró información acerca de que estas especies presenten susceptibilidad a *Salvia officinalis*, sin embargo Horiuchi (1,2) reportó que *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae* son inhibidas por Triterpenos como ácido oleanólico, ácido ursólico, uvaol, ácido betulínico, y betulina, contenidas en *Salvia officinalis*, por lo que un aporte esencial del presente estudio es que el extracto de *S. officinalis* puede emplearse para combatir a *Streptococcus agalactiae* y *S. pyogenes*.

Por otra parte, *Staphylococcus aureus* presentó una CMI de 10.67 mg/mL, y *Salmonella typhi* con 21.35 mg/mL, estas bacterias necesitaron una concentración más elevada del extracto de *Salvia officinalis*.

El extracto de *Salvia officinalis* no pudo inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*, posiblemente ocurrió porque se necesitaba un extracto de *Salvia officinalis* más concentrado.

Es indispensable recordar que la cantidad de compuestos químicos que tiene *Salvia officinalis* varían en % dependiendo la época del año y la zona de recolección de la planta lo que pudo influir en los resultados observados del presente trabajo.

La siguiente fase del proyecto fue evaluar si *Salvia officinalis* tiene propiedad bactericida o bacteriostática sembrando en placas de agar BHI y tomando diferentes concentraciones del extracto.

*Salvia officinalis* presentó propiedad bactericida ante las cepas *Streptococcus pyogenes* empleando una concentración de 5.33 mg/mL y para *Streptococcus agalactiae* usando concentraciones menores a 5.33 mg/mL de extracto de *Salvia officinalis*, esto se puede visualizar en la **Figura 8.3.2.** y en la **Figura 8.3.4.**

El extracto de *Salvia officinalis* empleando la cepa de *Staphylococcus aureus*, presentó propiedad bacteriostática, obsérvese en la **Figura 8.3.1.** Sin embargo algo muy importante que se presencié en la **Figura 8.3.3.** es que hasta la dilución 5 el crecimiento de *Salmonella typhi* es atípico mientras que a partir de la dilución 6 a 9 el crecimiento es típico, esto quiere decir que el extracto de *Salvia officinalis* produce un efecto en la pigmentación de la bacteria, nosotros desconocemos la razón de dicho efecto.

Otro propósito que se estableció en el presente estudio fue la confirmación de daño ocasionado en la pared celular de las bacterias gram positivas usadas que presentaron susceptibilidad al extracto, utilizando como herramienta la microscopia electrónica de transmisión y se observaron daños en la estructura bacteriana de *Streptococcus pyogenes* (**Figura 8.4.1.**) y *Streptococcus agalactiae* (**Figura 8.4.2.**), estos efectos bactericidas fueron ocasionados por el extracto de *Salvia officinalis*; otro factor muy importante que hay que considerar, fue que las bacterias que presentaron mayor susceptibilidad, menores CMI's y efecto bactericida, concuerda con lo observado en la MTE que las bacterias sufren daños en su estructura y morfología.

El extracto de *Salvia officinalis* ocasiona efectos antibacterianos, esto se debe principalmente a la gran cantidad de compuestos químicos como: ácido rosmarínico (25), ácido oleanólico, ácido ursolínico, uvaol, ácido betulínico, betulina, carnosol y ácido carnosólico (1), y se estipula que se está llevando a cabo un efecto sinérgico debido a que la planta contiene diversos compuestos activos con propiedades antibacterianas.

Finalmente el presente estudio aporta más evidencias científicas en la determinación de las propiedades medicinales reportadas previamente en la literatura y que un futuro no muy lejano, pueda contribuir en el tratamiento de enfermedades respiratorias y gastrointestinales, diseñando nuevas formas farmacéuticas con una dosis ideal que sea confiable y segura.

## 10. Conclusiones.

- Logramos preparar un extracto estéril de *Salvia officinalis* a una concentración de 42.7 mg/mL, la cual provocó efectos antibacterianos en 57.14% de las bacterias estudiadas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Salmonella typhi*) mientras que el 42.86% (*Escherichia. Coli*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*) no presentaron susceptibilidad ante el extracto de *Salvia officinalis*.
- Se establecieron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) para las siguientes cepas fueron; *Staphylococcus aureus* (10.67 mg/mL), *Streptococcus pyogenes* (2.66 mg/mL), *Streptococcus agalactiae* (5.33 mg/mL), y *Salmonella typhi* (21.35 mg/mL).
- Se pudo determinar que el extracto de *Salvia officinalis* tiene efecto bactericida en *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, y efecto bacteriostático sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*.
- La MET logró evidenciar daños ocasionados en la pared celular de *Streptococcus. pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*, sin embargo *Staphylococcus aureus* no presento daños significativos.

## 11. Perspectivas.

- Elaborar una forma farmacéutica que lleve extracto de *Salvia officinalis*.
- Elaborar antisépticos para diversas superficies.
- Realizar un estudio más amplio sobre las cepas susceptibles frente al extracto de *S. officinalis*.
- Diseñar un experimento para evaluar efectos tóxicos de *Salvia officinalis*.
- Evaluar la farmacocinética y farmacodinamia de cada uno de los componentes presentes en el extracto, usando como modelo ratas o ratones.

## **ABREVIATURAS**

IRA	Infección respiratoria aguda.
EGB	Estreptococos del grupo B.
CSE	Caldo selección estreptococos.
CMI.	Concentración mínima inhibitoria
CMI's	Concentraciones mínimas inhibitorias.
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro)
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
DMSO	Dimetilsulfoxido.
SSF	Solución salina fisiológica
0.5 NMcF	0.5 Nefelómetro de Mac Farland.

## **12. APÉNDICE**

### **Tinción de gram**

1. Fijar la bacteria en un portaobjetos
2. Agregar 1 gota de cristal violeta durante 1 min y enjuagar con agua
3. Agregar 2 gotas de lugol durante 2 minutos y enjuagar
4. Agregar 3 gotas de alcohol-acetona y enjuagar
5. Agregar 1 gota de safranina durante 1 minuto y enjuagar

### **PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

#### **Agar BHI (Becton Dickinson)**

Disolver 37 g de material deshidratado en 1 L de agua destilada.

Esterilizar en autoclave 121° C 15 lb de presión de vapor durante 15 minutos.

Distribuir aprox. 12 mL en cada caja petri estéril.

**Agar sangre (Bioxon de México, S.A. de C.V.)**

Disolver 40 g de material deshidratado en 1L de agua destilada.

Esterilizar a 121° C 15 lb de presión de vapor durante 15 minutos.

Dejar enfriar y agregar 5% de sangre de carnero desfibrinada estéril.

Distribuir en placas estériles.

**Caldo BHI (Bioxon de México, S.A. de C.V.)**

Disolver 37 g de material deshidratado en 1L de agua destilada

Distribuir en tubos de ensaye con rosca.

Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 lb de presión de vapor durante 15 minutos.

**MTT (3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio Bromuro)**

Disolver 5mg/mL de MTT en RPMI-1640 rojo de fenol

Filtrar con membrana de 0.2 µm.

Guardar a una temperatura de 4°C.

**Preparación de las rejillas con membranas fomvar.**

Se preparo una solución fomvar al 1% con cloroformo.

En un vaso de precipitados de 1 L limpio llenar con agua destilada

Impregnar un portaobjetos con fomvar 1% y dejar reposar hasta que se seque la película.

Cortar las 4 orillas del porta y sobre baño maría con agua destilada sumergir poco a poco hasta separar la película plástica.

Colocar las rejillas sobre la membrana y recoger con papel filtro.

**Preparación de la solución reveladora HC 110 KODAK .**

Medimos 63mL de HC-110 y se aforo 950mL en agua tibia con agitación suave.

### 13. ANEXOS

<b>Bacteria</b>	<b>Gram</b>	<b>Morfología</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Oxidasa</b>
<i>S. pyogenes</i>	+	Cocos en cadena	-	-
<i>S. agalactiae</i>	+	Cocos en cadena	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Cocos en racimo	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	Bacilos	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Bacilos	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	Bacilos	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Bacilos	+	-

**Anexo 1. Resultado de las Pruebas bioquímicas primarias realizadas en cada una de las bacterias utilizadas.**

<b>Bacteria</b>			
<i>S. pyogenes</i>	<b>β-hemolisis</b>	<b>Hidrólisis de hipurato</b> -	<b>Bacitracina</b> <b>S</b>
<i>S. agalactiae</i>	<b>β-hemolisis</b>	<b>Hidrólisis de hipurato</b> +	<b>Bacitracina</b> <b>R</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>Coagulasa</b> +	<b>Urea +</b>	<b>Manitol +</b>
<i>Salmonella typhi</i>	<b>MR+</b> <b>VP-</b>	<b>Indol -</b>	<b>Citrato -</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<b>Vp +</b>	<b>Citrato +</b>	<b>Indol -</b>
<i>Escherichia coli</i>	<b>VP-</b>	<b>Citrato -</b>	<b>Indol +</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<b>VP +</b>	<b>Citrato +</b>	<b>Indol -</b>

**Anexo 2. Resultados de las pruebas bioquímicas secundarias**

### **Propiedades del DMSO (dimetilsulfoxido)**

El dimetil sulfóxido (DMSO) es un líquido orgánico altamente polar y miscible. Es básicamente inodoro y tiene un bajo nivel de toxicidad. El DMSO es un solvente aprótico dipolar y tiene un punto de ebullición relativamente alto.

El DMSO es un disolvente único versátil tiene una constante dieléctrica alta (491), pero no forma enlace de hidrogeno en estado puro. Es un disolvente poderoso para iones inorgánicos y compuestos orgánicos. Los reactivos con frecuencia realizan su reactividad en DMSO al compararlo con la que realizan en disolventes alcohólicos.

El DMSO penetra fácilmente la piel y sé a usado para promover la absorción epidérmica de fármacos; sin embargo, el DMSO puede causar la absorción de suciedad y veneno. Algo común en los que trabajan con DMSO es cuando les salpica en las manos, pueden percibir su olor(41).

### **Propiedades del MTT**

MTT (3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio Bromuro) (Sigma) es un colorante amarillo soluble en agua derivado de sales de tetrazolio, el cual es reducido por las células vivas a un producto de formazan azul insoluble en soluciones acuosas. La cantidad de formazan generado es directamente proporcional al número de células viables.<sup>18</sup> Las células en fase de crecimiento exponencial son expuestas a las sustancias que se desean evaluar y se dejan crecer por dos o tres ciclos con el propósito de distinguir entre las células que permanecen viables y con capacidad de proliferar y aquellas que permanecen viables y son incapaces de proliferar (42).

## **Microscopia electrónica de transmisión.**

El microscopio electrónico de transmisión es un instrumento útil para el diagnóstico y la investigación de diversas muestras como: bacterias, virus, hongos, tejidos animales y vegetales. El microscopio electrónico de transmisión (TEM) utiliza electrones para lograr analizar muestras hasta 10 0000 x magnificaciones y resoluciones en la gama nanómetro.

El sistema óptico-electrónico del microscopio electrónico de transmisión está constituido por las siguientes partes:

1. Cañón de electrones
2. Sistema de lentes
3. Pantalla fluorescente

Estos componentes están ensamblados en una columna vertical la cual se encuentra en alto vacío.

El cañón de electrones, es la fuente emisora del haz de electrones. Se encuentra ubicado en la parte superior de la columna. Está constituido por un filamento (cátodo), un cilindro con una apertura central, llamado cilindro de Wehnelt que rodea al filamento y tiene un potencial ligeramente más negativo que éste. El ánodo se encuentra por debajo del cilindro de Wehnelt.

El filamento es calentado por el pasaje de corriente (alrededor de 2800 K). Los electrones emitidos termoiónicamente por el cátodo son acelerados hacia el ánodo, pasan por la apertura circular central de éste y un haz de alta energía es emitido hacia la columna del microscopio.

El sistema de lentes está formado por lentes condensadores objetivo, intermedia y proyectora. Las lentes condensadoras, en los microscopios, más modernos son dos. La primera, proyecta la imagen punto de entrecruzamiento demagnificada (spot size), mientras que la segunda controla su diámetro y el ángulo de convergencia en que incide sobre la muestra limita al haz que incide sobre la muestra.

La lente objetivo forma la primera imagen, localizada debajo del espécimen. Es considerada el componente más importante del microscopio electrónico. Cualquier defecto en ésta, será magnificado y transmitido al resto del sistema óptico. Por lo tanto, de ella dependen, en gran medida, la resolución final y la corrección de las aberraciones.

Las lentes intermedia y proyectora son las encargadas de amplificar la imagen dada por la lente objetivo y proyectarla sobre la pantalla fluorescente.

La pantalla del microscopio electrónico de transmisión está recubierta por una pintura de fluoruros de Zn y Cd, que fluoresce cuando es bombardeada por electrones, generando una imagen en el rango de las longitudes de onda del visible.

## 14. Referencias

- (1) Hourichi Kumiko, et al. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Boil. pharm. bull.* 30 (6) 2007) pp.1147-1149
- (2). Hourichi Kumiko, et al. Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2) (2007) pp. 287-290
- (3) [http://es.wikipedia.org/wiki/Salvia\\_officinalis](http://es.wikipedia.org/wiki/Salvia_officinalis). (Página modificada el 13 feb 2009.)
- (4) <http://www.centrodeterapiasalternativas.com/inf/herbolaria.html> ( Tema: La herbolaria. Página consultada en febrero 2009)
- (5) (Grupo multicolor, 2007) <http://www.saludymedicinas.com.mx/nota.asp?id=1196>, (página consultada en Marzo de 2009)
- (6) Vigilancia Epidemiológica Semana 1, 2009  
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem1/pdf/cua5.1.pdf>
- (7) Vigilancia Epidemiológica Semana 1, 2009  
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem1/pdf/cua5.2.pdf>.
- (8) Vigilancia Epidemiológica Semana 1, 2009  
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem1/pdf/cua4.pdf>
- (9) Vigilancia Epidemiológica Semana 1, 2009  
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem1/pdf/cua4.1.pdf>.
- (10) Planta de *Salvia officinalis* ([www.agraria.org/.../aromatiche/salvia.htm](http://www.agraria.org/.../aromatiche/salvia.htm))
- (11) flores de *Salvia* [http://es.wikipedia.org/wiki/Salvia\\_officinalis](http://es.wikipedia.org/wiki/Salvia_officinalis)
- (12) [http://www.geosalud.com/enfermedades\\_infecciosas/IRA.htm](http://www.geosalud.com/enfermedades_infecciosas/IRA.htm).
- (13) Introducción del libro *Herbolaria Mexicana*, de la Dra. Raquel Huerta Parra  
<http://www.geocities.com/acupuntos/herbolaria.htm>.
- (14) Font Quer, *Plantas medicinales, el Dioscórides renovado*. Editorial labor 1985.
- (15) Barnes Joanne, Anderson Linda and Phillipson. *David Herbal Medicines*, editorial PHP Pharmaceutical Press, 2ª edición, 2002. pp 408-410.
- (16). Ramawat K.G, *Biotechnology of medicinal plants, Vitalizer and Therapeutic Science Publishers, inc.* Enfield (nh) USA. 2004. pp 23-24.
- (17) González Gallardo Sofía, et. al. *Guía de Microscopia Electrónica*. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) 1ª edición. 2003.

- (18) Kelen Mustafa, Tepe Bektas. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora, *Bioresource Technology* 99(2008) pp. 4096–4104.
- (19) Mosmann, T. et al *Journal Immunology Methods*. (65)1(1983), pp.55–63.
- (20) Longaray Ana Paula, Delamare, Moschen-Pistorello, Artico Liane, Atti-serafini Luciana, Echeverrigaray Sergio. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. Cultivated in south Brazil *Food Chemistry* 100(2007) pp. 603-608
- (21) Weckessera, K. Engela, B. Simon-Haarhaus, A. Wittmerb, K. Pelzb, C.M. Schemppa Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological . *Phytomedicine* 14(2007) pp. 508-516
- (22) Bailly Fabrice, et al. Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeic acid dimers derived from *Salvia officinalis* *Bioorganic and medicinal Chemistry letters*. 15(2005) pp. 5053-5056
- (23) Yinrong Lu, L. Yeap, Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Food .Phytochemistry* 55(2000) pp. 263-267
- (24) Wise Mitchell L., Savage Thomas J., Katahira Eva, and Croteau Rodney, Monoterpene Synthases from Common Sage (*Salvia officinalis*) cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase . *Journal Biology Chemistry*. 12; 273(24) (1998) pp. 14891-14899
- (25) Bozin Biljana, Mimica-dukic neda, samojlik isidora et al. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal and Food Chemistry*. (2007), 55 pp.7879-7885
- (26) Definición de faringitis. <http://es.wikipedia.org/wiki/Faringitis>
- (27) <http://waste.ideal.es/salvia.htm> (Copyright © Waste magazine)
- (28)  
<http://www.casapia.com/Paginacast/Paginas/Paginasdemenu/MenudeInformaciones/Plantas Medicinales/Salvia.htm>.
- (30) Tipo de rejilla para MET.  
(<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/microelectrans.htm>)
- (31) [http://www.geosalud.com/enfermedades\\_infecciosas/IRA.htm](http://www.geosalud.com/enfermedades_infecciosas/IRA.htm) (pagina consultada en marzo 2009)
- (32) [http://www.pediatraldia.cl/01PBFULL/infecc\\_resp\\_agudas.htm](http://www.pediatraldia.cl/01PBFULL/infecc_resp_agudas.htm)
- (33) <http://www.saludymedicinas.com.mx/nota.asp?id=1101>.( Copyrights 2007 Grupo Multicolor)
- (34) Braunwald, Eugene Principios de Medicina Interna MC Graw Hill 2000

(35) Ramawat K.G. et al. Biotechnology of Medicinal Plantas (vitalizer and therapeutic) Science Publishers, Inc. USA 2004.

(36) [http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/peds\\_hrpregnant\\_sp/groupb.cfm](http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/peds_hrpregnant_sp/groupb.cfm)  
(© 2008 by the Rector and Visitors of the University of Virginia)

(38) <http://www.textoscientificos.com/quimica/mercaptanos> (pagina modificada enero 2007)

(39) Mac Fadin Jean, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Medica Panamericana S.A. de C.V., 1990, México, D.F.

(40) Prats Guillem, Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V. 2006. Argentina Buenos Aires.

(41) [http://www.gaylordchemical.com/bulletins/Bulletin101B\\_spanish/bulletin101b\\_spanish.pdf](http://www.gaylordchemical.com/bulletins/Bulletin101B_spanish/bulletin101b_spanish.pdf)

(42) [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012107932007000100002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012107932007000100002&script=sci_arttext)