

Efectividad de extractos naturales de té verde [*Camelia sinensis* (L.) Kuntze] y orégano orejón [*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.] sobre la inhibición *in vitro* de *Escherichia coli*

Carlos Salazar, Marleny Chavarri, Hennys Zárraga, Shimazú Martínez
y María Alejandra Quintero

Laboratorio de Micotoxicología del Instituto del Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579.
Maracay 2101. Aragua. Venezuela

RESUMEN

Escherichia coli es una especie bacteriana de importancia en la salud pública, ya que cada año centenares de miles de personas se enferman a causa de esta bacteria patógena, y cientos de ellas fallecen; es por esto que se evaluó la eficiencia de extractos naturales secos de té verde (*Camelia sinensis*) comercial al 100% y orégano orejón (*Plectranthus amboinicus*) seco y fresco al 100%, sobre la inhibición *in vitro* de una cepa de *E. coli*. Los extractos vegetales fueron obtenidos con etanol al 99%. Se sembraron en placas de Petri con agar nutritivo por extensión en superficie $2,36 \times 10^6$ UFC/ml de *E. coli*, seguidamente se colocaron en las placas discos de 6 mm impregnados con té verde (T1), orégano orejón seco (T2), orégano orejón fresco (T3), agua destilada estéril (T4) y etanol (T5), se incubaron a 37 °C por 48 a 72 h. Después de la incubación se procedió a la lectura del diámetro de los halos de inhibición. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cinco tratamientos y 18 repeticiones, los datos se sometieron al análisis de varianza, comparación de medias de Tukey y la Prueba t para las medias con las muestras emparejadas a las 48 y 72 h. Se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,01$), siendo el extracto de té verde el que presentó mayor capacidad inhibitoria, seguido por el orégano seco y el fresco, no presentándose inhibición del crecimiento de *E. coli* con etanol. Se encontró mayor poder inhibitorio de los extractos de té verde y orégano secos a las 72 h.

Palabras clave: Bacterias, crecimiento, diámetro, extractos vegetales.

Effectiveness of natural extracts of green tea [*Camelia sinensis* (L.) Kuntze] and oregano orejón [*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.] on the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli*

ABSTRACT

Escherichia coli is a bacterial species of importance in public health, since every year hundreds of thousands of people get sick from this pathogenic bacteria, and hundreds of them die; that is why the efficacy of 100%

*Autor de correspondencia: Marleny Chavarri

E-mail: marlenycoromoto@gmail.com

natural extracts of commercial dry green tea (*Camelia sinensis*), oregano orejón (*Plectranthus amboinicus*) dried and fresh, in *In Vitro* inhibition of an *E. coli* strain was evaluated. The plant extracts were obtained with 99% ethanol. They were seeded in Petri dishes with nutrient agar by surface extension 2.36×10^6 UFC ml of *E. coli*, then 6 mm discs impregnated with green tea (T1), dried oregano orejón (T2), oregano fresh orejón (T3), sterile distilled water (T4) and ethanol (T5), were placed on the plates and were incubated at 37 °C for 48 to 72 h. After incubation, the diameter of the inhibition halos was read in mm. A completely randomized design with five treatments and 18 repetitions was used; the data were submitted to the analysis of variances, comparison of means of Tukey and the t Test for means with the matched samples of the treatments at 48 and 72 h. There were highly significant differences between the treatments ($p < 0.01$), with green tea extract having the highest inhibitory capacity, followed by dry oregano and fresh, with no inhibition of *E. coli* growth with ethanol. The inhibitory power of the dried green tea and oregano extract was found at 72 h.

Key words: Bacteria, diameter, growth, plant extracts.

INTRODUCCIÓN

Las sustancias naturales de origen vegetal han sido utilizadas, desde tiempos ancestrales, para el control de microbios de importancia clínica en salud pública, así como para prevenir el deterioro de productos alimenticios o controlar la presencia de microorganismos patógenos en los mismos (Mora *et al.*, 2013).

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa promisoría, debido a su elevada efectividad, bajo costo y porque no contaminan el ambiente. Estos bioproductos se caracterizan por la presencia de determinados compuestos de origen natural, los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas y son agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides. Dichos compuestos proporcionan importantes características antimicrobianas o repelentes, que permiten su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad y su producción, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables (Rodríguez *et al.*, 2000).

Una especie bacteriana de gran importancia en la salud pública es *Escherichia coli*; cada año centenares de miles de personas se enferman a causa de esta bacteria patógena, y cientos de ellas fallecen. En los últimos años ha habido un aumento de los brotes de *E. coli* toxigénica y se han registrado millares de casos esporádicos de colitis hemorrágica (diarrea sanguinolenta), algunos de los cuales provocan el síndrome urémico hemolítico que puede llegar a ser mortal (Rodríguez-Ángeles, 2002). Los brotes

de *Escherichiacoli* toxigénica han tenido un efecto significativo en los sistemas de atención sanitaria, en la producción y el comercio agropecuarios en muchos países del mundo agropecuario, debido al deterioro de las fracciones nutritivas de los alimentos (FAO, 2016).

Entre las especies vegetales en las cuales se ha comprobado el efecto antimicrobiano se encuentran el extracto y la infusión de té verde (*C. sinensis*) y los extractos de orégano orejón (*P. amboinicus*) y de flores de manzanilla (*Matricaria chamomilla*), que han inhibido a *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Colivet *et al.*, 2012; Pukamaji, 2015; Vizcaya y Zárraga, 2018). Por lo antes señalado, se evaluó la efectividad de extractos naturales de té verde y orégano orejón sobre la inhibición *in vitro* de un aislado de *E. coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

La investigación se realizó en el instituto de Zoología Agrícola y en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química y Tecnología localizado en la Facultad de Agronomía (UCV) en Maracay, estado Aragua.

Obtención de los extractos de té verde y orégano orejón

Para la obtención de los extractos de té verde (*C. sinensis*) seco comercial y orégano orejón (*P. amboinicus*) fresco y seco, se pesaron 400 g de hojas de té verde deshidratadas (comercial) y 300 g de hojas frescas de orégano orejón (colectado en el jardín

de Microbiología de la Facultad de Agronomía, UCV), previamente lavadas con agua corriente, luego fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5% y lavadas 5 veces con agua destilada estéril (orégano fresco). Para obtener el orégano seco se realizó un secado de 15 kg de material fresco en estufa a 55 °C hasta obtener peso constante (Perva Uzunalic *et al.*, 2006, modificada). La extracción se realizó con etanol al 99%, agregándolos a cada tejido vegetal hasta cubrirlo, luego se maceraron e incubaron las muestras durante 8 d en frascos ámbar, en oscuridad. Después de la incubación, las muestras se filtraron y el volumen obtenido se transfirió a frascos ámbar estériles, el disolvente fue eliminado por roto evaporación a ebullición durante 1 h, el extracto obtenido se incubó a 35 °C por 4 h, se dejó enfriar y congeló hasta su posterior uso (Perva Uzunalic *et al.*, 2006).

Activación de la bacteria

La cepa CVCM 39 de *E. coli* fue suministrada por el cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. La bacteria se inoculó en caldo nutritivo y posteriormente se llevó a estufa a una temperatura de 37 °C por 24 h para activarla, inmediatamente se procedió a realizar la tinción Gram (Jay, 2009), para ello se tomó con el asa de siembra una porción del crecimiento del caldo nutritivo y se realizó un pequeño extendido en una lámina porta-objetos, se fijó al calor, y se aplicó una solución de cristal violeta durante 1 min, se lavó con agua y escurrió y se agregó lugol por 1 min. Seguidamente se lavó y decoloró con alcohol acetona durante 30 s, dejando evaporar el alcohol y finalmente se tiñó con solución de safranina durante 30 s, se lavó con agua, se dejó secar completamente al aire libre y se observó al microscopio óptico compuesto con un aumento de 1000X, verificándose su pureza (bacilos cortos Gram negativos).

Preparación del inóculo

Una vez activado el microorganismo en el caldo nutritivo y verificado su pureza, se tomó una alícuota del mismo y se transfirió a otro caldo nutritivo, incubándose en estufa a 37 °C por 48 h. A este último cultivo se le aplicó la técnica de profundidad o vertido en placa para determinar la población microbiana a inocular. Para ello se transfirió 1 ml del caldo con una pipeta estéril hasta un tubo de ensayo contenido de

9 ml de agua peptonada como diluyente para formar la dilución 10^{-1} . De esta dilución se tomó 1 ml con una pipeta estéril y se incorporó a un tubo de ensayo con 9 ml del diluyente, obteniéndose la dilución 10^{-2} . El mismo procedimiento se repitió para obtener la dilución 10^{-4} . Inmediatamente, fue transferido 1 ml de cada dilución y por duplicado a placas de Petri a las que se le agregaron 15 ml de caldo agar nutritivo licuado y enfriado a 45 °C, con movimientos rotatorios en sentido y en contra de las agujas del reloj, laterales y hacia atrás y hacia adelante, procurando no tocar la tapa de las placas. Luego las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h, tiempo después fueron contadas las colonias que se formaron en la superficie del medio de cultivo con un cuenta colonias. Los resultados se expresaron en las unidades formadoras de colonias (UFC/ml). (Covenin, 1978; Mariani *et al.*, 2010).

Prueba de la inhibición bacteriana *in vitro*

Se sembró el microorganismo con una concentración de inóculo de $2,36 \times 10^6$ UFC/ml (proveniente del contaje de la cepa activada, explicada en la preparación del inóculo), mediante el método de extensión en superficie (0,1 ml/ placa de Petri) en 18 placas de Petri contentivas del medio de cultivo agar nutritivo, para proceder a colocar 5 discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro en cada placa, impregnados con 20 μ l de extractos de *C. sinensis* al 100%, *P. amboinicus* al 100% seco y fresco, agua destilada estéril (ADE) como control positivo y etanol como control negativo, haciendo una pequeña presión de estos sobre el agar. Finalmente, estas placas se incubaron a 37 °C por 48 a 72 h (Cárdenas, 2012).

Medición del efecto antibacteriano

Después de la incubación se realizaron (con un vernier) las lecturas de los diámetros en mm de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, alrededor de los discos impregnados de los extractos de *C. sinensis*, *P. amboinicus* seco y fresco, agua destilada estéril y etanol al 99%, a las 48 y 72 h de incubación.

Diseño y análisis estadístico

Se utilizó un diseño totalmente aleatorizado con cinco tratamientos. T1 (Extractos seco de té verde comercial), T2 (extracto seco de orégano orejón), T3 (extracto fresco de orégano orejón), T4 (agua destilada) y T5 (etanol) y 18 repeticiones. Los datos

obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey, además se realizó la prueba t para medias con las muestras emparejadas de los tratamientos a los 48 y 72 h. Todos los análisis se hicieron con el programa estadístico Statistx 10.0 para Windows XP (SPSS, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los Cuadros 1 y 2, se presentan los resultados de los análisis de varianza aplicados a los tratamientos para la inhibición de *E. coli* a las 48 y 72 h, respectivamente; encontrándose en ambos casos diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre éstos.

En la comparación de medias de Tukey (Cuadro 3) se detectó que el 100% de los discos embebidos en el extracto natural de té verde al 100% (T1), mostraron el mayor efecto inhibitorio en comparación a los otros tratamientos a las 48 h, además aumentó su efecto a las 72 h, seguido por el extracto de orégano orejón seco (T2); solo el 27,7% de los discos embebidos con el extracto de orégano orejón fresco (T3) mostraron efecto inhibitorio. No hubo inhibición del crecimiento de *E. coli* con los discos embebidos con agua destilada estéril (T4) y etanol (T5), tanto a las 48 como a las 72 h. En la Figura 1 se visualiza los halos de inhibición de *E. coli* en cada uno de los tratamientos.

Resultados diferentes a la presente investigación fueron obtenidos por Mora *et al.* (2013), al evaluar la capacidad antimicrobiana del té verde (*C. sinensis*) contra los agentes potencialmente patógenos *E. coli*, *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, en 50 muestras diferentes de té verde seco y en infusión al 10%, distribuidas de manera comercial en Costa Rica; encontrándose que no hubo efecto antimicrobiano de las diferentes muestras contra los microorganismos evaluados, excepto con *L. monocytogenes*, utilizando concentraciones de 10,5 y 1,05 mg/ml de los extractos en el 70% de marcas analizadas y en el control. Así mismo, en la investigación realizada por Vizcaya y Zárraga (2018), comprobaron la capacidad inhibitoria del té verde sobre *Enterococcus faecalis* presente en cavidad bucal, utilizando 100% del extracto.

Por otro lado, Carballo (2012) determinó la actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos obtenidos de orégano francés (*Plecthranthus amboinicus*) y albahaca morada (*Ocimum sanctum*) frente a *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae*, determinando que los extractos inhibieron *E. coli*, *S. aureus* y *S. cerevisiae*, pero no *B. subtilis* y *A. oryzae*. Igualmente, Brandao *et al.* (2018), evaluaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de tomillo blanco, orégano, casia y árbol del té *contra*

Cuadro 1. Análisis de varianza realizado a los tratamientos para la inhibición de *Escherichia coli* a las 48 h.

FV	GL	SC	CM	FC	P	VFT
Tratamiento	4	5830,63	1457,66	492,94	0,0000	2,48
Error	85	251,71	2,96			
Error total	89	6082,33				

CV: 24,97%

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrados medios, FC: valor de F Calculado, P: probabilidad y FT: valor de F Tabulado.

Cuadro 2. Análisis de varianza realizado a los tratamientos para la inhibición de *Escherichia coli* a las 72 h.

FV	GL	SC	CM	FC	P	FT
Tratamiento	4	7216,72	1804,18	547,86	0,0000	2,48
Error	85	279,92	3,29			
Error total	89	7496,64				

CV: 24,91%

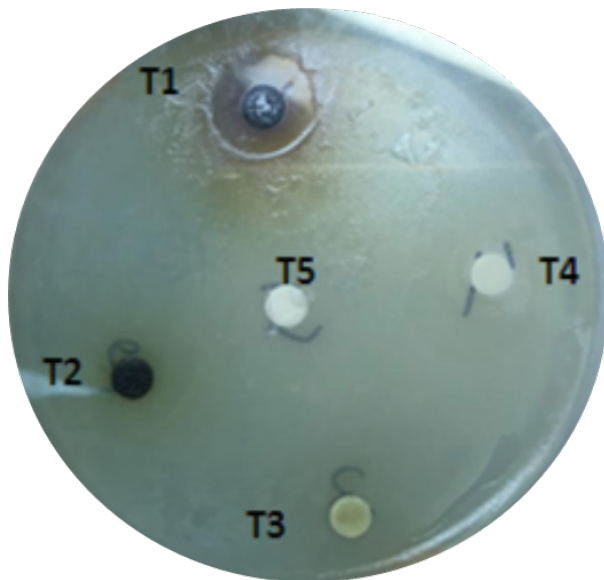
FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrados medios, FC: valor de F Calculado, P: probabilidad y FT: valor de F Tabulado.

Cuadro 3. Efecto inhibitorio de los tratamientos sobre el crecimiento de *Escherichia coli* a las 48 h y 72 h.

Tratamientos	48 h	72 h
	Medias (Diámetro de Inhibición en mm)	Medias (Diámetro de Inhibición en mm)
T1	19,98 a ¹	22,061 a
T2	12,58 b	14,150 b
T3	1,8883 c	2,2722 c
T4	0,0000 d	0,0000 d
T5	0,0000 d	0,0000 d

T1= Extracto seco de té verde comercial, T2= Extracto seco de orégano orejón, T3= Extracto fresco de orégano orejón, T4=Etanol y T5=Agua destilada estéril.

¹Medias con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,01$)



T1= Extracto seco de té verde comercial, T2= Extracto seco de orégano orejón, T3= Extracto fresco de orégano orejón, T4=Etanol y T5=Agua destilada estéril.

Figura 1. Halos de inhibición de *Escherichia coli* obtenidos en los diferentes tratamientos.

Salmonella typhimurium, *Staphylococcus enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis*, encontrándose que todas las cepas bacterianas utilizadas fueron sensibles a todos los aceites esenciales probados (basado en zonas de inhibición del crecimiento grandes y claras),

lo que sugiere un amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Los efectos de los tratamientos sobre el crecimiento de *E.coli* a las 48 y 72 h de incubación se presentan en los Cuadros 4, 5 y 6. Se encontraron diferencias altamente significativa ($p < 0,01$) entre la inhibición promedio de los extractos de té verde y orégano orejón seco a las 48 h respecto a la de las 72 h, resultando mayor el poder inhibitorio promedio de estos extractos a las 72 h (Cuadros 4 y 5); no ocurre así con el extracto fresco de orégano orejón (Cuadro 6), donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$), entre la inhibición promedio de este extracto a las 48 y 72 h.

Cuadro 4. Prueba t para medias de las muestras emparejadas de T1 a los 48 y 72 h.

	48 h	72
Media	19,98	22,06
Varianza	3,05	4,10
Observaciones	18,00	18,00
Coficiente de correlación de Pearson	0,79	
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	17,00	
Estadístico t	-7,10	
P(T<=t) una cola	0,00	
Valor crítico de t (una cola)	1,74	

Cuadro 5. Prueba t para medias de las muestras emparejadas de T2 a los 48 y 72 h.

	48 h	72
Media	12,59	14,15
Varianza	1,86	3,17
Observaciones	18,00	18,00
Coefficiente de correlación de Pearson	0,89	
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	17,00	
Estadístico t	-7,79	
P(T<=t) una cola	0,00	
Valor crítico de t (una cola)	1,74	

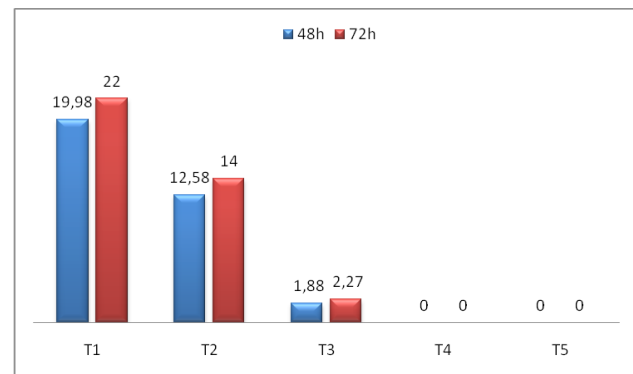
Cuadro 6. Prueba t para medias de las muestras emparejadas de T3 a los 48 y 72 h.

	48 h	72
Media	1,88	2,27
Varianza	9,89	11,10
Observaciones	18,00	18,00
Coefficiente de correlación de Pearson	0,90	
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	17,00	
Estadístico t	-1,14	
P(T<=t) una cola	0,14	
Valor crítico de t (una cola)	1,74	

Los resultados obtenidos con el extracto de té verde y orégano seco difieren de los encontrados por Vizcaya y Zárraga (2018) donde el mayor poder de inhibición de *E. faecalis* con té verde se detectó a las 48 h de incubación.

Diversos estudios han demostrado la acción de los polifenoles obtenidos en los extractos vegetales contra diferentes microorganismos, y de cómo interfieren en el crecimiento ejerciendo ya sea un efecto bacteriostático o bactericida. Un estudio presentado por Shimamura *et al.* (2007) muestra que el galato de epigallocatequina (EGCG) se une al peptidoglucano de la pared celular de las bacterias y forma precipitados, produciendo una interrupción en el proceso de biosíntesis de la misma, generando así la inhibición del crecimiento bacteriano.

En la Figura 2 se presentan los diámetros de inhibición de *E. coli* a las 72 h con un tamaño promedio de 22 mm para té verde y 14 mm para orégano orejón seco. Estos resultados son superiores a los señalados en las pruebas de inhibición de la cepa *E. coli* ATCC 25922 con el antibiótico ampicilina que fue de 13 mm (Ministerio de Salud del Perú, 2002).



T1= Extracto seco de té verde comercial, T2= Extracto seco de orégano orejón, T3= Extracto fresco de orégano orejón, T4=Etanol y T5=Agua destilada estéril.

Figura 2. Medias en mm de los halos de hibición de *Escherichia coli* obtenidos en los tratamientos a las 48 y 72h.

CONCLUSIONES

Escherichia coli fue inhibida por acción de los extractos naturales secos de té verde comercial y orégano orejón seco y fresco. Se encontró mayor poder inhibitorio del extracto de té verde en comparación con orégano seco y fresco. Los extractos naturales secos de orégano orejón presentaron mayor inhibición bacteriana que los frescos. La capacidad inhibitoria de los extractos de té verde y orégano orejón seco a las 72 h de incubación fue mayor que a las 48 h.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brandao, A.; A. Figueiredo; G. Schaefer; F. Bittercourt; C. De Andrade; L. Batista; M. Rostango. 2018. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 79: 285–289.

- Carballo, I. 2012. Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de orégano francés (*Plecthranthus amboinicus*) y albahaca morada (*Ocimum sanctum*). Trabajo de grado, Universidad de la Habana. 58 p.
- Cárdenas, A. 2012. Validación de la metodología estandarizada por el laboratorio para determinar la actividad antibacteriana de los jabones por halos de inhibición y la metodología empleada para determinar capacidad desinfectante por tiempos de contacto 0, 1, 5, 10, 30, y 60 minutos. Pasantía investigativa. Universidad Católica De Manizales. Manizales, Colombia. 63 p.
- Colivet, J.; G. Marcano; G. Belloso; D. Brito; E. Gómez. 2012. Efecto antimicrobiano de extractos etanólicos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2 (2): 313-320.
- Covenin. Comisión de Normas Industriales. 1978. Método para recuento de microorganismos aerobios en placa de Petri. Norma Venezolana N° 902-1978.
- FAO. 2016. Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales. En Línea. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i2530s/i2530s03.pdf>. (Consultado 2 de marzo del 2017).
- Jay, J. 2009. Microbiología moderna de los alimentos. 5ª ed, Editorial Acirbia, S.A. Zaragoza (España). 788 p.
- Ministerio de salud del Perú. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión en discos. Serie de normas técnicas. 30: 55-60
- Mora, A.; J. Parra; J. Chaverri; M. Arias. 2013. Determinación de la capacidad antimicrobiana del té verde (*Camellia sinensis*) contra los agentes potencialmente patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. ALAN. 63 (3): 247-253.
- Perva Uzunalic, A.; K. Mojca; Z. Kneza; B. Weinreich; F. Otto; S. Gruner. 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. Food Chem. 96: 597-605.
- Pukamaji, Y. 2015. Efecto antibacteriano de la infusión de *Camellia sinensis* (té verde) sobre *Streptococcus mutans* en cepillos dentales de estudiantes de I.E.S. San Antonio de Padua, puno -2015. Trabajo de grado. Puno, Perú. Universidad nacional del altiplano. 89 p.
- Rodríguez, A.; D. Morales; M. Ramírez. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. Revista Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Cuba. 21 (2): 79-82.
- Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública México. 44 (5): 464-475.
- Shimamura, T.; W-H. Zhao; Z. Qing. 2007. Mechanism of action and potential for use of tea catechin as an anti-infective agent. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry 6: 57-62.
- SPSS. 2008. SPSS Statistics for Windows. Ver. 10.0. SPSS Inc. Chicago, EUA. Jay, JM., James, M., Loessner, M., Martin, J., Golden, D. (2005). Modern Food Microbiology Springer, 7º edition. New York. p. 63.
- Vizcaya, M.; H. Zárraga. 2018. Inhibición *in vitro* del *Enterococcus faecalis* mediante extractos naturales de *Camellia sinensis*, *Matricaria chamomilla* e hipoclorito de sodio. 2017-2018. Trabajo de Grado. Facultad de Odontología, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. 75 p.