



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

TESIS

ANÁLISIS CUALITATIVO DE EXTRACTOS DE *Verbesina persicifolia* Y EVALUACIÓN *in vitro* DE SU EFECTO
ANTIMICROBIANO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

PRESENTA:
BELEM MONSERRAT BECERRA MÉNDEZ

DIRECTORAS:
DRA. IRAIS SÁNCHEZ ORTEGA
DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Mineral de la Reforma, Hgo., a 26 de septiembre de 2018

Número de control: ICBI-D/785/2018
Asunto: Autorización de impresión.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de Licenciatura en Química en Alimentos **Belem Monserrat Becerra Méndez**, quien presenta el trabajo de titulación "**Análisis cualitativo de extractos de *Verbena persicifolia* y evaluación *in vitro* de su efecto antimicrobiano**" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

- PRESIDENTE: Dra. Eva María Santos López
- PRIMER VOCAL: Dra. Iraís Sánchez Ortega
- SEGUNDO VOCAL: Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
- TERCER VOCAL: Dra. María Luisa Rodríguez Marín
- SECRETARIO: Dr. Javier Castro Rosas
- PRIMER SUPLENTE: Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz
- SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Esmeralda Rangel Vargas



Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente,
 "Amor, Orden y Progreso"

Dr. Oscar Rodolfo Suárez Casillas
 Director del ICBI



ORSC/SEPC



Campus de Gobierno
 Carretera Pl. Buca-Tlandicoyas 4.5 Colima
 C.P. 42000, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
 México, C.P. 42100
 Teléfono: +52 (771) 711 220 30 Ext. 223
 Fax 2100
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Los resultados de éste trabajo de investigación fueron presentados en el XXXI Congreso Nacional de Química Analítica, organizado por la Asociación Mexicana de Química Analítica en Mineral de la Reforma, Hidalgo, del 11 al 15 de junio de 2018. Se presentó en la modalidad cartel, obteniendo una **Mención honorífica**.



XXXI CONGRESO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA



EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTOS DE *Verbena persicifolia* SOBRE EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS Y DETERIORADORAS PRESENTES EN ALIMENTOS

Belen Monserrat Becerra Miranda, Eva María Sainza Lico, Irati Sánchez Ortaño, José Antonio Rodríguez Añón, Eusebio Rangel Vargas, Keria Yaneth Barrera Telleri
 Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Área Académica de Química, Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Carretera Pachucá-Tlaxiangua, km. 4.5, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, CP 42193. Tel: +52 (771) 717 0000 ext. 2512. e-mail: lucy1105@uaeh.mx

INTRODUCCIÓN

Plantas, hierbas y especias, así como sus aceites esenciales, contienen un gran número de compuestos con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos. La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en el material vegetal, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides [1]. *Verbena persicifolia* es un arbusto que pertenece a la familia Astarácea. Dentro de su caracterización fitoquímica, se ha reportado la presencia de poliacetilenos, isoprenoides, monoterpénos, sesquiterpenolactonas y derivados de sudesmanos [2].

Para este estudio, se seleccionaron tres disolventes de distinta polaridad, para obtener extractos de diferente composición: agua, cloroformo y éter de petróleo. Se realizó una caracterización fitoquímica a cada uno de los extractos mediante pruebas colorimétricas. Se realizó un estudio *in vitro*, en el cual se seleccionaron 5 bacterias patógenas responsables de diversas enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos contaminados (*Listeria monocitogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* (ETEC), *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*), y dos especies de bacterias deterioradoras de alimentos (*Leuconostoc mesenteroides* y *Micrococcus luteus*), utilizando la técnica de pozos en agar.

EXPERIMENTACIÓN

1. Obtención de los extractos



2. Pruebas para la identificación de grupos funcionales

| Nº | Verbenales | Carbónilos | Insaturados | Alcoholes | Alcoholes azucaros |
|----|--|------------|---------------------|-----------|---------------------|
| 01 | Testeio | 03 | Reacción de Fehling | 04 | Color verde |
| 02 | Reacción de Fehling | 05 | Reacción de Fehling | 05 | Reacción de Fehling |
| 03 | Descoloración de la solución de azul de metileno | 06 | Reacción de Fehling | 06 | Reacción de Fehling |
| 04 | Testeio | 07 | Reacción de Fehling | 07 | Reacción de Fehling |
| 05 | Testeio | 08 | Reacción de Fehling | 08 | Reacción de Fehling |
| 06 | Testeio | 09 | Reacción de Fehling | 09 | Reacción de Fehling |
| 07 | Testeio | 10 | Reacción de Fehling | 10 | Reacción de Fehling |
| 08 | Testeio | 11 | Reacción de Fehling | 11 | Reacción de Fehling |
| 09 | Testeio | 12 | Reacción de Fehling | 12 | Reacción de Fehling |
| 10 | Testeio | 13 | Reacción de Fehling | 13 | Reacción de Fehling |
| 11 | Testeio | 14 | Reacción de Fehling | 14 | Reacción de Fehling |
| 12 | Testeio | 15 | Reacción de Fehling | 15 | Reacción de Fehling |

3. Actividad antimicrobiana de los extractos



Bacterias Patógenas: 1. *Escherichia coli* O157:H7, 2. *Escherichia coli* (ETEC), 3. *Salmonella typhimurium*, 4. *Staphylococcus aureus*

Bacterias Deterioradoras: 1. *Leuconostoc mesenteroides*, 2. *Micrococcus luteus*

CONCLUSIONES

- El extracto con cloroformo resultó ser el de mayor rendimiento, y el que mayor efecto inhibitorio mostró sobre *M. luteus*.
- Se corroboró la presencia de compuestos que forman parte del tamiz fitoquímico de la planta.
- Se identificó la relación de los compuestos presentes en las fracciones etéreas, con el efecto inhibitorio que ejercieron sobre *M. luteus*.
- Se realizarán pruebas posteriores para observar un mayor efecto inhibitorio en el caso del extracto de éter de petróleo, o para determinar la concentración mínima inhibitoria, en el caso del extracto de cloroformo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención de los extractos

El cloroformo es el disolvente que mayor cantidad de sólidos extrae de la hoja seca, seguido del agua y por último del éter de petróleo. Por lo anterior, se deduce que la mayoría de los compuestos presentes en *Verbena persicifolia* son de polaridad intermedia.

| Disolvente utilizado | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Rendimiento (g/kg) | Temperatura de secado (°C) | Tiempo de secado (h) | Rendimiento del extracto (g/kg) | Rendimiento del extracto (en porcentaje) |
|----------------------|------------------|--------------|--------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------------|--|
| Agua | 80 | 30 | 0.55 | 50 | 12 | 0.55 | 0.55 |
| Cloroformo | 80 | 30 | 0.55 | 50 | 12 | 0.55 | 0.55 |
| Éter de petróleo | 80 | 30 | 0.55 | 50 | 12 | 0.55 | 0.55 |

2. Pruebas para la identificación de grupos funcionales

El extracto acuoso indicó la presencia de insaturaciones en la cadena carbonada, sesquiterpenolactonas, esteroides y metilsteroides, y saponinas. Los extractos con cloroformo y éter de petróleo mostraron la presencia de insaturaciones, esteroides y metilsteroides, lactonas, triterpenos, y esteroides.

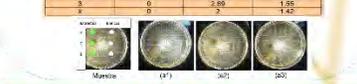
| Prueba / Extracto | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | P9 |
|-------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Disolvente | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Agua | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Cloroformo | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Éter de petróleo | + | + | + | + | + | + | + | + | + |



3. Actividad antimicrobiana de los extractos

El extracto con cloroformo tuvo un mayor efecto bactericida contra *M. luteus* que el de éter de petróleo. El cloroformo al ser el extracto que puede ejercer un efecto bactericida, como las sesquiterpenolactonas y los triterpenos.

| Nº. De extractos | Agua (mm) | Extracto Cloroformo (mm) | Éter de petróleo (mm) |
|------------------|-----------|--------------------------|-----------------------|
| 1 | 0 | 1.30 | 1.24 |
| 2 | 0 | 2.05 | 1.67 |
| 3 | 0 | 2.30 | 1.42 |



REFERENCIAS

[1] D. K. Tewari, y P. Srivastava, C. S. O. Doshi, K. Mathur, S. K. Datta, P. S. Datta, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5887-5893 (2003).

[2] A. B. Aquino-Moreno, Cultivos de alto valor de alimentos perennales (1): para la obtención de productos secundarios a partir del cultivo de café. Tesis, Universidad Veracruzana, México (2014).

[3] C. A. López-Flores, Caracterización de la actividad antimicrobiana del extracto etéreo de la especie *Verbena persicifolia* en otros miembros de la familia Verbenaceae. Tesis (2014).



CAPÍTULO FINAL: EL AGRADECIMIENTO

El tiempo se paralizó y los recuerdos están resurgiendo. El silencio se escucha mientras la mente viaja, esperando encontrar todos los momentos que han transcurrido a lo largo de esta travesía. Mi travesía infinita: el conocimiento.

Este capítulo se está leyendo primero pero en realidad se escribió al último. Las líneas a continuación están dedicadas en agradecimiento a las personas que me han acompañado durante mi travesía infinita, y para lectores como usted, que nunca dejan de soñar.

Mi primera mención está dedicada para las personas más importantes en mi vida: mis padres. Belén y Arturo: su apoyo incondicional, sus consejos y su amor han sido clave para desarrollar este y todos los proyectos que he llevado a cabo. Los guerreros han creado a una gran guerrera. Mi agradecimiento es eterno.

Para mi hermana. Valeria: me has enseñado más de lo que yo te he podido enseñar. Tu gran bondad, apoyo y amor fueron parte fundamental para el desarrollo de este trabajo. Eres mi gran compañera de travesías. Te agradezco infinitamente.

Para toda mi familia. En todo momento he recibido su apoyo a la distancia. Su granito de arena está hoy aquí reflejado. Gracias por todo.

Para mis directoras. Dra. Eva: gracias por apoyar la idea del proyecto y creer en mí. Sus enseñanzas y sus consejos me han llevado a lugares donde no creí estar. Dra. Irais: gracias por apoyarme a concluir este proyecto. Sus enseñanzas, sus consejos y su constante motivación son pieza fundamental de este logro.

Para mis profesores. Siempre estaré agradecida por transmitirme su conocimiento, sus consejos y sus experiencias durante este y todos los proyectos realizados. Por ustedes soy la profesional de ahora. Ha llegado el momento de ejercer el legado.

Para mis amigos y compañeros. De escuela, del trabajo, del intercambio: las aulas y los laboratorios fueron testigos del constante esfuerzo y dedicación. Siempre nos mantuvimos en un aprendizaje mutuo. Gracias por todos los momentos. Ahora cada quien descifra la clave del éxito.

Para mi novio. Ángel: el apoyo y el amor que me has brindado me ayudaron a concluir este proyecto. Gracias por tus consejos. La tenacidad nos llevará hasta el límite de nuestros sueños.

El siguiente estudio fue el resultado de un esfuerzo constante. Que le sea de apoyo y aprendizaje. Recuerde: "Todo es posible en la medida que usted crea que es posible". Las cosas pequeñas, juntas, son más grandes.



| ÍNDICE DE CONTENIDO | Pág. |
|--|-------------|
| Índice de figuras | vii |
| Índice de tablas | ix |
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción | 2 |
| 3. Marco teórico | 3 |
| 3.1. Contaminación de alimentos | 3 |
| 3.2. Susceptibilidad de los alimentos a la contaminación | 4 |
| 3.3. Fuentes de contaminación | 4 |
| 3.4. Microorganismos contaminantes de los alimentos | 5 |
| 3.4.1. Bacterias patógenas | 5 |
| 3.4.2. Bacterias deterioradoras | 8 |
| 3.5. Conservación de los alimentos | 11 |
| 3.5.1. Requerimientos de un método de conservación | 11 |
| 3.6. Métodos de conservación | 11 |
| 3.6.1. Antimicrobianos naturales como métodos de conservación | 13 |
| 3.6.2. Uso de plantas como antimicrobianos | 13 |
| 3.6.3. Compuestos de origen vegetal con actividad antimicrobiana | 14 |
| 3.6.4. Mecanismos de acción antimicrobiana | 17 |
| 3.6.5. Ventajas y desventajas del uso de plantas | 18 |
| 3.7. <i>Verbesina persicifolia</i> | 19 |
| 3.7.1. Descripción botánica | 19 |
| 3.7.2. Distribución geográfica | 19 |
| 3.7.3. Usos en la medicina tradicional | 20 |
| 3.7.4. Caracterización fitoquímica | 20 |

| | |
|--|----|
| 4. Justificación | 21 |
| 5. Hipótesis | 21 |
| 6. Objetivos..... | 22 |
| 6.1. Objetivo general | 22 |
| 6.2. Objetivos específicos | 22 |
| 7. Material y métodos | 23 |
| 7.1. Recolección del material vegetal..... | 23 |
| 7.2. Obtención de los extractos..... | 23 |
| 7.3. Pruebas para la identificación cualitativa de grupos de compuestos | 24 |
| 7.4. Purificación y activación de los cultivos bacterianos | 26 |
| 7.4.1. Selección de los cultivos bacterianos | 26 |
| 7.4.2. Activación de los cultivos bacterianos | 27 |
| 7.5. Tinción de Gram..... | 27 |
| 7.6. Prueba cualitativa para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos | 28 |
| 7.6.1. Preparación del cultivo madre | 28 |
| 7.6.2. Preparación del medio de cultivo..... | 29 |
| 7.6.3. Prueba de inhibición en superficie | 29 |
| 7.7. Prueba cuantitativa para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos | 30 |
| 7.7.1. Siembra del cultivo madre | 30 |
| 7.7.2. Siembra del cultivo con extractos | 31 |
| 8. Resultados y discusión | 32 |
| 8.1. Obtención de los extractos..... | 32 |
| 8.2. Pruebas para la identificación de grupos de compuestos | 34 |
| 8.3. Purificación y activación de los cultivos bacterianos | 46 |

| | |
|--|----|
| 8.4. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos..... | 48 |
| 8.5. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos frente al crecimiento de <i>M. luteus</i> | 54 |
| 9. Conclusiones | 60 |
| 10. Perspectivas..... | 60 |
| 11. Referencias bibliográficas | 61 |
| 12. Anexos | 71 |

| Índice de figuras | Pág. |
|---|-------------|
| Figura 1. Clasificación de los fitoquímicos..... | 15 |
| Figura 2. <i>Verbesina persicifolia</i> | 19 |
| Figura 3. Estructura química de 4β-cinnamoiloxi,1β,3α-dihidroxiudesmano-7,8eno..... | 20 |
| Figura 4. Localidad de Arroyo del Potrero, Martínez de la Torre, Veracruz..... | 23 |
| Figura 5. Posición de los extractos y sus respectivos disolventes..... | 30 |
| Figura 6. Resultados de la prueba del cloruro férrico (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco)..... | 35 |
| Figura 7. Resultados de la prueba del permanganato de potasio (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de arriba a abajo en cada imagen: control, prueba y blanco)..... | 36 |
| Figura 8. Resultados de la prueba de Baljet (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco)..... | 38 |
| Figura 9. Resultados de la prueba de Salkowski (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco)..... | 39 |
| Figura 10. Resultados de la prueba para cumarinas (A: Agua, C: Cloroformo, E: Éter de petróleo)..... | 40 |
| Figura 11. Resultados de la prueba para saponinas (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco)..... | 41 |
| Figura 12. Resultados de la prueba para triterpenos (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de arriba a abajo en cada imagen: control, prueba y blanco)..... | 43 |

| | |
|--|----|
| Figura 13. Resultados de la prueba para chalconas y auronas (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco)..... | 44 |
| Figura 14. Resultados de la prueba para esteroides (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco)..... | 45 |
| Figura 15. Pruebas de inhibición de los extractos de <i>V. persicifolia</i> frente a dos cepas de prueba: <i>M. luteus</i> (A) y <i>S. enteritidis</i> serotipo Typhimurium (B)..... | 51 |
| Figura 16. Inhibición en el crecimiento de <i>M. luteus</i> por los extractos de cloroformo (superior) y éter de petróleo (inferior)..... | 53 |
| Figura 17. Dispersión del extracto seco etéreo en caldo soya tripticaseína mediante ultrasonicado..... | 54 |

| Índice de tablas | Pág. |
|--|-------------|
| Tabla 1. Algunos productos finales del metabolismo microbiano de los nutrientes alimentarios..... | 9 |
| Tabla 2. Obstáculos utilizados para conservar alimentos..... | 12 |
| Tabla 3. Ventajas y desventajas del uso de plantas como antimicrobianos..... | 18 |
| Tabla 4. Resultados de las pruebas para la identificación de grupos de compuestos en los extractos acuoso, clorofórmico y etéreo de <i>V. persicifolia</i> | 45 |
| Tabla 5. Tinciones de Gram de los microorganismos de prueba..... | 46 |
| Tabla 6. Efecto de los extractos sobre el crecimiento de las diferentes cepas bacterianas frente a cada extracto..... | 49 |
| Tabla 7. Longitudes de los halos de inhibición (mm) registradas para <i>M. luteus</i> | 52 |
| Tabla 8. Inhibición del extracto clorofórmico de <i>V. persicifolia</i> sobre el crecimiento de <i>M. luteus</i> en CST a 30°C durante 24 h..... | 56 |
| Tabla 9. Inhibición del extracto etéreo de <i>V. persicifolia</i> sobre el crecimiento de <i>M. luteus</i> en CST a 30°C durante 24 h..... | 58 |

1. Resumen

Los alimentos son susceptibles de ser contaminados por agentes biológicos, en especial por bacterias. Estas pueden producir enfermedades en el ser humano y descomposición de los alimentos. Para eliminarlas, la industria se ha abierto al uso de antimicrobianos de origen natural, por ejemplo compuestos derivados de plantas, los cuales tienen la capacidad de retrasar o inhibir su crecimiento. Dentro de la caracterización fitoquímica de *Verbesina persicifolia*, se han identificado grupos de compuestos como monoterpenos y sesquiterpenlactonas, por lo que se infiere que esta planta puede tener un efecto inhibitorio contra bacterias. Para este estudio, se recolectó una muestra de las hojas de *V. persicifolia* de un lugar endémico, las cuales se secaron y se molieron. Posteriormente, se obtuvieron tres extractos de diferente polaridad: con agua, con cloroformo y con éter de petróleo. Los rendimientos obtenidos fueron de 13 %, 34.9 % y 2.9 %, respectivamente. Esto sugirió que la mayoría de los compuestos de *V. persicifolia* son de polaridad intermedia. A cada uno se le realizaron pruebas de identificación de grupos de compuestos. El extracto acuoso tuvo presencia de fenoles, saponinas, triterpenos, chalconas y auronas, y los extractos clorofórmico y etéreo tuvieron presencia de fenoles, sesquiterpenlactonas, esteroides, cumarinas, y esteroides. Cada extracto estéril se evaluó frente a siete cepas de prueba previamente aisladas y purificadas: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* (ETEC), *Salmonella enteritidis* serotipo Typhimurium, *Staphylococcus aureus* (patógenas), *Leuconostoc mesenteroides* y *Micrococcus luteus* (deterioradoras), mediante siembra en superficie. Sólo *M. luteus* presentó halos de inhibición frente a los extractos clorofórmico y etéreo. Se probaron seis concentraciones para cada extracto (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 % para los clorofórmicos; y 0.5, 1, 2, 2.5, 5 y 10 % para los etéreos), en tubos con caldo soya tripticaseína donde posteriormente se inoculó [10^3 ufc/mL] de *M. luteus*. Se incubaron a 30°C por 24 h. Los resultados mostraron que el extracto clorofórmico, a una concentración ≥ 0.5 %, resultó ser el más eficaz para lograr la inhibición en el crecimiento de *M. luteus* en 3 unidades logarítmicas, lo que sugiere ser un potencial inhibidor para esta bacteria.

2. Introducción

Desde que un alimento se origina hasta que llega al consumidor, es sometido a diversas operaciones en las que está expuesto a diversos agentes contaminantes, principalmente de tipo biológico (Garcinuño, 2013). Específicamente en microorganismos, las bacterias constituyen el grupo más amplio debido a su ubicuidad y su rápido índice de crecimiento, aún bajo condiciones en las que las levaduras y los mohos no pueden crecer, por ello se les consideran como los agentes más importantes en la descomposición de alimentos y en las enfermedades transmitidas por éstos (Ray y Bhunia, 2010). La creciente demanda de alimentos sanos, seguros, nutritivos y mínimamente procesados ha encaminado al desarrollo de nuevas técnicas de preservación. Una de ellas ha sido el uso de agentes antimicrobianos de origen natural, específicamente de plantas (Tiwari *et al.*, 2009). Aunque en México existe una diversidad de plantas medicinales de las cuales se ha ido demostrando su actividad antimicrobiana, como el orégano o el tomillo, aún falta una gran cantidad de plantas por analizar. Algunas posiblemente pueden tener un amplio espectro de inhibición frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alta incidencia en alimentos, y cuyo rendimiento de obtención puede resultar factible para su posterior uso como antimicrobiano en la industria alimentaria.

Verbesina persicifolia es un arbusto perteneciente a la familia Asterácea. Es endémica en los estados de Oaxaca, Puebla, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz. Su nombre más común es huichín (Biblioteca Digital de Plantas Medicinales, 2009). Posee un pH de 9.33 a 25 °C y grupos de compuestos como monoterpenos y sesquiterpenlactonas (Aguilar, 2014). Diversos estudios han demostrado su efecto hepatoprotector (Ocaña, Muñoz, Castro, y Hernández, 2000), anti convulsionante (López-Rosas, 2014), inhibitorio de la proliferación de células de varios tipos de cáncer (Dalla Via *et al.*, 2015) y antiinflamatorios (López-Canúl, 2015), pero su efecto antimicrobiano aún no se ha reportado. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio es identificar cualitativamente algunos grupos de compuestos presentes en 3 extractos de polaridad distinta de *V. persicifolia*, y evaluar su efecto sobre el crecimiento de bacterias patógenas y deterioradoras presentes en alimentos.

3. Marco teórico

3.1. Contaminación de alimentos

Desde su origen hasta su consumo, un alimento puede sufrir procesos de contaminación, deterioro y/o alteración, dependiendo del manejo al que es sometido. Aunado a esto, los alimentos son matrices que contienen una gran variedad de nutrientes, característica que los hace susceptibles de ser contaminados (Ito y Pouch, 2001).

De acuerdo a la Norma General del Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos (CODEX STAN 193-1995), un contaminante es: *“Cualquier sustancia no añadida intencionalmente al alimento, que está presente en dicho alimento como resultado de la producción (incluidas las operaciones realizadas en agricultura, zootecnia y medicina veterinaria), fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como resultado de contaminación ambiental. Este término no abarca fragmentos de insectos, pelo de roedores y otras materias extrañas”*.

Por lo tanto, la contaminación alimentaria se define como: la presencia de cualquier sustancia no añadida intencionalmente al alimento, que está presente desde su origen hasta su consumo, y que además compromete su calidad para el consumo humano.

Estos contaminantes pueden ser físicos, químicos o biológicos. Hablando específicamente de los contaminantes de origen biológico, los agentes microbiológicos son los de mayor importancia porque tienen la capacidad para producir enfermedades en el ser humano y descomposición de los alimentos (Garcinuño, 2013).

Microbiológicamente hablando, un alimento contaminado es aquel que contiene microorganismos como bacterias, levaduras, mohos, virus o toxinas producidas por ellos (Food and Agriculture Organization, 2018).

3.2. Susceptibilidad de los alimentos a la contaminación

Los alimentos son susceptibles de ser contaminados debido a que son un medio nutritivo en donde los microorganismos pueden crecer con facilidad. Los nutrientes incluyen carbohidratos, proteínas, lípidos, minerales y vitaminas. El agua no se considera un nutriente, pero es esencial como medio para reacciones bioquímicas. Todos los alimentos contienen estos cinco grupos principales de nutrientes, ya sea de forma natural o agregado, y la cantidad de cada nutriente varía según el tipo de alimento (Klinger, 2001).

La capacidad de los microorganismos (excepto los virus) para crecer o multiplicarse en un alimento está determinado por el entorno alimentario y el entorno en el que se encuentra, designados como el entorno intrínseco y extrínseco, respectivamente. Los factores intrínsecos de un alimento incluyen nutrientes, factores de crecimiento, inhibidores, actividad de agua, pH y el potencial óxido-reducción. Los factores extrínsecos incluyen la temperatura, la humedad relativa y la presencia de gases en el ambiente en el que se encuentran (Garcinuño, 2013).

3.3. Fuentes de contaminación

La contaminación de los alimentos está directamente relacionada a la cantidad de fuentes de contaminación a la que están expuestos durante su manipulación hasta su consumo.

Los tejidos internos de plantas sanas (frutas y verduras) y animales (carne) son estériles. Sin embargo, los alimentos crudos y procesados (excepto los estériles) contienen diferentes tipos de bacterias, levaduras, mohos y virus. Estos microorganismos entran en los alimentos de fuentes naturales (incluidas las internas) y de fuentes externas a las que un alimento entra en contacto desde el momento de la producción hasta el momento del consumo (Mossel, Moreno, y Struijk, 2006).

Las fuentes naturales para los alimentos de origen vegetal incluyen las superficies de frutas, vegetales, y granos. Las fuentes naturales para los alimentos de origen

animal incluyen piel, cabello, plumas, tracto gastrointestinal, tracto urogenital, vías respiratorias y conductos de la leche en los animales mamíferos.

Además de las fuentes naturales, un alimento puede estar contaminado con diferentes tipos de microorganismos provenientes de fuentes externas como el aire, el suelo, las aguas residuales, el agua, otros alimentos, los humanos, ingredientes de alimentos, los equipos, los envases y/o embalaje, etc. (Ray, 2004).

3.4. Microorganismos contaminantes de los alimentos

Muchas especies bacterianas, y algunos mohos y virus, son capaces de producir enfermedades de origen alimentario. Debido a su capacidad para crecer en los alimentos, casi todas las bacterias, mohos y levaduras (los virus no pueden crecer en los alimentos) pueden producir descomposición (Hernández, 2016).

Entre los cuatro principales grupos, las bacterias constituyen el grupo más amplio debido a su ubicuidad y su rápido índice de crecimiento, aún bajo condiciones en las que las levaduras y los mohos no pueden crecer, por ello se les consideran como los agentes más importantes en la descomposición de alimentos y en las enfermedades transmitidas por éstos (Ray y Bhunia, 2010).

De acuerdo al daño que pueden producir en su hospedador, las bacterias se pueden clasificar en patógenas y deterioradoras.

3.4.1. Bacterias patógenas

Una bacteria patógena se puede definir como un agente capaz de producir algún tipo de enfermedad a su hospedador (Fernández, 2008).

A menudo, las bacterias patógenas son relacionadas con enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). Las ETA son padecimientos que sufre un individuo como resultado de la ingestión de agua o alimentos contaminados, en este caso, con células de bacterias patógenas viables o sus esporas. Alrededor de 250 son los agentes causales de ETA, entre los que además de bacterias, también se incluyen virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales (Frazier y Westhoff, 2000).

Con base en las características de la enfermedad se pueden dividir en tres grupos; intoxicación o envenenamiento, infección y toxicoinfección (Hernández, 2016).

Intoxicación

Es una afección causada por la ingestión de algún producto químico nocivo o de una toxina preformada. La toxina se puede encontrar de forma natural en determinadas plantas o animales o ser un producto metabólico de naturaleza tóxica excretado por un microorganismo.

En el caso de origen microbiano, la toxina debe estar presente en forma activa en un alimento contaminado. Una vez que el microorganismo ha crecido y genera toxinas en un alimento, no hay necesidad de que éste tenga células viables cuando es consumido para que se presente la enfermedad. Por ejemplo, intoxicación por una neurotoxina producida por *Clostridium botulinum* (Frazier y Westhoff, 2000).

Infección

Es una enfermedad causada por la presencia y multiplicación de microorganismos patógenos en los tejidos del hospedero, después de la ingestión de un alimento contaminado (Hernández, 2016). Los patógenos infecciosos siguen normalmente un proceso de tres etapas mediante el cual provocan una respuesta patológica: ingestión de células viables, unión de estas células a lugares específicos a lo largo del tracto gastrointestinal (o algún otro mecanismo para evitar su arrastre debido a la peristalsis) e invasión del epitelio (gastroenteritis) o de todo el organismo (septicemia). Ejemplo, salmonelosis producida por *Salmonella* spp. (FAO y OMS, 2004) (Figuroa y Verdugo, 2005).

Toxicoinfección

Es el resultado de la ingestión de un gran número de células viables de algunas bacterias patógenas que se encuentran en el agua y en alimentos contaminados. Por lo regular, las células bacterianas esporulan, colonizan o mueren y liberan toxinas que producen los síntomas. Por ejemplo, gastroenteritis producida por *Clostridium perfringens*.

Además de los microorganismos patógenos asociados a las enfermedades de origen alimentario, hay algunas especies y cepas bacterianas que en general se consideran no patógenas, pero que tienen la capacidad de causar gastroenteritis, en especial en individuos susceptibles. Se les denomina patógenos oportunistas. Se requiere que estén vivos y presentes en grandes cantidades cuando son consumidos en los alimentos contaminados (Ray y Bhunia, 2010).

Entre los principales géneros bacterianos patógenos presentes en alimentos, se pueden mencionar:

Escherichia. Son bacilos rectos (1 X 4 μm); con o sin movilidad; mesófilos. Es el género más estudiado de entre todas las bacterias. Es un bacilo Gram negativo que se aísla del tracto intestinal de humanos, animales de sangre caliente y pájaros (Ray, 2004), y que se encuentra muy difundido en la naturaleza. Las fuentes alimentarias suelen ser carne de res, leche y jugo sin pasteurizar, quesos a partir de leche bronca, frutas y verduras crudas, agua contaminada, etc. Es uno de los géneros que integran el “grupo coliforme”, dividiéndose en muchos biotipos y serotipos, algunos de los cuales son patógenos potenciales para el hombre (Frazier y Westhoff, 2000). Entre ellos destacan: *E. coli* O157:H7, una cepa capaz de producir colitis hemorrágica (diarrea sanguinolenta severa) y el síndrome urémico hemolítico (SUH); y *E. coli* (ETEC), una cepa que debe su poder patógeno a la producción de enterotoxinas termolábiles y termoestables, principales causantes de diarrea (Fernández, 2008).

Listeria. Son bacillos cortos (0.5 X 1 μm); están ordenados individualmente o en cadenas cortas; son móviles; anaerobios facultativos. Las especies están ampliamente distribuidas en el medio ambiente y han sido aisladas de diferentes tipos de alimentos (Ray, 2004). Se ha aislado de fuentes como embutidos, lácteos, mariscos refrigerados, etc. Este género incluye siete especies de bacilos Gram positivos esporógenos. *L. monocytogenes* es capaz de producir brotes de enfermedades de origen alimentario, llamada listeriosis, con alta tasa de letalidad (Jay, 1994).

Salmonella. Son bacilos medianos (1 X 4 μm), generalmente móviles; mesófilos. Es comúnmente encontrada en el intestino de humanos, animales, aves e insectos (Ray, 2004). Se considera que todos los representantes de este género de enterobacterias Gram negativas pueden crecer en los alimentos y producir infecciones alimentarias. Normalmente sólo son vehiculadas por alimentos. Se ha aislado de fuentes como huevos, carne de res y aves de corral contaminados, jugo o leche sin pasteurizar, frutas y vegetales crudos contaminados, entre otros. Entre las cepas destaca *S. enteritidis* serotipo Typhimurium, causante de la fiebre tifoidea (Frazier y Westhoff, 2000).

Staphylococcus. Son células esféricas (de 0.5 a 1 μm); ocurren individualmente, en parejas o en grupos; son inmóviles; mesófilos; anaerobios facultativos; pueden crecer en 10% de NaCl. El hábitat principal es la piel de humanos, animales, y pájaros. Se ha aislado de alimentos que se preparan con las manos y no requieren de cocción adicional como ensaladas, productos de pastelería, emparedados, y otros como lácteos y huevos (Ray, 2004). Estos cocos Gram positivos incluyen a *S. aureus*, especie que es el agente causal de varios síndromes patológicos en el hombre, incluida la gastroenteritis transmitida por alimentos (Jay, 1994).

3.4.2. Bacterias deterioradoras

Por otro lado, existen bacterias que causan daño en el alimento en el que se encuentran, causando su descomposición. Esta alteración se suele detectar el desarrollo de olores o sabores que no corresponden a las características del alimento. Estos cambios dependen del tipo de actividad metabólica que lleve a cabo el microorganismo, determinada a su vez, por los constituyentes químicos presentes en el alimento que les sirven de sustrato (Mossel, Moreno, y Struijk, 2006), del tiempo y de las condiciones en las que son almacenados (Fernández, 2008).

Por ende, se puede definir a una bacteria deterioradora como aquella que propicia cambios físicos y reacciones químicas que suceden durante el almacenamiento de un alimento, y que llevan a la pérdida de su valor comercial.

Los cambios físicos y químicos son el resultado del metabolismo de algunos carbohidratos, compuestos proteínicos y no proteínicos, compuestos nitrogenados

no proteínicos (NPN) y algunos lípidos. Algunos cambios son de olor (elaboración de productos finales volátiles), color (producción de pigmentos u oxidación de los compuestos naturales que dan color), textura (por actividad enzimática), aumento o disminución del pH (producción de ácidos orgánicos), acumulación de gas (producción de CO₂, H₂, o H₂S), formación de limo (producción de dextrano y otros tipos de exopolisacáridos, o presencia de una biomasa formada por bacterias) y la acumulación de líquido (por el desdoblamiento de estructuras que contienen agua) (Ray y Bhunia, 2010). Los productos resultantes de las principales reacciones de deterioro se muestran en la tabla 1.

| Tabla 1. Algunos productos finales del metabolismo microbiano de los nutrientes alimentarios (Ray y Bhunia, 2010). | | |
|--|---------------------------------|--|
| Nutriente alimentario | Proceso | Productos finales |
| Carbohidratos | Fermentación | CO ₂ , H ₂ , H ₂ O ₂ , lactato, acetato, formiato, succinato, butirato, isobutirato, isovalerato, etanol, propanol, butanol, isobutanol, diacetil, acetoína, butanediol, dextrano, levanos |
| Compuestos NPN y proteínáceos | Desaminación y descarboxilación | CO ₂ , H ₂ , NH ₃ , aminas, cetoácidos, mercaptanos, disulfuros orgánicos, putrescina, cadaverina, escatol (3-metilindol) |
| Lípidos | Lipólisis | Ácidos grasos, glicerol, hidroperóxidos, compuestos carbonilo (aldehídos, cetonas), bases nitrogenadas |

En el momento en que la degradación se puede detectar por cambios en las propiedades organolépticas de los alimentos, la mayor parte de los mismos contiene más de 10⁶ bacterias mesofílicas aerobias por gramo. Algunos comestibles pueden ser inaceptables cuando tienen cifras de 10⁷ bacterias por gramo; mientras que, en productos no fermentados, las poblaciones microbianas alcanzan una

concentración de 10^9 bacterias por gramo, que se correlaciona con una alteración muy avanzada (Hernández, 2016).

Entre los principales géneros bacterianos deterioradores presentes en alimentos, se pueden mencionar:

Leuconostoc. Junto con los lactobacilos, éste es otro de los géneros de bacterias ácido lácticas. Son cocos Gram positivos, heterofermentativos (Jay, 1994). Fermentan el azúcar produciendo ácido láctico e importantes cantidades de ácido acético, alcohol etílico y de dióxido de carbono (Frazier y Westhoff, 2000). Algunos se usan en la fermentación de alimentos. Las cepas psicrótróficas están asociadas con el deterioro (formación de gas) de alimentos refrigerados en envases al vacío. Se encuentra en plantas, carne y leche (Ray, 2004). La cepa *L. mesenteroides* presenta tolerancia a elevadas concentraciones de azúcar (55-60%) y sal, lo que le permite llevar a cabo la primera fase de la fermentación láctica, modificando el perfil sensorial de alimentos en los que no se desea (Jay, 2000).

Micrococcus. Son cocos Gram positivos, aerobios y mesófilos. La mayoría de las especies son capaces de fermentar azúcares produciendo una mediana cantidad de ácido, algunas desdoblan proteínas con producción de ácidos, y otras toleran elevadas concentraciones de NaCl (Frazier y Westhoff, 2000). Pueden causar descomposición. La cepa *M. luteus* produce un pigmento amarillo sobre la superficie de los alimentos en los que crecen y un sabor ácido, principalmente en carnes. Es comúnmente encontrada en la piel de los mamíferos (Ray, 2004). También es un constituyente de la flora bacteriana bucal humana normal que forma colonias amarillentas y aparece como un coco Gram positivo típicamente dispuesto en tetradas. Aunque de baja virulencia, el germen puede volverse patógeno en pacientes con resistencia alterada, colonizando la superficie de las válvulas cardíacas. A diferencia de los estafilococos (por lo que puede confundirse fácilmente), generalmente es sensible a la penicilina (Dürst *et al.*, 1991).

3.5. Conservación de los alimentos

Las bacterias patógenas y deterioradoras comprometen la seguridad y la calidad de los alimentos, por lo tanto una conservación adecuada resulta importante.

El objetivo de la conservación de alimentos es someter a los microorganismos patógenos y de descomposición en un ambiente hostil para inhibir su crecimiento, acortar su supervivencia o eliminarlos (Alakomi *et al.*, 2002).

Según Shafiur (2003), la conservación de los alimentos comprende aquellas acciones tomadas a fin de mantener los alimentos con sus propiedades deseadas o su naturaleza durante el mayor tiempo posible. Por ende, es el principal objeto del procesado de alimentos.

3.5.1. Requerimientos de un método de conservación

Para lograr una correcta conservación, se debe de seleccionar un método adecuado. Un método de conservación “ideal” debería poseer las siguientes características (Morata, 2010):

- Incrementar la seguridad y durabilidad del producto inactivando microorganismos patógenos y alterantes.
- No debe modificar los atributos organolépticos y nutricionales del alimento
- No debe dejar residuos
- Debe ser barato y de fácil aplicación
- No debe tener nada objetable por consumidores y legisladores

Un alimento puede requerir más de un método de conservación, por lo cual se ha propuesto el uso de diversos “obstáculos”.

3.6. Métodos de conservación

Los métodos, también llamados obstáculos, usados en la conservación de los alimentos, de acuerdo a su naturaleza y/o interacción que ejercen con el medio y con el microorganismo, se pueden dividir en: físicos, fisicoquímicos, microbianos y misceláneos (Tabla 2).

En una matriz alimentaria se puede colocar más de un obstáculo, para que en conjunto logren una conservación por más tiempo. Esto es el llamado *efecto*

obstáculo (Leistner, 1995), que se refiere a que cada factor es un obstáculo que los microorganismos deben superar.

| Tabla 2. Obstáculos utilizados para conservar alimentos (Alakomi <i>et al.</i> , 2002) | | |
|--|---------------------------------------|-------------------------|
| Obstáculos físicos | | |
| -Embalaje aséptico | | |
| -Energía electromagnética (microondas, frecuencia de radio, campos magnéticos pulsados, campos eléctricos altos) | | |
| -Temperaturas elevadas (escaldado, pasteurización, esterilización, evaporación, extrusión, cocción, freído) | | |
| -Radiación ionizante | | |
| -Bajas temperaturas (refrigeración, congelación) | | |
| -Atmósferas modificadas | | |
| -Películas de embalaje (incluidos envases activos, revestimientos comestibles) | | |
| -Inactivación fotodinámica | | |
| -Presiones ultra altas | -Ultrasonido | -Radiación ultravioleta |
| Obstáculos físico-químicos | | |
| -Dióxido de carbono | -Ozono | |
| -Etanol | -Fenoles | |
| -Ácido láctico | -Fosfatos | |
| -Lactoperoxidasa | -Sal | |
| -pH bajo | -Ahumado | |
| -Bajo potencial redox | -Nitrito/nitrato de sodio | |
| -Baja actividad de agua | -Sulfito de sodio o de potasio | |
| -Productos de la reacción de Maillard | -Especias y hierbas | |
| -Ácidos orgánicos | -Agentes de tratamiento de superficie | |
| -Oxígeno | | |
| Obstáculos microbiológicos | | |
| -Antibióticos | -Culturas protectoras | |
| -Bacteriocinas | | |
| -Flora competitiva | | |

3.6.1. Antimicrobianos naturales como métodos de conservación

Para satisfacer la demanda de alimentos nutritivos, seguros y sensorialmente atractivos por parte de los consumidores, la industria se ha abierto al uso de conservantes naturales derivados de plantas, animales o microorganismos. Este grupo de conservadores pueden extender la vida útil de los alimentos no procesados y procesados mediante la reducción en la tasa de crecimiento microbiano y su viabilidad. Pueden usarse solos o en combinación con otras tecnologías no térmicas (tecnologías emergentes) (Davidson y Zivanovic, 2003).

Numerosos agentes antimicrobianos existen en animales, plantas y microorganismos donde evolucionaron como mecanismos de defensa del hospedador.

Dentro de los agentes antimicrobianos derivados de animales, existen diferentes tipos de acuerdo al subproducto de donde vienen, por ejemplo, de la leche se derivan lactoferrinas, lactoperoxidasa o lactoglobulinas; del huevo se derivan lisozimas, ovotransferrinas y ovoglobulinas; de la cubierta de los crustáceos se deriva el quitosano. De las plantas se derivan fitoalexinas, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, aceites esenciales y sus componentes, tiosulfonatos, saponinas, entre otros. De los microorganismos se derivan probióticos, bacteriocinas como la nisina, la pediocina, la reuterina, la sakacina, entre otras. (Shafiur, 2007).

3.6.2. Uso de plantas como antimicrobianos

Las plantas comestibles, medicinales y herbales, y sus aceites esenciales, contienen un gran número de metabolitos secundarios que se sabe retrasan o inhiben el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos (Tiwari *et al.*, 2009).

Los compuestos antimicrobianos de origen vegetal se pueden encontrar en la planta intacta o pueden ser liberados por infección o lesión. Se encuentran distribuidos comúnmente en la fracción del aceite esencial de las hojas (ej., romero, salvia, albahaca, orégano, tomillo y mejorana), flores o brotes (ej., clavo), bulbos (ej., ajo y cebolla), semillas (ej., alcaravea, hinojo, nuez moscada y perejil), rizomas (ej., asafétida), frutos (ej., pimienta y cardamomo) u otras partes de las plantas (Peredo,

Palou y López, 2009). Su actividad antimicrobiana está influenciada por factores como la fuente botánica, el tiempo de cosecha, la etapa de desarrollo y el método de extracción.

Estudios *in vitro* han demostrado la actividad antibacteriana de aceites esenciales frente a patógenos alimentarios como: *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* serotipo Typhimurium, *E. coli* O157:H7, *Shigella disentería*, *Bacillus cereus* y *S. aureus*. Las bacterias Gram negativas son menos susceptibles a estos tratamientos que las bacterias Gram positivas. Se conocen en la actualidad muchos aceites esenciales con interesantes propiedades antibacterianas: carvacrol, timol, eugenol, perillaldehído, cinamaldehído y ácido cinámico. Estos productos tienen concentraciones mínimas inhibitorias en el rango 0,05 – 5 µL/mL *in vitro*, sin embargo, son necesarias concentraciones más elevadas para obtener el mismo resultado en alimentos. Se ha propuesto el uso de combinaciones de diferentes aceites esenciales para poder minimizar la aplicación de las concentraciones requeridas, reduciendo así el impacto organoléptico (Tiwari *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales más efectivos en general son moléculas de naturaleza terpénica o aromática en las que con frecuencia existen grupos carbonilo o hidroxilo (Morata, 2010).

En general, el poder antimicrobiano de los aceites esenciales depende de la estructura química de sus componentes, así como de su concentración (Gutierrez, Barry, y Bourke, 2008).

3.6.3. Compuestos de origen vegetal con actividad antimicrobiana

Los compuestos presentes en las plantas intactas incluyen alcaloides, dienos, flavonoles, flavonas, glucósidos, lactonas, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y compuestos tipo proteína. Los inhibidores de la post-infección pueden incluir isotiocianatos, compuestos fenólicos, fitoalexinas y sulfóxidos (Davidson y Zivanovic, 2003).

En la figura 1, se muestra una clasificación general que incluye a todos los compuestos mencionados anteriormente.

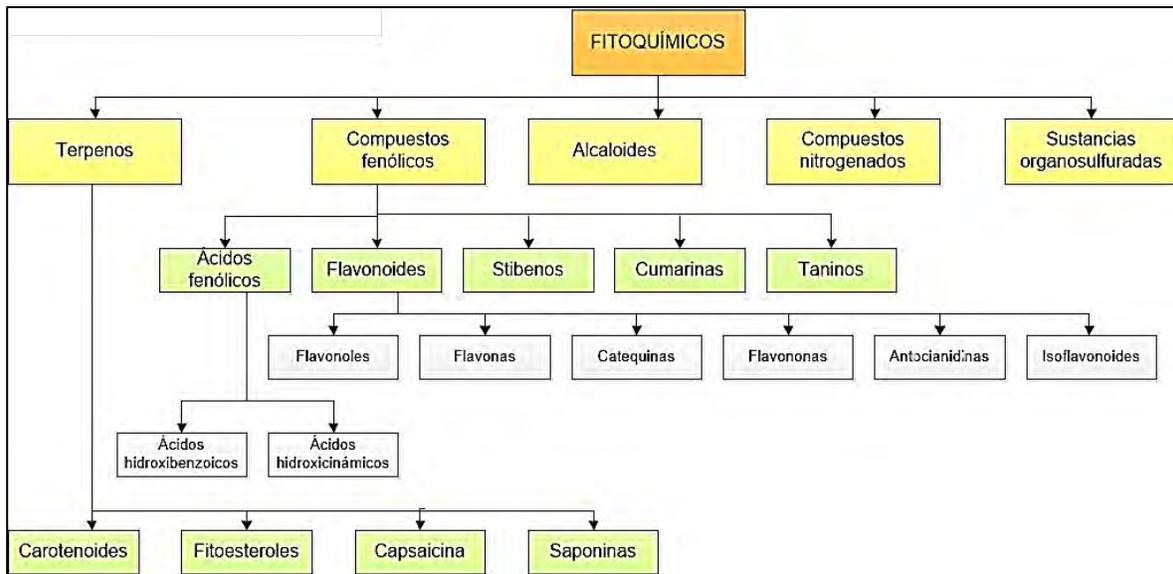


Figura 1. Clasificación de los fitoquímicos (García, 2007; Aponte *et al.*, 2013; Chasquibol *et al.*, 2003).

De todos los compuestos que se ilustran en la figura 1, los terpenos, los compuestos fenólicos y las sustancias organosulfuradas son los que tienen mayor reconocimiento como fito-antimicrobianos (García, 2007).

- Terpenos

En los aceites esenciales, los terpenos son los compuestos más abundantes, entre sesquiterpenos y monoterpenos (Bueno, Martínez, y Stashenko, 2009). Los terpenos son a menudo llamados isoprenoides, teniendo en cuenta que el isopreno es su precursor biológico. Derivan de la fusión repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos, basadas en la estructura del isopentenilo (Vega y López, 2009). Dentro de este grupo se encuentran las saponinas, compuestos que protegen a las plantas del estrés biótico y también provocan actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Oleszek, 2000).

Los compuestos que engloban a los terpenos son, en su mayor parte, solubles en alcohol y, hasta cierto límite, en agua. Como ejemplos de terpenos con un amplio espectro de efectos antimicrobianos están el timol, extraído a partir del tomillo

(*Thymus vulgaris*), el carvacrol a partir del orégano (*Origanum vulgare*), el cinnamaldehído a partir de la canela (*Cinnamomum verum*) y el eugenol a partir del clavo (*Syzygium aromaticum*) (Shafiur, 2003). Estos compuestos tienen efecto inhibidor contra varias bacterias, mohos y levaduras, incluidos *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aspergillus parasiticus* (Davidson y Zivanovic, 2003).

- Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están caracterizados por un anillo aromático que engloba uno o, más frecuentemente, varios sustitutos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (Shafiur, 2003).

Dentro de los ácidos hidroxicinámicos, se incluyen los ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinapico. Se encuentran en plantas y alimentos vegetales principalmente como ésteres y en menor frecuencia como glucósidos. Herald y Davidson (1983) demostraron que los ácidos ferúlicos a 1000 g/mL y el *p*-cumárico a 500 - 1000 g/mL inhibieron el crecimiento de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Los compuestos fueron mucho menos efectivos contra *Pseudomonas fluorescens* y *E. coli*.

Los flavonoides se han caracterizado ampliamente por su actividad antimicrobiana. Los isoflavonoides son potentes inhibidores del crecimiento fúngico. Ciertos compuestos fenólicos pueden ser biosintetizados *de novo* después de la infección. Estos compuestos que no existen antes de la infección y que provocan actividad antimicrobiana se llaman fitoalexinas. Son producidos por las plantas como un mecanismo de defensa en respuesta a la infección microbiana (Naidu, Bidlack, y Crecelius, 2000).

- Sustancias organosulfuradas

El jugo y los vapores de cebolla, ajo y rábano picante han sido evaluados como antimicrobianos, por su contenido de tiosulfatos. Los tiosulfatos como la alicina y el ajoeno son los componentes antimicrobianos del ajo (*Allium sativum*). Presentan

actividad antifúngica y antibacteriana. Se ha demostrado que en poblaciones con alto consumo de ajo, hay menor incidencia de cáncer gástrico, causado por el agente *Helicobacter pylori*. También es capaz de inhibir bacterias Gram negativas y levaduras (Whitmore y Naidu, 2000).

Los isotiocianatos son derivados de glucosinolatos en células de plantas de la familia Cruciferae (coliflor, coles de Bruselas, brócoli, repollo, col rizada, rábano picante, mostaza, nabos, etc.). Se forman en respuesta a una lesión mecánica de la planta. Son inhibidores de hongos, levaduras y bacterias en un rango de 16-110 ng/mL en fase de vapor y 10-600 µg/mL en fase líquida (Davidson y Zivanovic, 2003). Delaquis y Mazza (1995) encontraron una reducción logarítmica de 1 a 5 en células viables de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. enteritidis* serotipo Typhimurium en presencia de 2000 g de isotiocianato por mL de aire. Delaquis y Sholberg (1997) examinaron este efecto más allá y mostraron que 1000 g de isotiocianato por mL de aire aparentemente disminuyeron *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* serotipo Typhimurium y *L. monocytogenes* hasta 6 logaritmos. Sin embargo, las células se recuperaron en medida de que estaban expuestas al aire.

3.6.4. Mecanismos de acción antimicrobiana

Los compuestos presentes en los aceites esenciales pueden presentar diferente especificidad respecto a los sitios activos en la célula microbiana. Una característica importante de estos compuestos es su hidrofobicidad, lo cual permite la separación de los lípidos de la membrana celular y la mitocondria, desordenando su estructura y haciéndola más permeable, lo que permite la filtración de iones activos que funcionan como antimicrobianos (Vega y López, 2009).

El efecto de los compuestos fenólicos es dependiente de la concentración. A baja concentración, los fenoles afectan la actividad enzimática, mientras que en altas concentraciones, causan desnaturalización de proteínas. El efecto antimicrobiano de los compuestos fenólicos puede deberse a su capacidad para alterar la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, lo que permite la pérdida de macromoléculas desde el interior. También pueden interferir con la función de la membrana (transporte de electrones, absorción de nutrientes, proteínas, síntesis de

ácidos nucleicos y la actividad enzimática) e interactuar con proteínas de la membrana, causando deformación en la estructura y funcionalidad (Tiwari *et al.*, 2009).

Los compuestos organosulfurados, como los presentes en el ajo y la alicina, inactivan proteínas, causan inhibición competitiva de compuestos de sulfhidrilo o inhibición no competitiva de las funciones enzimáticas por oxidación (Whitmore y Naidu, 2000).

3.6.5. Ventajas y desventajas del uso de plantas

Aunque se ha demostrado el potencial antimicrobiano de los compuestos presentes en plantas y sus aceites esenciales, también tienen ciertas limitantes en su uso, mismas que se mencionan en la tabla 3.

| Tabla 3. Ventajas y desventajas del uso de plantas como antimicrobianos | |
|--|--|
| Ventajas | |
| <ul style="list-style-type: none"> - Son productos 100 % naturales - Son poco susceptibles de ser contaminadas con microorganismos patógenos para el ser humano - Pueden ser clasificadas como agentes GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA, lo que permite su libre adición dentro de las formulaciones - Son una fuente de fácil obtención - Además del efecto antimicrobiano, pueden aportar otras propiedades como antioxidantes, terapéuticas, etc. - Menor percepción de riesgo en comparación con el uso de aditivos artificiales. - Se pueden dar efectos sinérgicos con la adición de dos o más agentes de origen vegetal - Algunas pueden aportar sabor o aroma al producto que se incorporan, siempre y cuando el efecto sea deseable. - La extracción de sus compuestos, en algunos casos, no daña al medio ambiente. | |
| Desventajas | |
| <ul style="list-style-type: none"> - Tienen un bajo rendimiento, con lo cual aumenta el coste de la extracción - Se necesita una alta concentración para obtener un efecto de preservación - Pueden existir alteraciones en el perfil sensorial del alimento donde se adicionan si estas no se desean - La matriz alimentaria interfiere en la acción de los compuestos activos | |

Fuente: Rodríguez (2011).

3.7. *Verbesina persicifolia*

3.7.1. Descripción botánica

Verbesina persicifolia es un arbusto de hasta 3 m de altura que pertenece a la familia Asteráceas (Figura 2), posee hojas alternas y peciolo de 7-12 mm, las hojas inferiores alargadas y las superficies pinatífidas; lámina lanceolado-elíptica a oblongo ovalada, atenuadas en ambas extremidades, aserrados de 7-12 cm y con flores en cabezuelas amarillas pequeñas (Vibrans, 2011).



(A)



(B)

Figura 2. *Verbesina persicifolia* (A: fresca, B: seca) (Hinton, 2018)

3.7.2. Distribución geográfica

Se encuentra distribuida en los estados de Oaxaca, Puebla, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz. Esta planta es conocida con los nombres comunes de *huichín*, *taxiwua* y *tlamacas* (Biblioteca Digital de Plantas Medicinales, 2009). En el Estado de Veracruz, se distribuye considerablemente en la Región Norte, específicamente en el Municipio de Papantla y Martínez de la Torre en localidades como Adolfo Ruiz Cortines, Agua Dulce, Allende, Belisario Domínguez, Cazuelas, Cerro del Carbón, Arroyo Grande, Arroyo Verde, Arrollo Negro y Arroyo del Potrero, entre otras. (Hernández, *et al.*, 2013).

3.7.3. Usos en la medicina tradicional

Verbesina persicifolia es una planta que florea todo el año (Botta *et al.*, 2003). En la medicina tradicional mexicana, *V. persicifolia* ha sido utilizada para el alivio de la gastritis, la diabetes, enfermedades de riñón, para la disentería, para desinflamar estómago, hígado y granos, así como para contrarrestar los dolores de huesos y musculares (Biblioteca Digital de Plantas Medicinales, 2009).

No se conoce el potencial tóxico de esta planta a pesar de su consumo frecuente entre varias comunidades del Estado de Veracruz (López-Canúl, 2015).

3.7.4. Caracterización fitoquímica

Los estudios fitoquímicos del género *Verbesina* indican la presencia de componentes como terpenoides, triterpenoides, flavonoides, sesquiterpenos, eudesmanos, saponinas y aceites esenciales (Aguilar, 2014).

Dentro de la caracterización fitoquímica de *Verbesina persicifolia*, se han identificado isoprenoides como los sesquiterpenos, monoterpenos y sesquiterpenlactonas (López-Rosas, 2014).

Específicamente, de las hojas y las flores de *Verbesina persicifolia* se aislaron compuestos derivados trihidroxilados del eudesmano, de los que se identificaron el 6 β -cinamoiloxi-4 α ,11-dihidroxi-eudesmano, el 6 β -cinamoiloxi-4 α -4 β -dihidroxi-eudesmano-1-ona y el 4 β -cinnamoiloxi,1 β ,3 α -dihidroxi-eudesmano-7,8-eno (Figura 3). Además, la raíz de esta planta presenta cinamatos, así como pequeñas cantidades de sesquiterpenlactonas. Sin embargo, no se ha explorado la actividad biológica de estos compuestos (López-Canúl, 2015).

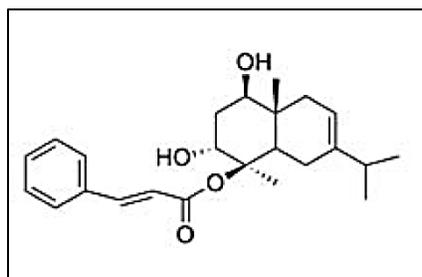


Figura 3. Estructura química de 4 β -cinnamoiloxi,1 β ,3 α -dihidroxi-eudesmano-7,8-eno (Dalla Via *et al.*, 2014).

4. Justificación

En la actualidad, los consumidores demandan alimentos más nutritivos, seguros y que conserven sus propiedades “naturales”. Esto ha llevado a la industria alimenticia a buscar nuevas tecnologías o combinaciones de ellas que ayuden a proteger a los alimentos de la acción de bacterias, principalmente patógenas y deterioradoras, sin modificar sus propiedades nutricionales y sensoriales.

Diversos estudios han demostrado que algunas especies de plantas, hierbas y especias poseen compuestos como terpenos y fenoles, que ejercen inhibición en el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras. Se ha reportado que *Verbesina persicifolia* contiene compuestos como isoflavonoides, sesquiterpenos, monoterpenos y sesquiterpenlactonas (López-Canúl, 2015). Estos mismos grupos de compuestos se han aislado de otras fuentes vegetales, como el tomillo (*Thymus*) y el orégano (*Origanum vulgare*), cuyos efectos *in vitro* contra microorganismos se han demostrado. Debido a ello, es posible que la planta pueda tener efecto antimicrobiano contra bacterias.

Por consiguiente, en el presente estudio se evaluó el efecto de tres extractos de polaridad distinta provenientes de la planta *Verbesina persicifolia* contra bacterias patógenas y deterioradoras que comúnmente pueden encontrarse en los alimentos.

5. Hipótesis

Los extractos de diferente polaridad de *Verbesina persicifolia* ejercen un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias patógenas y deterioradoras comúnmente encontradas en alimentos.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Analizar cualitativamente los extractos de diferente polaridad de *Verbesina persicifolia* y evaluar su efecto *in vitro* sobre el crecimiento de microorganismos patógenos y deterioradores de alimentos.

6.2. Objetivos específicos

- Obtener los extractos de la planta deshidratada mediante extracción sólido-líquido utilizando 3 disolventes de polaridad distinta.
- Identificar algunos de los posibles grupos de compuestos presentes en cada uno de los extractos, mediante pruebas cualitativas.
- Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos obtenidos sobre el crecimiento de microorganismos patógenos y deterioradores de alimentos.

7. Material y métodos

7.1. Recolección del material vegetal

La planta *Verbesina persicifolia* se recolectó en la comunidad de Arroyo del Potrero, municipio de Martínez de la Torre, Veracruz, de donde esta planta es endémica (Figura 4). La especie fue identificada con asesoría de los habitantes de la comunidad y tomando como referencia fotografías de campo de la base de datos de la *Biblioteca Digital de Plantas Medicinales* (2009): arbusto de 2 a 3 m de altura, hojas ligeramente alargadas y de hasta 14 cm de largo. Las flores crecen en grupos formando cabezuelas que se esparcen numerosas en la planta.

La recolección se llevó a cabo en el mes de diciembre de 2016. Se recolectaron aproximadamente 10 Kg de hojas, seleccionando los arbustos aleatoriamente.

Las hojas se secaron a la intemperie, a temperatura ambiente y sin luz directa durante 2 semanas. Posteriormente se molieron en un molino convencional (Mr. Coffee®, modelo IDS77, China).



Figura 4. Localidad de Arroyo del Potrero, Martínez de la Torre, Veracruz.

7.2. Obtención de los extractos

Se seleccionaron 3 disolventes orgánicos para la obtención de los extractos, con base en su diferencia de polaridad, eligiendo uno polar (agua, índice de polaridad: 10.2), uno medianamente polar (cloroformo, índice de polaridad: 4.1) y uno apolar (éter de petróleo, índice de polaridad: 0.1) (Repetto, 2000). El objetivo de elegir estos disolventes fue obtener compuestos de polaridad distinta, a partir de una misma planta.

A partir de lotes de 50 g de hoja seca, se realizaron extracciones sólido/líquido en una proporción 1:5 con agua destilada, cloroformo y éter de petróleo.

Para la preparación del extracto acuoso, se siguió la metodología descrita por Dalla Via *et al.* (2015), con algunas modificaciones. Se preparó una infusión con las hojas deshidratadas, pesando 50 g de polvo de hojas y adicionando 250 mL de agua destilada. Se mantuvo en ebullición durante 2 min. La infusión se filtró, el filtrado se recuperó y se colocó dentro de una liofilizadora (LABCONCO®, no. serie 140694467F, EUA). El extracto liofilizado se guardó en un vial, se mantuvo en refrigeración a 4°C y bajo el resguardo de la luz.

Para la preparación de los extractos orgánicos, se siguió la metodología de López-Rosas (2014), con algunas modificaciones. A 50 g de polvo de hojas, se le adicionaron 250 mL de cada uno de los disolventes por separado. Se realizaron 4 lotes de extracciones.

Se dejaron en maceración durante 1 semana a resguardo de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente se filtraron los sólidos con un papel Whatman no. 5, de 2.5 µm de tamaño de poro.

Para los extractos etéreos, se eliminó el disolvente mediante un rotavapor (IKA®, modelo RV 10 D S1, EUA), a temperaturas de 60°C y 40°C para el cloroformo y el éter de petróleo, respectivamente. Ambos se mantuvieron a una presión menor a 2 mbar. Las fracciones etéreas obtenidas se colocaron en viales y se dejaron en un horno de secado a 40°C durante 24 h, para la evaporación completa de los disolventes. Posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 4°C y bajo el resguardo de la luz.

7.3. Pruebas para la identificación cualitativa de grupos de compuestos

Previo al secado de los extractos, de cada uno se tomó una alícuota de 10 mL para realizar las pruebas cualitativas. Se les realizaron 9 pruebas para la identificación de algunos de los grupos de compuestos encontrados comúnmente en extractos vegetales (Aguilar, 2014; López-Rosas, 2014).

En todas las pruebas se tuvieron series de 3 tubos: el primero como control, que contenía el extracto sin realizar alguna prueba; el segundo como el tubo de prueba; y el tercero como blanco, que contenía sólo el respectivo disolvente. Las pruebas se describen a continuación:

a) Prueba del FeCl_3 (Cloruro férrico)

A 0.5 mL de cada extracto, se les adicionaron 3 gotas de solución de FeCl_3 al 1 %. En caso de presencia de grupos fenoles y enoles, se observaron coloraciones violeta, rojo, azul o verde.

b) Prueba del KMnO_4 (Permanganato de potasio)

A 0.5 mL de cada extracto, se le adicionaron 3 gotas de la solución de KMnO_4 al 2 %. Se observó la presencia de un precipitado color café del dióxido de manganeso, indicativo de insaturaciones en la cadena hidrocarbonada.

c) Prueba de Baljet

A 0.5 mL de cada extracto, se le adicionaron unas gotas de la mezcla de reactivos A y B de Baljet. Se observó la aparición de color naranja o rojo oscuro como positivo para sesquiterpenlactonas.

Reactivo A: 1 g de $\text{C}_6\text{H}_2\text{OH}(\text{NO}_2)_3$ (Ácido pícrico) en 100 mL de etanol al 96 %.

Reactivo B: 10 g de NaOH con 100 mL de agua destilada.

d) Prueba de Salkowski

A 0.5 mL de cada extracto, se le adicionaron 1 mL de H_2SO_4 . Se observó la aparición de una coloración rojiza en caso de esteroides y metilesteroides.

e) Prueba para cumarinas

Se colocaron 0.5 mL de cada extracto en tubos de ensayo, a los cuales se les adicionaron 5 mL de agua destilada. Cada tubo se cubrió con papel filtro humedecido con una solución de NaOH al 10 % y se colocó en un baño María hirviendo durante 10 min. Posteriormente se observó el papel filtro bajo luz UV,

utilizando un UV transilluminator (Ultra Violet Product®, modelo M-26, EUA). La presencia de una fluorescencia azul o amarilla, indicó positivo para cumarinas.

f) Prueba para saponinas

De cada extracto se tomó 1 mL. Se calentaron en baño María hirviendo durante 1 min., se dejaron enfriar y se agitaron por 30 segundos. La presencia de espuma persistente por 2 minutos indicó prueba positiva.

g) Prueba para triterpenos

A 0.5 mL de cada extracto, se le adicionaron 1 mL de una solución de $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{SO}_4 : \text{CHCl}_3$ (10:1:25). Se dejó reaccionar durante 2 min. Después de este tiempo se observó una coloración roja, rosa, púrpura o azul, indicativa de un resultado positivo.

h) Prueba para chalconas y auronas

A 0.5 mL de cada extracto, se le adicionaron 1 mL de HCl concentrado. La presencia de una coloración roja indicó una prueba positiva.

i) Prueba para esteroides

A 0.5 mL de cada extracto, se le adicionaron 0.5 mL de CH_3COOH y 2 gotas de H_2SO_4 . La presencia de una coloración verde, azul o rosa, indicó prueba positiva.

7.4. Purificación y activación de los cultivos bacterianos

7.4.1. Selección de los cultivos bacterianos

Se seleccionaron un total de 7 bacterias para realizar pruebas *in vitro* con los extractos obtenidos; 5 bacterias patógenas responsables de diversas enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos contaminados (Fernández, 2008): *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* (ETEC), *Salmonella enteritidis* serotipo Typhimurium y *Staphylococcus aureus*; y 2 bacterias deterioradoras de alimentos (Frazier y Westhoff, 2000): *Leuconostoc mesenteroides* y *Micrococcus luteus*.

Cada una de las bacterias se resembró de cultivos resguardados bajo refrigeración o congelación, y se inocularon en agar soya tripticaseína (TSA).

7.4.2. Activación de los cultivos bacterianos

De las bacterias cultivadas previamente en agar TSA, se seleccionó una colonia característica y que no presentara contaminación por otros microorganismos. Posteriormente, se sembraron en tubos con 9 mL de caldo soya tripticaseína.

Para las bacterias liofilizadas, se resuspendieron en tubos con 9 mL del mismo medio. En el caso de *L. mesenteroides*, se resuspendió en un tubo con 9 mL de caldo MRS.

Las 5 bacterias patógenas se incubaron a 37°C (Thermo Scientific®, modelo Heratherm IGS180, Alemania) y las 2 bacterias deterioradoras se incubaron a 30°C (Precision®, no. serie 30307629, Alemania), ambos durante 24 h, o hasta observar la formación de turbidez en el tubo (Mossel *et al.*, 2006).

Después, mediante la técnica de aislamiento por estría cruzada (Velasco y Tapia, 2014), la muestra se estirió sobre agar MRS sólido (para *L. mesenteroides*) o sobre agar soya tripticaseína (para el resto de las bacterias). Se dejaron incubar a 30°C o 37°C por 24 h.

Pasado el tiempo, se realizó una tinción de Gram a cada una de las colonias para confirmar su pureza. Se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

7.5. Tinción de Gram

Se realizó una tinción de Gram a cada uno de los cultivos, de acuerdo a Schlegel (1997) y Castellón *et al.*, (2013). La técnica consistió en lo siguiente:

Paso 1. El procedimiento de la coloración se inició con una tinción de las células bacterianas fijadas en un portaobjetos con agua estéril. Se añadió colorante cristal violeta y se dejó actuar por 1 min. El exceso de colorante se retiró con agua. A continuación se trató con una disolución de yodo, para formar un complejo con el cristal violeta, que es insoluble en agua y medianamente soluble en alcohol o

acetona. Se dejó actuar por 1 minuto y se retiró el exceso con agua. Las células se trataron después con una disolución alcohol-cetona 70:30, añadida gota a gota, hasta que ya no se percibiera un desprendimiento de color violeta. Las células Gram positivas retuvieron el complejo colorante-yodo, quedando color violeta, mientras que las células Gram negativas fueron decoloradas por la disolución de alcohol-cetona. Estas últimas se hicieron visibles mediante una coloración de contraste con el colorante safranina, el cual se dejó actuar por 1 minuto. El exceso de colorante se enjuagó con agua hasta no observar un arrastre de color.

Paso 2. Los microorganismos se observaron en un microscopio (Motic®, modelo SFC-28, USA) con un aumento de 100x. El procedimiento se repitió para cada una de las bacterias.

7.6. Prueba cualitativa para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos

Metodología descrita por Harris *et al.*, (1989) y Estrada (2005), con algunas modificaciones.

Cada uno de los extractos preparados al 1 %, se filtraron con un filtro de nylon de 0.45 µm (Thermo Scientific®, modelo Titan3, Alemania), con el objetivo de eliminar la carga microbiana que pudiera estar presente.

7.6.1. Preparación del cultivo madre

De cada una de las bacterias aisladas y purificadas, se tomó una muestra con un asa estéril y se resuspendió en un tubo con 9 mL de caldo soya tripticaseína (para *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* (ETEC), *S. enteritidis* serotipo Typhimurium, *S. aureus* y *M. luteus*) o caldo MRS (para *L. mesenteroides*). Se dejaron incubando a 37°C o 30°C por 24 h.

Considerando que en el tubo madre se tenía una concentración de 10⁹ ufc/mL, se realizaron diluciones decimales en agua peptonada, hasta llegar a una concentración final de 10⁶ ufc/mL.

7.6.2. Preparación del medio de cultivo

Para el medio de soporte, se prepararon 2 medios, uno con caldo soya tripticaseína y otro con caldo MRS (según la bacteria a sembrar). A cada uno se le adicionó 1.5 % p/v de agar. Se depositaron en cajas Petri estériles y se dejaron solidificar.

Para el agar suave, que se deposita sobre el medio de soporte, se prepararon medios de caldo soya tripticaseína y MRS con una concentración de agar del 0.8 % p/v. Los medios se calentaron hasta ebullición para la correcta distribución del agar. Después se dosificaron en tubos con 9 mL cada uno. Una vez esterilizados, se dejaron a temperatura ambiente.

7.6.3. Prueba de inhibición en superficie

Cada microorganismo se evaluó por separado. De los tubos que contenían una concentración de 10^6 ufc/mL de cada bacteria, se agitaron en un vortex, se tomaron 20 μ L y se inocularon en los tubos que contenían el agar suave en estado líquido. El contenido del tubo se mezcló suavemente y se vertió sobre cajas Petri las cuales contenían el medio de soporte del mismo tipo. Los medios se dejaron solidificar dentro de una campana de flujo laminar con corriente de aire (LABCONCO®, modelo 36208, EUA).

Posteriormente se tomaron 20 μ L de cada uno de los extractos filtrados previamente y preparados al 1 % (con agua, cloroformo, o éter de petróleo, en función de cuál había sido el disolvente de extracción), y se depositaron sobre la placa. En la misma placa se colocaron los respectivos controles adicionando 20 μ L de los mismos disolventes.

Se dejaron secar dentro de la campana de flujo laminar y posteriormente se incubaron a 30 o 37°C durante 24 h.

Se analizó la presencia de halos de inhibición alrededor de los inóculos y se midieron con ayuda de un vernier digital (Mitutoyo Corporation®, no. de serie 7020290, Japón). Se midió el radio de los halos, considerando desde la orilla del inóculo hasta la extensión del halo. El análisis se realizó por triplicado.

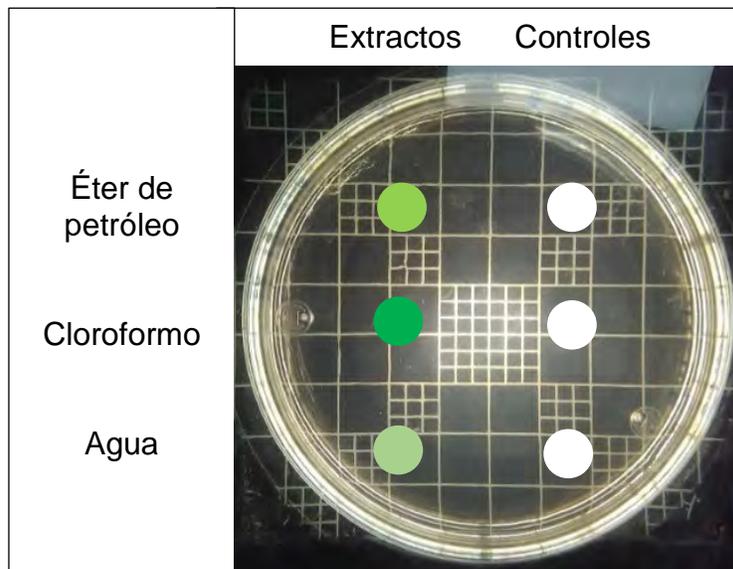


Figura 5. Posición de los extractos y sus respectivos disolventes.

7.7. Prueba cuantitativa para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos

Para esta prueba, se consideraron sólo aquellas bacterias cuyo crecimiento se vio afectado por la presencia de al menos uno de los extractos. En este caso, la bacteria *Micrococcus luteus* presentó halos de inhibición en su crecimiento frente a los extractos con cloroformo y con éter de petróleo.

7.7.1. Siembra del cultivo madre

Para preparar el cultivo madre, se tomó una colonia característica de la caja Petri que contenía la colonia purificada de *M. luteus*, y se inoculó en un tubo con caldo soya tripticaseína estéril. Se incubó a 30°C durante 24 h. Posteriormente se realizaron diluciones en solución salina al 0.85 %, hasta obtener una concentración final de 10^3 ufc/mL. Se tomaron 100 µL de esta última dilución y se sembraron sobre cajas Petri que contenían 9 mL de agar soya tripticaseína estéril, mediante la técnica de extensión en superficie (Aquiahuatl *et al.*, 2012). Consecuente a esto, se dejaron en incubación a 30°C durante 24 h.

Transcurrido el tiempo, se realizó el conteo de las colonias, utilizando un cuenta colonias (QUEBEC®, modelo 3325, EUA). El análisis desde el sembrado se realizó por triplicado.

7.7.2. Siembra del cultivo con extractos

En un inicio se fijaron 3 concentraciones para cada extracto: 0.5 %, 1 % y 2 %. Se partió de los extractos secos previamente filtrados con un filtro de nylon de 0.45 µm. Las pruebas se realizaron en tubos con caldo soya tripticaseína, inoculados con 10³ ufc de *M. luteus* / mL.

Debido a la naturaleza apolar de los extractos etéreos, no pudieron ser disueltos en el caldo, por lo que el material vegetal solo se dispersó en el medio, ingresando los tubos en un ultrasonicador (GNATUS®, no de serie 04140123393, Brasil) a 25°C durante 15 min. Posteriormente, se incubaron a 30°C por 24 h.

Transcurrido el tiempo, se tomaron 100 µL de cada tubo y se sembraron en placas que contenían agar soya tripticaseína solidificado. Las cajas se incubaron nuevamente a 30°C por 24 h. Posteriormente se realizó el conteo. El análisis se hizo por triplicado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se fijaron 3 nuevas concentraciones tomando como referencia las anteriores, considerando concentraciones inferiores para el extracto con cloroformo (0.05 %, 0.1 % y 0.25 %) y concentraciones superiores para el extracto con éter de petróleo (2.5 %, 5 % y 10 %). Se realizó el conteo. El análisis se hizo por triplicado.

8. Resultados y discusión

8.1. Obtención de los extractos

A partir de *V. persicifolia* se obtuvieron 3 diferentes extractos, cuyos rendimientos alcanzados fueron: $13 \% \pm 0.45$ para el extracto con agua, 34.85 ± 0.87 para el extracto con cloroformo y 2.88 ± 0.5 para el extracto con éter de petróleo.

El extracto con cloroformo fue el que mostró un mayor rendimiento, seguido del de agua y por último el de éter de petróleo. En general, el rendimiento de un extracto se puede relacionar con la cantidad de compuestos que son afines al disolvente utilizado para su obtención (Rivas *et al.*, 2017). Por ende, para el caso de *V. persicifolia* se puede deducir que la mayoría de sus fitoquímicos son de polaridad intermedia. Por su polaridad, el cloroformo es capaz de disolver compuestos como: lípidos, aceites esenciales, esteroides, tetraterpenos, alcaloides (bases), clorofila, vitaminas liposolubles, algunos azúcares simples, glucósidos triterpénicos y compuestos fenólicos (taninos, pigmentos flavonoides) (Ringuelet y Viña, 2013).

El extracto con agua mostró un rendimiento del 13 %. López-Canúl (2015) obtuvo resultados similares en una infusión de la misma planta, utilizando la misma proporción de hoja (200 g de hoja seca a la intemperie en 1 L de agua destilada) y dejando en ebullición por unos minutos. En el extracto acuoso, los compuestos que pueden estar disueltos son: glúcidos simples, glucósidos, alcaloides (sales), vitaminas hidrosolubles, saponinas y algunos fenoles. La solubilidad en agua aumenta generalmente al aumentar el número de grupos hidroxilo. Además, en muchos casos los compuestos fenólicos se encuentran combinados con azúcares formando glicósidos, favoreciendo la afinidad con el agua (Ringuelet y Viña, 2013). Si estos compuestos están en baja proporción en la hoja fresca, el rendimiento del extracto acuoso será bajo (López-Canúl, 2015).

Por otro lado, el éter de petróleo es un disolvente apolar, con un índice de polaridad cercano a cero. En este estudio fue el que menor rendimiento registró. Generalmente, los compuestos que pueden estar disueltos en este tipo de extracto etéreo son aquellos que tienen una mayor cantidad de carbonos en su estructura,

por ejemplo: lípidos, aceites esenciales, esteroides (triterpenos), carotenoides (tetraterpenos), vitaminas liposolubles, etc (Ringuelet y Viña, 2013).

Pérez, Isaza, y Acosta (2007) evaluaron los rendimientos de los extractos de hojas de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*, utilizando como solventes metanol, cloroformo y éter de petróleo, obtenidos por un proceso de extracción Soxhlet. Al final, el extracto metanólico tuvo un rendimiento del 4 %, el clorofórmico del 3.6 % y el de éter de petróleo del 1 %. En otro estudio, Cárdenas *et al.*, (2005) evaluaron los rendimientos de las hojas de 6 plantas, dentro de ellas 4 pertenecían a la familia de las Astaráceas: *Heliopsis longipes* Gray, *Chrysactinia mexicana* Gray, *Flourensia cernua* y *Brickellia veronicaefolia* Kunth. Los disolventes utilizados para la maceración fueron: hexano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, etanol y metanol. En todos los casos, los rendimientos más altos los obtuvieron los extractos con cloroformo, etanol y metanol. Con los rendimientos mostrados en los estudios anteriores y los rendimientos obtenidos en este estudio, se demuestra que por lo habitual, las partes aéreas de las plantas de la familia Astarácea contienen en su mayoría compuestos de polaridad intermedia.

Generalmente la extracción con disolventes se utiliza a escala laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por: el valor comercial de los disolventes, la obtención de esencias contaminadas con otras sustancias, la imposibilidad de utilizar esos extractos en un alimento y por la inflamabilidad de los disolventes orgánicos volátiles utilizados (Martínez, 2003), pero su principal ventaja es que resulta ser un método rápido para obtener extractos y con ello evaluar su efectividad *in vitro*. De este modo surgen nuevas líneas de investigación, en las que se considera sintetizar el compuesto activo para mejorar los rendimientos y aumentar su pureza (Ramírez *et al.*, 2012).

Las hojas registraron un contenido de agua del 80 %. López-Canúl (2015) registró un contenido de agua similar para *V. persicifolia*, del 83 %. A la par, se realizó la medición del pH de la infusión de hojas, preparada en una proporción 1:5 con hojas secas. Se registró un valor de 9.33 a 25°C. Cabe mencionar que la infusión de esta planta se usa en la medicina tradicional para aliviar los síntomas de la gastritis

(Biblioteca Digital de Plantas Medicinales, 2009), por lo que probablemente contiene compuestos alcalinos que influyen directamente en el pH gástrico y ayudan a sentir alivio.

8.2. Pruebas para la identificación de grupos de compuestos

Una vez obtenidos los extractos, a cada uno se le realizaron pruebas cualitativas para detectar la presencia de grupos funcionales de acuerdo a su polaridad, y con ello tener un indicio de si alguno de ellos pudiera actuar como antimicrobiano. La tabla 4 muestra el resumen de los resultados de las pruebas.

En el extracto acuoso, a pesar de haber encontrado compuestos como fenoles y triterpenos que potencialmente pueden actuar como inhibidores de bacterias, su efecto inhibitorio no fue presenciado. Las razones posiblemente se deban a que los compuestos identificados podrían: estar interactuando con otros grupos de compuestos, estar presentes en una baja concentración, su efecto podría estar enmascarado por grupos de compuestos que no han sido identificados en este estudio y que además no presentan actividad antimicrobiana, o que no presenten efecto alguno (Aponte *et al.*, 2013). Además, durante el proceso de obtención de extractos acuosos se ha identificado un alto contenido de glucósidos, lo que podría ocasionar que sea utilizado como sustrato o medio nutritivo (Roca, 1980), en lugar de un antimicrobiano natural.

Morata (2010), reportó que los aceites esenciales más efectivos para la inactivación de microorganismos patógenos son aquellos que contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos, terpenos y esteroides. Con ello, se puede suponer que los extractos orgánicos (con cloroformo y con éter de petróleo) concentran gran parte de los compuestos activos que se han reportado en el género *Verbesina* (terpenoides, triterpenoides, sesquiterpenos, eudesmanos, flavonoides, saponinas y aceites esenciales (López-Canúl, 2015)), y que a su vez pueden ser potenciales inhibidores del crecimiento bacteriano. Se necesitaría fraccionar los extractos obtenidos en una columna para evaluar el efecto microbiano por separado de cada fracción, y con ello comprobar la deducción discutida anteriormente.

Tomando en cuenta el fundamento de cada prueba, los compuestos que pudieran estar presentes en los extractos son:

a) Prueba del FeCl_3 (cloruro férrico)

Los tres extractos mostraron un resultado positivo para la prueba de compuestos fenólicos. De acuerdo a lo reportado por García *et al.* (2016), podría tratarse de dos tipos de compuestos: ácidos hidroxámicos para el extracto con agua (Figura 6A) por la coloración rojiza (Castañeda, Manrique, e Ibañez, 2001), y taninos condensados para los extractos con cloroformo (Figura 6B) y éter de petróleo (Figura 6C), por la coloración verde oscuro (Verde, García, y Rivas, 2016). Sin embargo, podrían existir interacciones entre los compuestos que resultarían en coloraciones similares, pero se tendría que analizar cada una de las posibles reacciones para corroborar.

Algunos componentes fenólicos de la fracción del aceite esencial de las especias y hierbas pueden contribuir a la actividad antimicrobiana (Naidu y Davidson, 2000). De acuerdo a los resultados, se concluye que los tres extractos contienen este tipo de compuestos, y además pueden coadyuvar a su actividad antibacteriana.

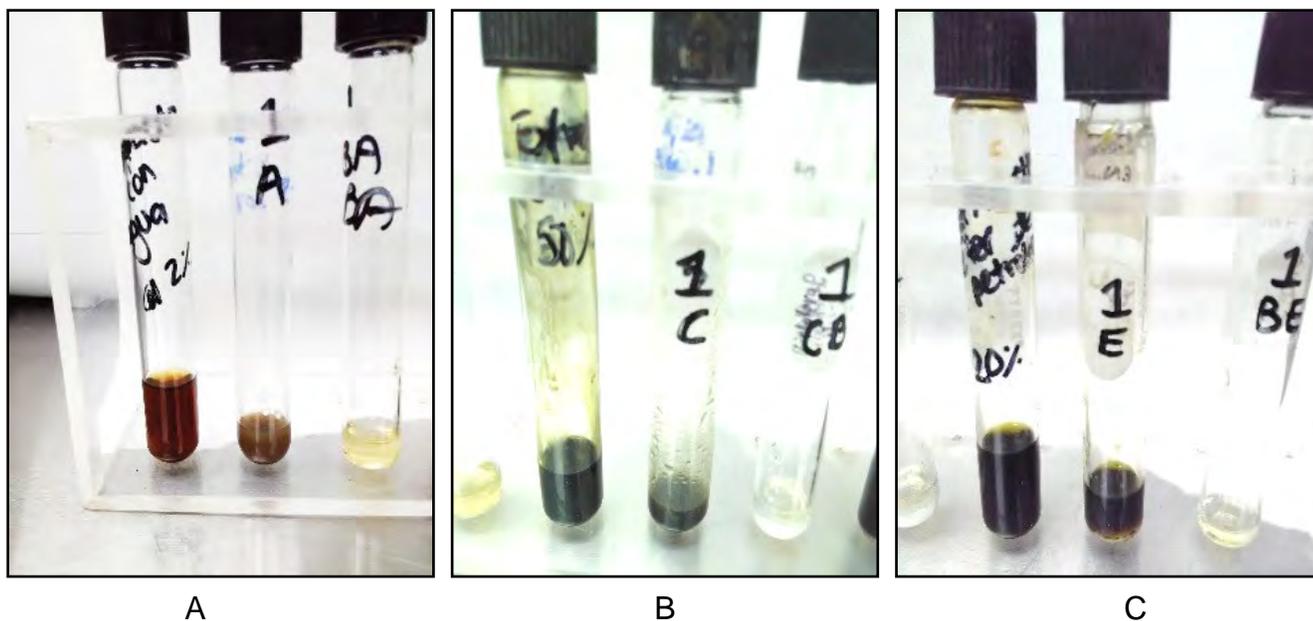
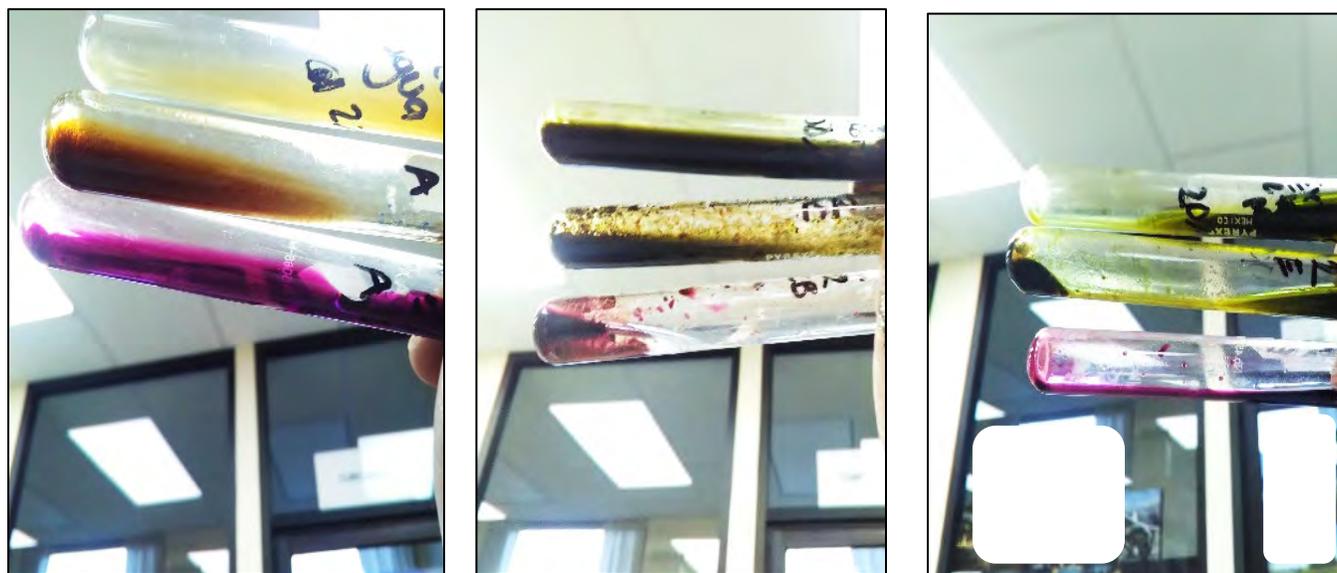


Figura 6. Resultados de la prueba del cloruro férrico (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco).

b) Prueba del KMnO_4 (permanganato de potasio)

Los resultados fueron positivos para los tres extractos, ya que todos presentaron la formación de un precipitado café indicativo del MnO_2 (Figura 7). Esto significa que contienen en su estructura insaturaciones en la cadena carbonada, propias de los alquenos (Muñoz, 2016). En general, la mayoría de los compuestos que se encuentran presentes en la fracción del aceite esencial de la planta tienen insaturaciones en su cadena carbonada (Tiwari *et al.*, 2009).

La prueba del KMnO_4 es una prueba presuntiva para identificar sustancias químicas con insaturaciones que pueden estar presentes en alcaloides (Dragendorff), anillos de lactonas (cumarinas), sesquiterpenlactonas (Bajlet) y esteroides (Salkowski) (Aguilar, 2014).



A

B

C

Figura 7. Resultados de la prueba del permanganato de potasio (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de arriba a abajo en cada imagen: control, prueba y blanco).

c) Prueba de Baljet

Esta prueba es específica para sesquiterpenlactonas. De acuerdo a la figura 8, este tipo de compuestos sólo estuvieron presentes en los extractos con cloroformo (Figura 8B) y éter de petróleo (Figura 8C), por la aparición de una coloración naranja o rojo oscuro, debido a la formación de un complejo entre el ácido pícrico y la lactona α , β , y γ insaturada (Orantes, 2008). En el caso del extracto con cloroformo, la coloración rojiza fue un poco difícil de apreciar porque el color verde del extracto la encubría.

Las sesquiterpenlactonas son metabolitos secundarios predominantes de la familia Asteráceas (*Compositae*). Son una clase de terpenoides de origen natural (sesquiterpenoides = C₁₅) con un anillo lactónico. Con la larga cadena carbonada, es difícil su extracción con disolventes polares como el agua. Las sesquiterpenlactonas poseen una gran variedad de actividades biológicas como: citotóxica, antitumoral, analgésica, antiinflamatoria, antimicrobiana, entre otras (Villacorta, 2013). *V. persicifolia* pertenece a la familia Asterácea y además se ha reportado la presencia de sesquiterpenlactonas dentro de su tamiz fitoquímico (López-Canúl, 2015), por lo que con los resultados de la prueba se confirma la afirmación. Se ha reportado que estos compuestos son, en muchas ocasiones, los responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas (Lizcano y Vergara, 2008).

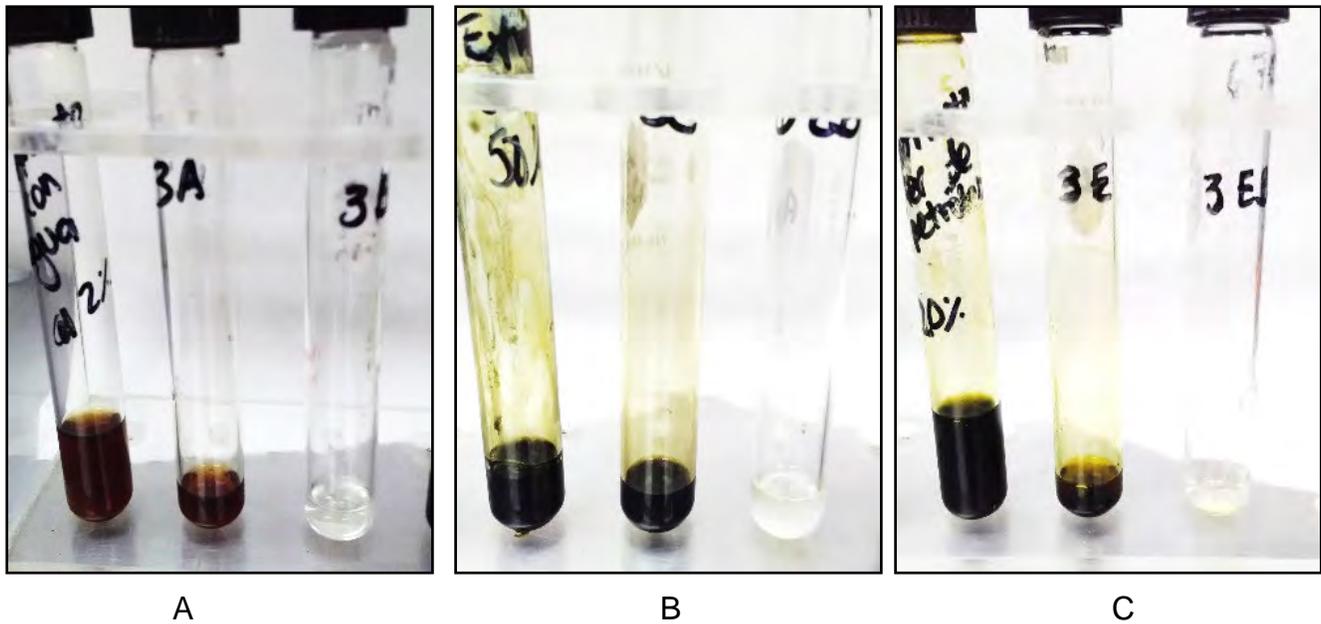


Figura 8. Resultados de la prueba de Baljet (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco).

d) Prueba de Salkowski

Esta prueba se utiliza para confirmar la presencia de esteroides y metilesteroides. Los extractos con cloroformo y éter de petróleo mostraron un resultado positivo por la aparición de una coloración rojiza (Figuras 9B y 9C, respectivamente). En general, todas las plantas contienen estos compuestos debido a que actúan como componentes estructurales en la membrana celular (Verde *et al.*, 2016). La mayoría de esteroides conocidos son solubles en solventes orgánicos relativamente apolares (cloroformo, benceno, etc.). Henao *et al.*, (2009) observaron que los extractos de las hojas con hexano y diclorometano de *Lippia organoides* tuvieron actividad antibacteriana contra bacterias como *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromona hidrófila*, *E. coli*, entre otras. En ambos extractos encontraron que los esteroides, glicósidos cardiotónicos y carotenoides fueron los responsables de la inhibición del crecimiento. Vélez, D'Armas, Jaramillo, y Vélez (2018) reportaron una actividad de los esteroides similar, al encontrar que los extractos metanólicos de las

hojas de *Cymbopogon citratus* ejercieron actividad antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* por la presencia de esteroides insaturados, triterpenos pentacíclicos, fenilpropanoides y catequinas. En ambos estudios, los esteroides se encuentran dentro del grupo de los fitoquímicos responsables de la actividad antibacteriana.

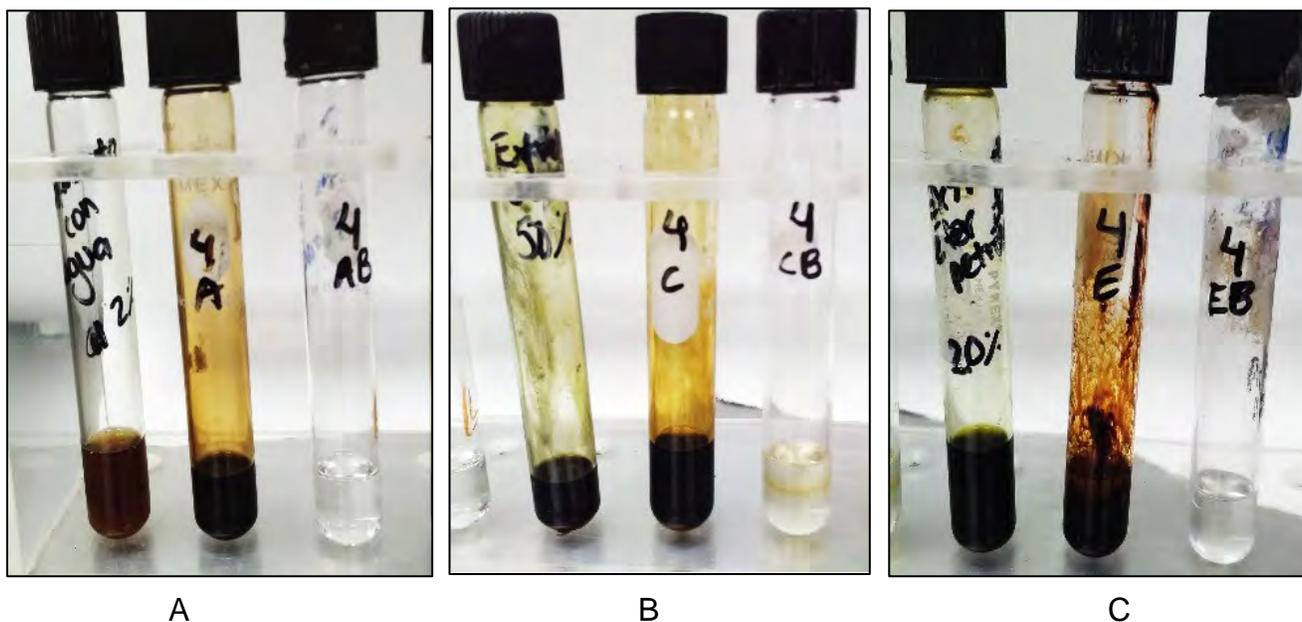


Figura 9. Resultados de la prueba de Salkowski (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco).

e) Prueba para cumarinas

Las cumarinas son compuestos derivados de α -benzopirona y poseen en su estructura una γ -lactona, por lo que se pueden disolver en soluciones alcalinas acuosas o alcohólicas (Carvajal *et al.*, 2009; Verde *et al.*, 2016). La presencia de cumarinas se manifiesta mediante la fluorescencia de color azul o verde que se observa al someter las muestras a irradiación con luz UV. Esto se debe a que en su estructura presentan un gran número de insaturaciones.

En esta prueba, los extractos que dieron un resultado positivo para cumarinas fueron con cloroformo y con éter de petróleo (Figura 10). Martínez *et al.*, (2012) evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos n-hexánico, clorofórmico y acetato de etilo de hojas de *Anacardium occidentale* (marañón), los cuales mostraron actividad contra *S. aureus*. En los extractos se detectó gran variedad de metabolitos secundarios, en especial, cumarinas; los demás metabolitos se identificaron en menores proporciones, como saponinas, flavonoides, azúcares reductores, aminoácidos libres, triterpenos/esteroides, fenoles/taninos. Esto demuestra que las cumarinas pueden ejercer efecto antimicrobiano, ya sea que actúen de manera individual o sinérgicamente con otros compuestos.

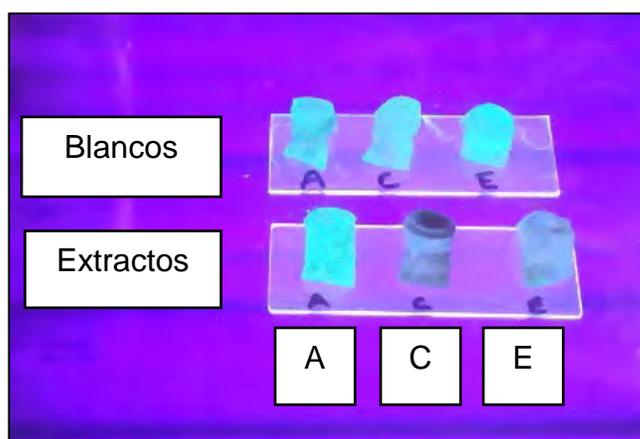


Figura 10. Resultados de la prueba para cumarinas (A: Agua, C: Cloroformo, E: Éter de petróleo).

f) Prueba para saponinas

El extracto acuoso fue el único que dio resultado positivo para esta prueba (Figura 11). Esto se debe a que las saponinas tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial del agua, por lo que sus soluciones acuosas producen espuma, de manera similar al jabón (Castañeda *et al.*, 2001). Si la altura de la espuma después de agitar la muestra durante 15 min era <5 mm = negativo; alrededor de 5-10 mm = contenido moderado; una altura >15 mm = alto contenido de saponinas (García *et al.*, 2016). En el ensayo, el tubo con el extracto acuoso registró una

espuma con una altura de 7 mm, por lo que su contenido en saponinas es moderado.

Dependiendo de la estructura, las saponinas pueden mostrar actividad hemolítica, antimicrobiana, actividades despolarizantes de la membrana, vinculantes de colesterol y alelopáticas. Se clasifican en dos grupos: triterpénicas y esteroidales. La localización de las saponinas con mayor actividad antimicrobiana es en las partes aéreas de las plantas, ya que se encuentran expuestas a patógenos y animales herbívoros, por lo que tienen un sabor amargo (Oleszek, 2000). Lizcano y Vergara (2008), reportaron que el principio general de la acción de las saponinas sobre los microorganismos es su interacción con los esteroides de la membrana citoplasmática. Por lo tanto, las bacterias no deberían ser sensibles a las saponinas, ya que sus membranas son bajas en colesterol. Aunque estudios recientes han demostrado que la composición de ácidos grasos de las membranas de algunas bacterias puede ser un factor importante para que las saponinas puedan ejercer efecto inhibitorio, filtrando proteínas y ciertas enzimas de sus células, principalmente en bacterias Gram positivas como *Bacillus spp.* (Oleszek, 2000).

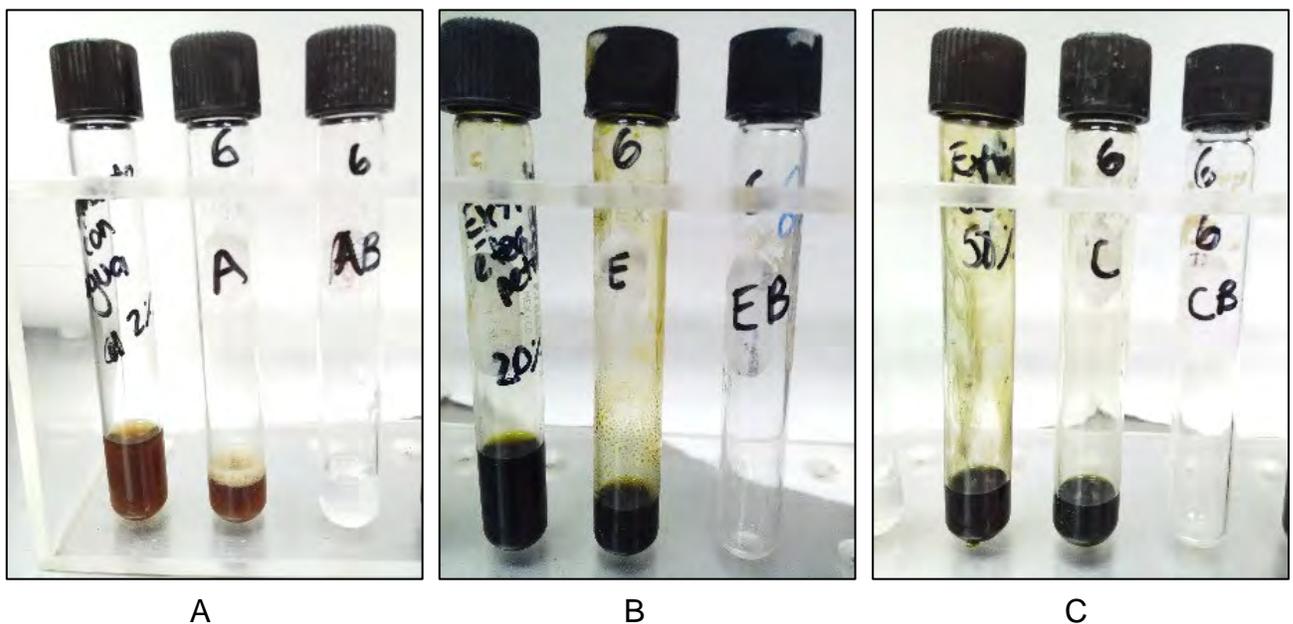


Figura 11. Resultados de la prueba para saponinas (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco).

g) Prueba para triterpenos

De acuerdo a la figura 12, los tres extractos mostraron un resultado positivo. Esta prueba utiliza los mismos reactivos que la prueba del inciso i) para esteroides, a excepción del CHCl_3 , pero comparten el mismo fundamento. Una coloración azul o verde indica la presencia de esteroides, una coloración roja, rosa o violeta indica la presencia de triterpenos y una coloración amarillo pálido indica la presencia de esteroides o triterpenos saturados (García *et al.*, 2016). De acuerdo a esta afirmación, se puede concluir que probablemente el extracto con agua (Figura 12A) tiene esteroides o triterpenos saturados (por ejemplo, las saponinas); y los extractos con cloroformo (Figura 12B) y éter de petróleo (Figura 12C) contienen esteroides.

Los triterpenos son estructuras de 30 carbonos basados en 6 unidades de isopreno. Frecuentemente son sólidos incoloros con altos puntos de fusión, ampliamente distribuidos entre las resinas, corcho y cutina de las plantas. Hay varios grupos importantes de triterpenos, incluyendo triterpenos libres, esteroides, saponinas, esterolinas y glucósidos (Aponte *et al.*, 2013).

Lizcano y Vergara (2008) reportan que los triterpenos de naturaleza hidrocarbúrica generalmente tienen acción depresora sobre la tensión superficial, lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. Los triterpenos de naturaleza alcohólica pueden alterar la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte.

Lo anterior sustenta que los 3 extractos podrían ejercer actividad antimicrobiana.

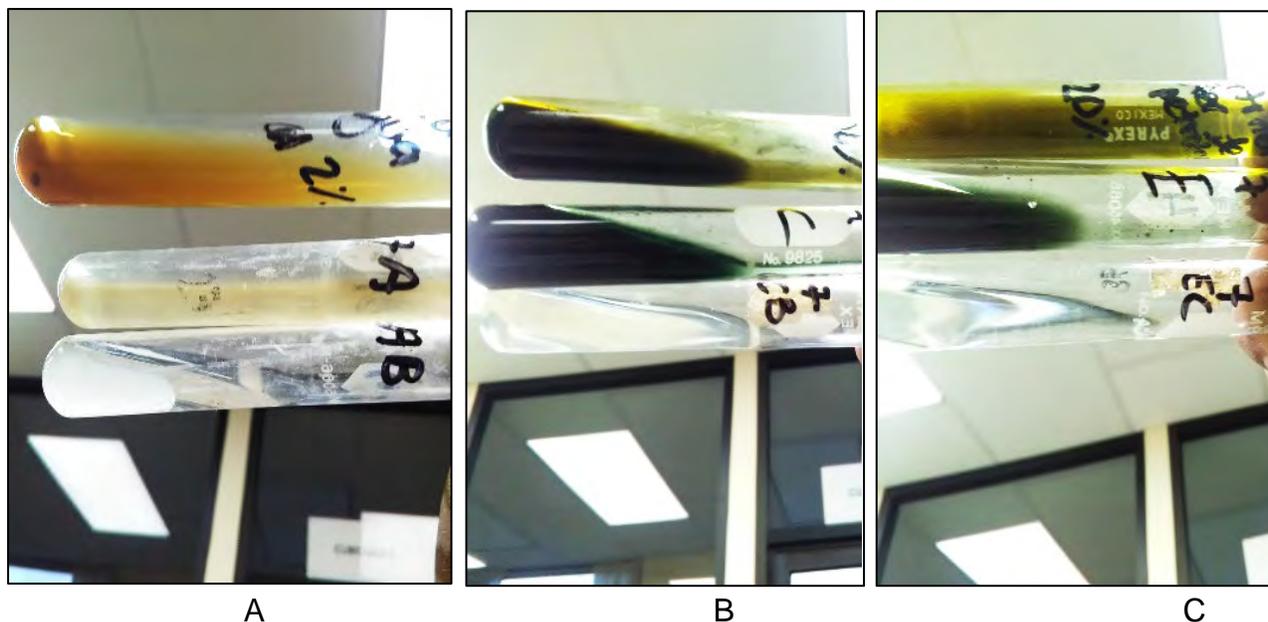


Figura 12. Resultados de la prueba para triterpenos (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de arriba a abajo en cada imagen: control, prueba y blanco).

h) Prueba para chalconas y auronas

Las chalconas y auronas son flavonoides. Generalmente son solubles en agua y se encuentran en las plantas como sus glucósidos (Aponte *et al.*, 2013). Para esta prueba, sólo el extracto con agua (Figura 13A) fue el que mostró la presencia de chalconas y auronas por la aparición de un color rojizo. El resto de los extractos conservó la coloración verde propia de cada uno.

Diversos estudios han reportado que las chalconas sintetizadas a partir de precursores naturales como los flavonoides tienen actividad antimicrobiana, pero ninguno ha reportado si las extraídas de alguna fuente natural poseen también actividad antimicrobiana (Ramírez *et al.*, 2012).

Mora (2011) demostró que las chalconas tienen actividad inhibitoria sobre las enzimas β -lactamasas presentes en microorganismos patógenos como *E. coli*.

Estas enzimas son las responsables de la resistencia de las bacterias frente a fármacos.

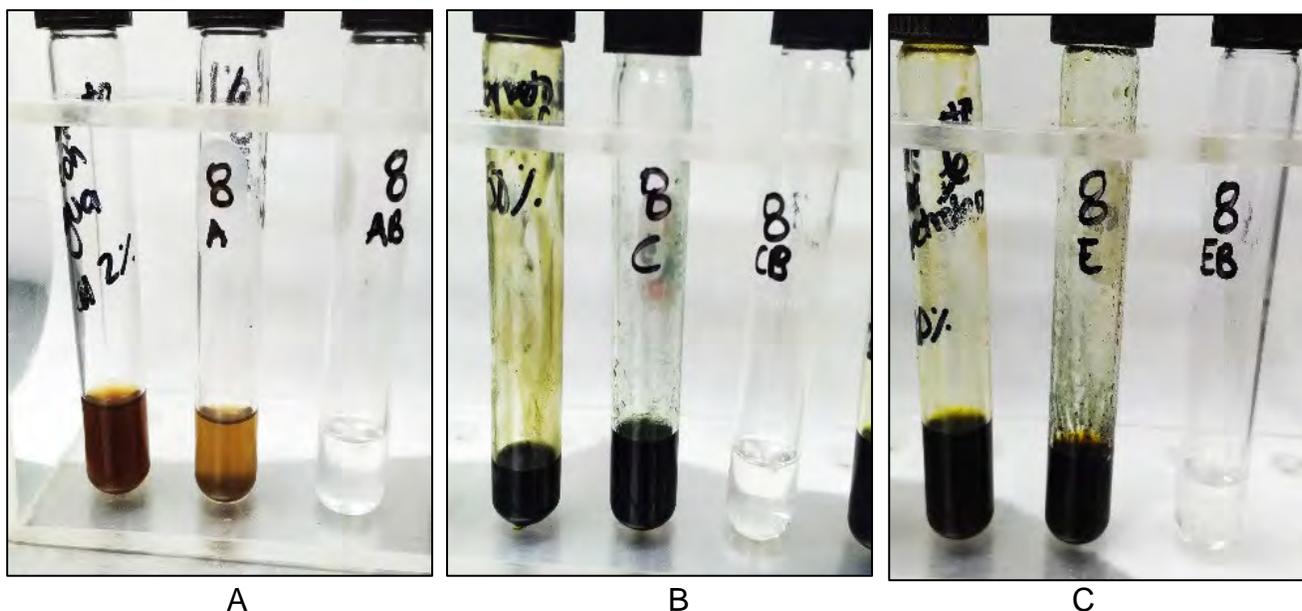


Figura 13. Resultados de la prueba para chalconas y auronas (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco).

i) Prueba para esteroides

Generalmente los esteroides pueden estar de manera habitual en las plantas o pueden producirse como respuesta ante el estrés (Coy, Parra, y Cuca, 2014). Su naturaleza apolar hace que sólo puedan extraerse con solventes apolares o medianamente polares. Para esta prueba, la aparición de una coloración azul o verde era indicativo de un resultado positivo para esteroides. De acuerdo a la figura 14, los extractos con cloroformo (Figura 14B) y éter de petróleo (Figura 14C) mostraron estas características.

Lizcano y Vergara (2008) reportaron que los compuestos esteroidales pueden interferir determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana. La

acción de estos junto con los triterpenos es notoria frente a la inhibición del crecimiento microbiano, debido a que su efecto es sinérgico.

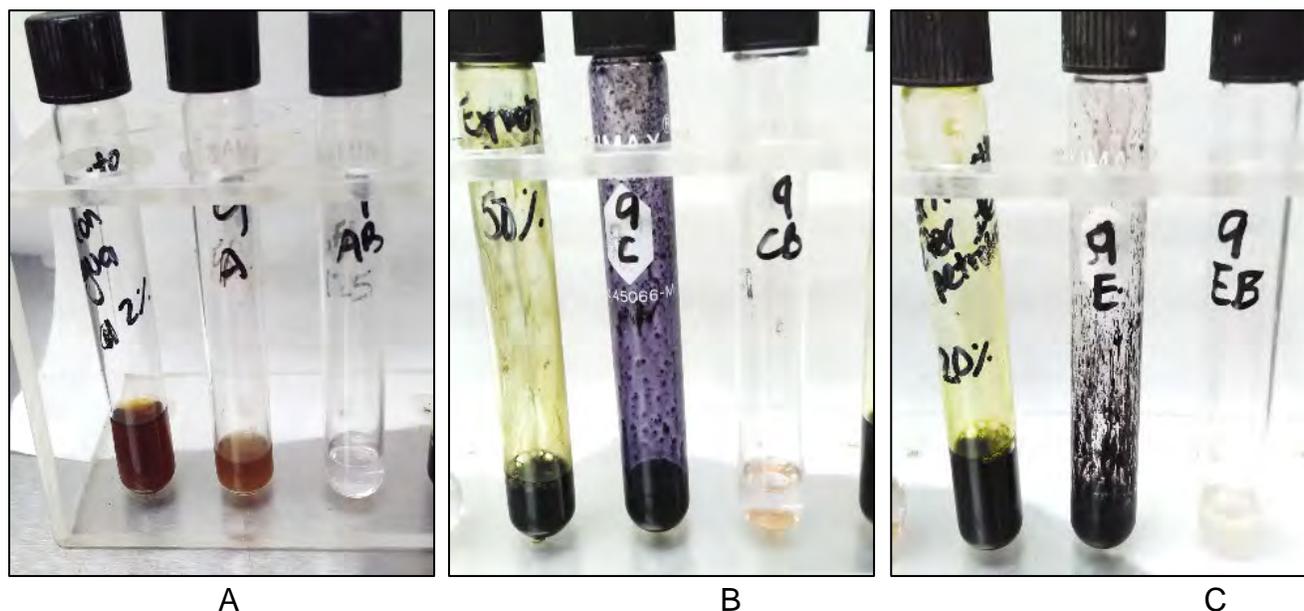


Figura 14. Resultados de la prueba para esteroides (A: extracto acuoso, B: extracto clorofórmico, C: extracto etéreo; el orden de los tubos de izquierda a derecha en cada imagen: control, prueba y blanco).

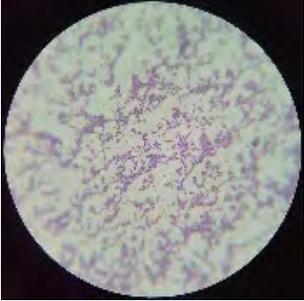
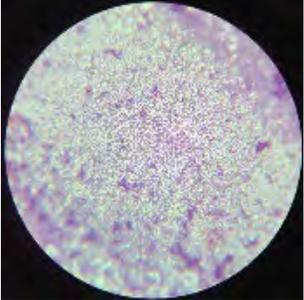
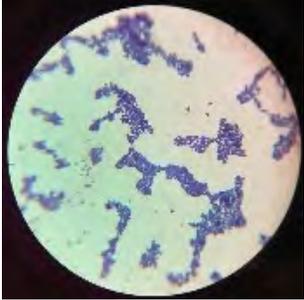
Tabla 4. Resultados de las pruebas para la identificación de grupos de compuestos en los extractos acuoso, clorofórmico y etéreo de *V. persicifolia*.

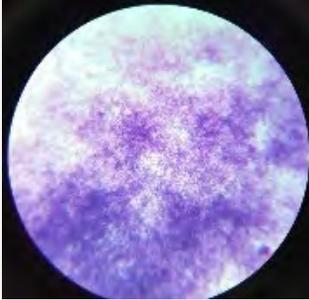
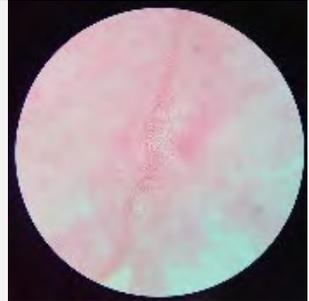
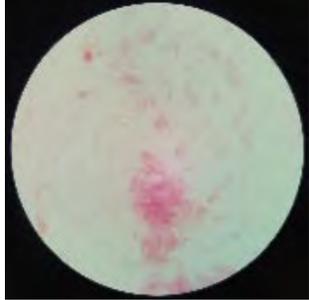
| | Extracto | Agua | Cloroformo | Éter de petróleo |
|-------------------------------|----------|------|------------|------------------|
| Prueba | | | | |
| a) Compuestos fenólicos | | + | + | + |
| b) Insaturaciones | | + | + | + |
| c) Sesquiterpenlactonas | | - | + | + |
| d) Esteroles y metilesteroles | | - | + | + |
| e) Cumarinas | | - | + | + |
| f) Saponinas | | + | - | - |
| g) Triterpenos | | + | - | - |
| h) Chalconas y auronas | | + | - | - |
| i) Esteroides | | - | + | + |

8.3. Purificación y activación de los cultivos bacterianos

Cada una de las bacterias seleccionadas se inoculó en agar soya tripticaseína (TSA) para activarlas y partir de un cultivo fresco, a fin de observar el efecto de los extractos sobre su crecimiento.

Para corroborar su pureza, se realizaron tinciones de Gram a todas las cepas, tomando una colonia aislada de cada una y realizando un frotis en portaobjetos por separado. Los resultados de las tinciones se muestran en la tabla 5.

| Microorganismo | Imagen |
|--|--|
| <i>L. monocytogenes</i> Gram + Bacilos |  |
| <i>S. aureus</i> Gram + Cocos |  |
| <i>L. mesenteroides</i> Gram + Cocos ovoides |  |

| | | | |
|--|--|--|--|
| <p><i>M. luteus</i> Gram + Cocos</p> | |  | |
| <p><i>S. enteritidis</i> serotipo Typhimurium Gram – Bacilos</p> | |  | |
| <p><i>E. coli</i> O157:H7 Gram – Bacilos</p> | |  | |
| <p><i>El coli</i> (ETEC) Gram – Bacilos</p> | |  | |

Ninguna de las bacterias mostró contaminación con otro tipo de microorganismos, por lo que se consideraron aptas para determinar la actividad de los extractos sobre su crecimiento.

8.4. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos

Se realizó una prueba de esterilidad de los extractos antes de ser filtrados, para analizar si existía carga microbiana en cada uno de ellos. Se incubaron a 30°C y posteriormente a 37°C durante 24 h. El tubo con el extracto acuoso mostró turbidez después de ser incubado a 37°C. Por lo general, los patógenos bacterianos se multiplican mejor a temperaturas similares a las de los tejidos y los órganos internos del huésped humano (37°C). En consecuencia, el cultivo de la mayor parte de las bacterias relevantes en los alimentos se realiza a temperaturas de 35 a 37°C. Para otras bacterias puede ser preferible una temperatura de incubación de 30°C (la temperatura aproximada de la superficie corporal) (Forbes, Sahm, y Weissfeld, 2007).

Mediante los filtros de nylon (Thermo Scientific®, modelo Titan3, Alemania) de 0.45 µm se eliminó la carga microbiana presente. No se identificaron los microorganismos que pudieron estar presentes. Este método se seleccionó debido a que los extractos contienen compuestos volátiles o termosensibles que pueden sufrir cambios en su estructura o incluso perderse por la acción del calor. La filtración resultó ser una opción simple y eficaz para eliminar a los microorganismos presentes en los extractos, sin alterar la composición de los mismos. Cabe mencionar que mediante este paso, el filtro puede retener compuestos que podrían tener actividad antimicrobiana.

Cada uno de los extractos obtenidos (acuoso, clorofórmico y etéreo) se evaluó frente a cada una de las cepas de prueba (*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* (ETEC), *S. enteritidis* serotipo Typhimurium, *S. aureus*, *L. mesenteroides* y *M. luteus*). Los resultados se muestran en la tabla 6.

| Tabla 6. Efecto de los extractos sobre el crecimiento de las diferentes cepas bacterianas frente a cada extracto. | | | |
|---|----------|--------------|--------|
| Bacterias evaluadas | Extracto | | |
| | Acuoso | Clorofórmico | Etéreo |
| <i>L. monocytogenes</i> | ND | ND | ND |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | ND | ND | ND |
| <i>E. coli</i> (ETEC) | ND | ND | ND |
| <i>S. enteritidis</i> serotipo Typhimurium | ND | ND | ND |
| <i>S. aureus</i> | ND | ND | ND |
| <i>L. mesenteroides</i> | ND | ND | ND |
| <i>M. luteus</i> | ND | I | I |

ND= No Detectado; I= Inhibición

De las bacterias evaluadas, solo *M. luteus* presentó halos de inhibición (Figura 15). Para este microorganismo no existe reporte de ser resistente a algún conjunto de antibióticos y por lo tanto es recomendado como un microorganismo de prueba, dada su susceptibilidad (Assegid y Lamprecht, 1997).

Los extractos no mostraron efecto sobre las bacterias Gram negativas ensayadas, y esto pudo deberse a que su pared celular está compuesta por una delgada capa de péptidoglucano (disacáridos y aminoácidos) y una membrana externa de lipopolisacáridos (lípidos y polisacáridos) (Tortora, Funke, y Case, 2007). La composición de esta membrana exterior hace más complicado el paso de los antimicrobianos, porque es capaz de excluir moléculas hidrofóbicas y macromoléculas de gran tamaño (Alakomi *et al.*, 2002).

Dentro de las bacterias Gram positivas, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *L. mesenteroides* no pudieron ser inhibidas. Generalmente, estas bacterias han registrado ser resistentes a diversos antimicrobianos, inclusive algunos antibióticos, porque poseen genes localizados en plásmidos o en cromosomas que interfieren

en la acción de los mecanismos de ataque a la célula (Torres *et al.*, 2005). El mecanismo principal de resistencia está relacionado con la aparición de mutaciones que producen una disminución de la reducción intracelular del antibiótico y por lo tanto de producir sus derivados activos (Freeman, Klutman, y Lamp, 1997).

En un estudio sobre la evaluación antimicrobiana de *Verbesina encelioides*, Toribio *et al.*, (2004) reportaron que el extracto metanólico de las hojas de esta especie perteneciente a la familia de las Astaráceas, al igual que *V. persicifolia*, presentó actividad antimicrobiana más notoria sobre microorganismos Gram positivos, entre ellos *S. aureus*, que contra bacterias Gram negativas. La concentración mínima de inhibición y bactericida fue de 408 mg/mL. En otro estudio, Mantilla y Sanabria (1985) reportaron que el extracto etanólico de las hojas de *Verbesina crassiramea* no mostró efecto antimicrobiano contra bacterias Gram positivas ni Gram negativas. Esto da hincapié a que posiblemente los extractos polares de las plantas de la familia Astaráceas no tengan efecto antimicrobiano contra las bacterias Gram positivas ni Gram negativas, como lo que igualmente ocurrió con el extracto acuoso de *V. persicifolia*. Esto puede deberse a que los compuestos extraídos con los disolventes polares posean una actividad antimicrobiana baja, se encuentren interaccionando con otros compuestos, se encuentren en baja concentración o no muestren efecto alguno (Aponte *et al.*, 2013). Sin embargo, los extractos medianamente polares y no polares pueden mostrar un efecto bactericida contra bacterias en las cuales no se ha reportado algún ensayo *in vitro*, principalmente bacterias Gram positivas más susceptibles, como *M. luteus*.

En la figura 15, se muestra una comparación de *M. luteus*, bacteria Gram positiva que mostró halos de inhibición, contra una bacteria Gram negativa, en la cual no se observaron halos de inhibición.

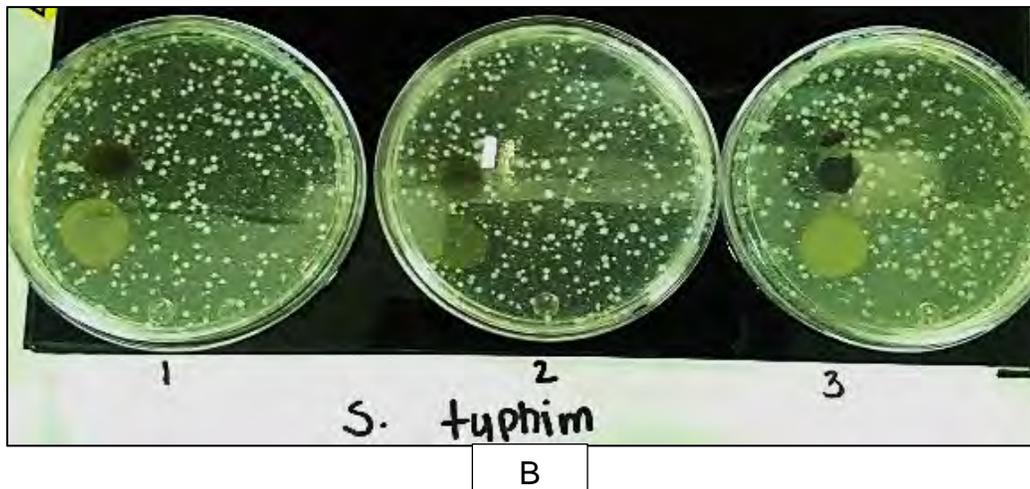
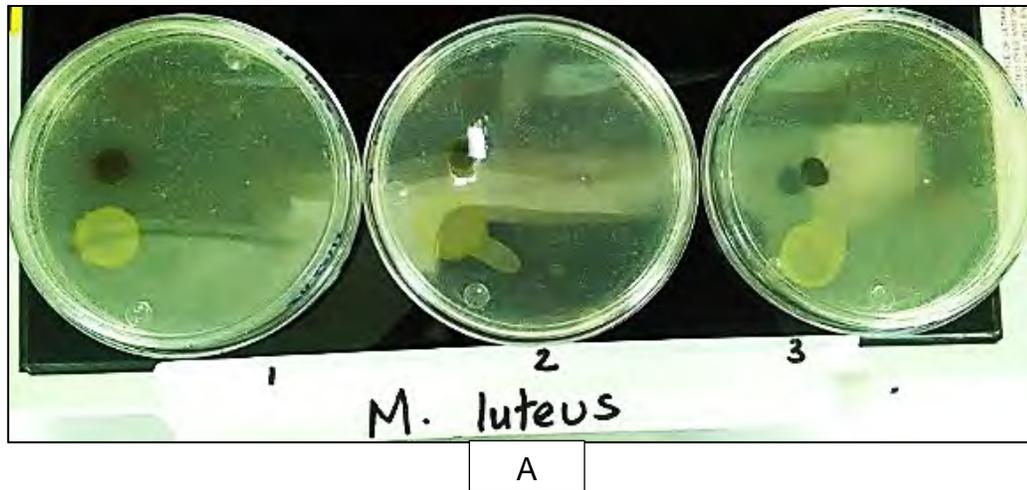


Figura 15. Pruebas de inhibición de los extractos de *V. persicifolia* frente a dos cepas de prueba: *M. luteus* (A) y *S. enteritidis* serotipo Typhimurium (B).

Como *M. luteus* resultó ser el único microorganismo sensible a los extractos, se determinó la magnitud del efecto que ejercieron estos sobre la cepa. Mediante el uso de un vernier digital, se registraron las longitudes de los halos de inhibición. Con estos datos se fijaron diferentes concentraciones (para los extractos clorofórmicos: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 %; para los extractos con éter de petróleo: 0.5, 1, 2, 2.5, 5 y 10 %) para observar el grado de susceptibilidad del microorganismo ante los extractos de *V. persicifolia*. Los resultados se muestran en la tabla 7.

| No. de placa | Extracto/Disolvente | | | | | |
|--------------|---------------------|---------|------------|---------|------------------|---------|
| | Agua | | Cloroformo | | Éter de petróleo | |
| | Inóculo | Control | Inóculo | Control | Inóculo | Control |
| 1 | ND | ND | 1.30 | ND | 1.04 | ND |
| 2 | ND | ND | 2.01 | ND | 1.67 | ND |
| 3 | ND | ND | 2.69 | ND | 1.55 | ND |
| Promedio | - | - | 2.00 ± 0.7 | - | 1.42 ± 0.33 | - |

ND= No Detectado

El extracto con cloroformo fue el que registró el mayor índice de inhibición, seguido del de éter de petróleo. El extracto con agua no mostró inhibición (Figura 16). Podría deberse a que el cloroformo, al ser un disolvente de polaridad intermedia (ip: 4.1) puede disolver algunos compuestos que están presentes en los aceites esenciales de las hojas, como las sesquiterpenlactonas, triterpenos saturados y los fenoles, cuyo efecto antimicrobiano se ha reportado. Aunado a esto, el extracto con cloroformo fue el que registró el mayor porcentaje de rendimiento (34.9 %), lo que sugiere que estos compuestos podrían estar en una mayor proporción en el extracto y ser los responsables de la actividad inhibitoria contra *M. luteus*. La polaridad del éter de petróleo sugiere que estos compuestos también están disueltos en este disolvente, pero por el bajo rendimiento que registró el extracto (2.88 %), estos probablemente se encuentran en menor proporción, posean una actividad antimicrobiana baja o se encuentren interaccionando con otros compuestos, y por ende no tuvo el mismo efecto inhibitorio que el extracto con cloroformo. Probablemente, para observar si se logra el mismo efecto inhibitorio como con el extracto con cloroformo, se podría probar una concentración más alta del extracto con éter de petróleo.

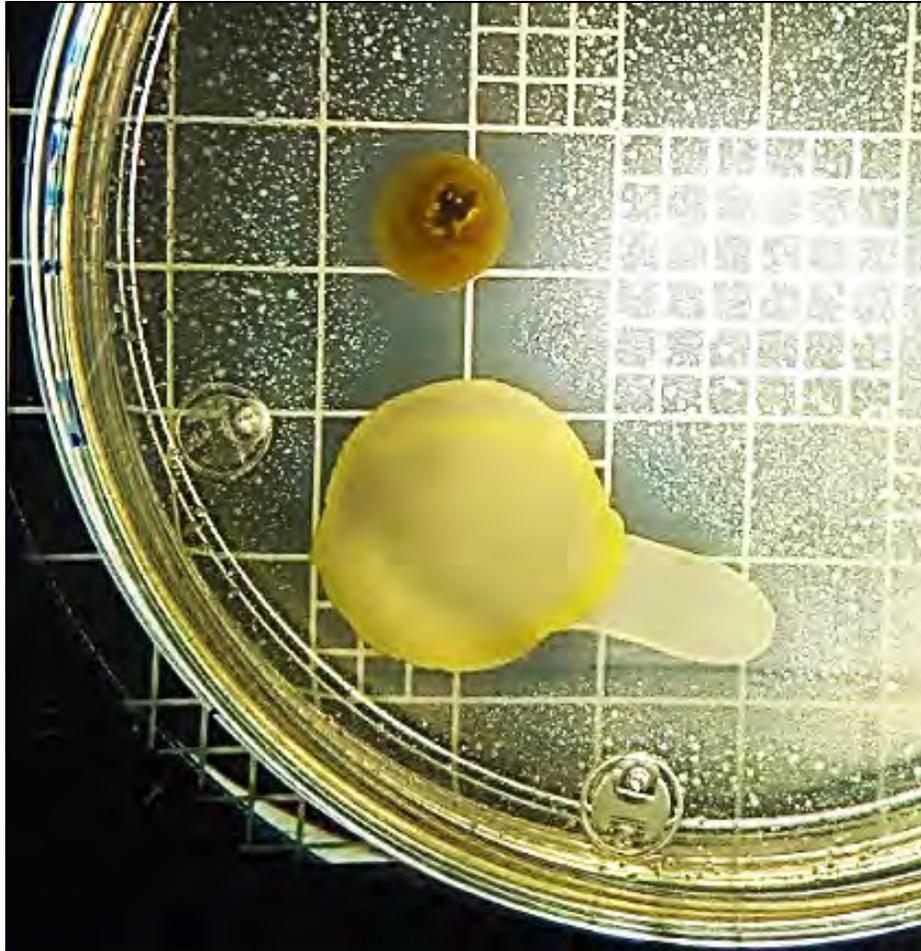


Figura 16. Inhibición en el crecimiento de *M. luteus* por los extractos de cloroformo (superior) y éter de petróleo (inferior).

Para determinar las concentraciones en la que los extractos con cloroformo y con éter de petróleo pueden inhibir el crecimiento de *M. luteus*, se realizó un análisis cuantitativo.

8.5. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos frente al crecimiento de *M. luteus*

A partir de los extractos secos obtenidos con cloroformo y éter de petróleo, se prepararon varias concentraciones (0.05 - 2 % para el extracto clorofórmico y 0.5 – 10 % para el extracto etéreo) en caldo soya tripticaseína.

Debido a los diferentes índices de polaridad que poseen estos disolventes, no pueden ser disueltos en agua, por lo que se dispersaron en el caldo por medio de un ultrasonificador a 25°C durante 15 min (GNATUS®, no de serie 04140123393, Brasil) (Figura 17). Se utilizó esta técnica de dispersión porque permite romper las fuerzas de cohesión de las moléculas del sólido y que se logren dispersar en el líquido, sin degradar a la muestra (Sahinoglu y Uslu, 2013).



Figura 17. Dispersión del extracto seco etéreo en caldo soya tripticaseína mediante ultrasonificado.

Se probaron 6 concentraciones de cada extracto (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 % para los extractos clorofórmicos; y 0.5, 1, 2, 2.5, 5 y 10 % para los extractos etéreos). Al mismo tiempo, se incubó un tubo sin el extracto (0 %), para tenerlo de referencia como control.

Una vez dispersados los extractos en el caldo, se inocularon con *M. luteus* (10^3 ufc/mL). Se trazaron las gráficas de inhibición (Anexos 1 y 2) para identificar el efecto inhibitorio ejercido por ambos extractos.

En la tabla 8 se observa que el extracto con cloroformo de *V. persicifolia* inhibió el crecimiento de *M. luteus* directamente proporcional a la concentración. A las concentraciones de 0.05 % y a 0.10 % se lograron disminuir 0.5 unidades logarítmicas, a 0.25 % se disminuyeron 2, y a 0.5 %, 1 % y 2 % se disminuyeron 3 unidades logarítmicas. Un estudio sobre la determinación de la eficacia de desinfectantes realizado por Díaz *et al.* (2017), menciona que un desinfectante es eficaz si el mismo logra reducir la carga microbiana al menos en 2 órdenes logarítmicos para los que tienen acción contra las esporas bacterianas y hongos, y al menos 3 órdenes logarítmicos para los que tienen acción contra bacterias vegetativas. Esto significa que a una concentración ≥ 0.5 % del extracto con cloroformo es posible lograr la eficacia requerida.

El efecto bactericida mostrado por el extracto clorofórmico de *V. persicifolia* puede deberse a la acción de los compuestos extraídos con este disolvente, como las sesquiterpenlactonas, los terpenos saturados, los fenoles, las cumarinas, los esteroides y algunos otros grupos de compuestos no identificados en este estudio. Por la polaridad que tienen estos compuestos y la composición de la membrana lipídica de *M. luteus*, podrían estar actuando como depresores sobre la tensión superficial de la célula bacteriana, alterando la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias (Lizcano y Vergara, 2008).

A partir de la concentración de 0.5 % y hasta 2 % se logró la completa inhibición del crecimiento del microorganismo, por lo que se determina que el límite de detección de la técnica es <1 Log ufc/mL.

| Tabla 8. Inhibición del extracto clorofórmico de <i>V. persicifolia</i> sobre el crecimiento de <i>M. luteus</i> en CST a 30°C durante 24 h. | | | |
|--|--------------|------------------------------|-------|
| Concentración de extracto (% p/v) | Log (ufc/mL) | Log (ufc/mL) (Promedio ± DE) | C. V. |
| 0 % (Control) | 3.82 | 3.86 ± 0.05 | 1.34 |
| | 3.92 | | |
| | 3.85 | | |
| 0.05% | 3.36 | 3.37 ± 0.03 | 0.80 |
| | 3.40 | | |
| | 3.35 | | |
| 0.1% | 3.40 | 3.38 ± 0.03 | 0.76 |
| | 3.35 | | |
| | 3.38 | | |
| 0.25% | 1.78 | 1.86 ± 0.07 | 3.88 |
| | 1.90 | | |
| | 1.90 | | |
| 0.5% | <1 | <1 | - |
| | <1 | | |
| | <1 | | |
| 1% | <1 | <1 | - |
| | <1 | | |
| | <1 | | |
| 2% | <1 | <1 | - |
| | <1 | | |
| | <1 | | |

Nota: DE = Desviación estándar; C. V. = Coeficiente de variación.

En el caso del extracto con éter de petróleo (Tabla 9), respecto al control se observa que en las primeras tres concentraciones del extracto (0.5 %, 1 % y 2 %) hubo una disminución de 0.1 unidades logarítmicas, a 2.5 % de 0.45, a 5 % de 0.9 y a 10 %

una reducción de 1.1 unidades. La concentración más alta examinada no cumplió con la disminución mínima de reducción de 3 unidades logarítmicas para que un antimicrobiano sea eficaz. Aunado a esto, las últimas dos concentraciones son elevadas en cuanto a insumos necesarios, por lo que en primera instancia su uso se encontraría limitado por el alto coste que resultaría su extracción.

Comparando los datos de los rendimientos obtenidos en cada extracto, en el extracto con éter de petróleo se obtuvo un rendimiento menor que con el cloroformo (2.9 % vs. 34.9 %, respectivamente), y aunque el extracto etéreo también contiene grupos de compuestos con potencial antimicrobiano como sesquiterpenlactonas, terpenos saturados, fenoles, cumarinas, esteroides, y algunos otros no detectados en este estudio, probablemente se encuentren en baja concentración o estén interaccionando con otros compuestos, y esto puede limitar su acción antimicrobiana.

Esto demostró que los compuestos bioactivos con actividad antibacteriana de *V. persicifolia* son de polaridad intermedia, y se pueden extraer en su mayoría con cloroformo.

Se obtuvo un resultado similar en un estudio realizado por Corrales, Castillo, y Melo (2013) sobre la evaluación de la actividad antibacteriana de extractos con etanol y con éter de petróleo de hojas de *Croton lechleri*. Se observó que el extracto etanólico tuvo una mayor actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus*, que el extracto etéreo. La razón fue que el primer extracto presentó un mayor número de compuestos con actividad antimicrobiana, tales como: taninos, polifenoles, poliacetilenos, flavonoles, terpenoides, esteroides, alcaloides y propóleos. Para el segundo extracto, la composición de metabolitos secundarios se vio reducido a la mitad conteniendo: alcaloides, aceites esenciales, terpenoides y cumarinas.

Para saber exactamente que compuestos son los que ejercen inhibición dentro de los extractos, se tendría que analizar química y microbiológicamente cada una de las fracciones obtenidas por una columna cromatográfica de cada extracto.

Tabla 9. Inhibición del extracto etéreo de *V. persicifolia* sobre el crecimiento de *M. luteus* en CST a 30°C durante 24 h.

| Concentración de extracto (%p/v) | Log (ufc/mL) | Log (ufc/mL) (Promedio ± DE) | C. V. |
|----------------------------------|--------------|------------------------------|-------|
| 0 % (Control) | 3.82 | 3.86 ± 0.05 | 1.34 |
| | 3.92 | | |
| | 3.85 | | |
| 0.5% | 3.75 | 3.73 ± 0.02 | 0.52 |
| | 3.73 | | |
| | 3.71 | | |
| 1% | 3.71 | 3.71 ± 0.02 | 0.51 |
| | 3.70 | | |
| | 3.74 | | |
| 2% | 3.68 | 3.69 ± 0.07 | 1.96 |
| | 3.76 | | |
| | 3.62 | | |
| 2.5% | 3.41 | 3.41 ± 0.04 | 1.29 |
| | 3.37 | | |
| | 3.45 | | |
| 5% | 2.98 | 2.96 ± 0.02 | 0.65 |
| | 2.94 | | |
| | 2.95 | | |
| 10% | 2.70 | 2.69 ± 0.08 | 2.81 |
| | 2.76 | | |
| | 2.61 | | |

Nota: DE = Desviación estándar; C. V. = Coeficiente de variación.

Los extractos con cloroformo y éter de petróleo de *V. persicifolia* lograron inhibir el crecimiento de *M. luteus*. El extracto clorofórmico mostró ser el más eficaz debido a que logró una reducción de 3 unidades logarítmicas, mientras que el extracto etéreo sólo logró la reducción de 1.1 unidades logarítmicas.

Los grupos de compuestos identificados como las sesquiterpenlactonas, los triterpenos saturados, los fenoles, las cumarinas y los esteroides pudieron ser los responsables de la inhibición microbiana mostrada por ambos extractos. Sin embargo, su efecto se encuentra directamente influenciado por su concentración en el medio o por la presencia de otros compuestos que pudieran interferir en su acción, ya sea ayudando a aumentar su potencial antimicrobiano o disminuyéndolo.

Se determinó que, probablemente, la polaridad sea un aspecto importante que permite comprender las diferencias entre la actividad y eficacia que los extractos de una misma planta pueden presentar frente a las bacterias, y que de esta característica dependen el tipo de compuestos extraídos y la cantidad que se extrae del material vegetal.

9. Conclusiones

- ✓ De los extractos con agua, cloroformo y éter de petróleo, el extracto clorofórmico fue el que presentó el mayor rendimiento, lo que sugiere que la mayoría de los compuestos fitoquímicos presentes en las hojas de *Verbena persicifolia* son de polaridad intermedia.
- ✓ Los extractos con cloroformo y éter de petróleo registraron grupos de compuestos de los cuales ya se tiene reportado su efecto antimicrobiano.
- ✓ De las siete cepas bacterianas evaluadas, sólo *Micrococcus luteus* fue susceptible a la acción de dos de los extractos analizados: clorofórmico y etéreo.
- ✓ El extracto con cloroformo de *V. persicifolia*, a concentraciones ≥ 0.5 %, resultó ser el más eficaz para inhibir en el crecimiento de *M. luteus* en 3 unidades logarítmicas.
- ✓ El extracto con éter de petróleo de *V. persicifolia*, aunque presentó inhibición contra *M. luteus*, no puede considerarse como un antimicrobiano eficaz para este microorganismo debido a que no logró disminuir como mínimo 3 unidades logarítmicas a ninguna de las concentraciones ensayadas.

10. Perspectivas

- ✓ Evaluar otro método de esterilización de los extractos para ver si mejora la solubilidad y el potencial antimicrobiano.
- ✓ Realizar las pruebas del efecto que ejercen el cloroformo y el éter de petróleo en su estado puro frente al crecimiento de *M. luteus*.
- ✓ Caracterizar químicamente el extracto obtenido con cloroformo, para identificar las estructuras de los compuestos activos.

11. Referencias bibliográficas

- Aguilar, A. (2014). *Cultivo in vitro de Verbescina persicifolia D. C. para la obtención de metabolitos secundarios a partir de tejido de callo*. Veracruz, México: Universidad Veracruzana.
- Alakomi, H., Skyttä, E., Helander, I., y Ahvenainen, R. (2002). *The hurdle concept. Minimal Processing Technologies in the Food Industries*, 175–195. <https://doi.org/10.1533/9781855736795.175>
- Aponte, M., Calderón, M., Delgado, A., Herrera, I., Jiménez, Y., Ramírez, Z., y Toro, Y. (2013). Fitoquímicos. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Aquihuatl, M., Volke, T., Prado, L., Shirai, K., Ramírez, F., y Salazar, M. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología general*. México, D. F.: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Assegid, G., y Lamprecht, I. (1997). Microcalorimetric investigations on the influence of propolis on the bacterium *Micrococcus luteus*. *Thermochimica Acta*, 290(2), 155–166. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(96\)03088-2](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(96)03088-2)
- Biblioteca Digital de Plantas Medicinales. (2009). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Botta, B., Cargminani, M., Volpe, A., Botta, M., Corelli, F., y Delle, G. (2003). *Novel hipotensive agents from Verbescina caracasana: structure, syntesis and pharmacology*. USA: Curr Med Chem.
- Brisset, N., Bruneton, J., Evans, W., y Palomino, O. (2012). Análisis Químico De Plantas Aromáticas Y Medicinales. *In Uso industrial de plantas aromáticas y medicinales* (pp. 108–120). Madrid, España: Universidad Politécnica de Madrid.
- Bueno, J., Martínez, J., y Stashenko, E. (2009). *Actividad antimicobacteriana de terpenos*. In *Salud UIS* (pp. 231–235).

- Cárdenas, N., Pérez, S., Zavala, M., Aguirre, J., y Pérez, C. (2005). Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus* Link. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(3). Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/579/57936304/>
- Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N., y Rueda, D. (2009). Preliminary phytochemical analysis of Cupatá (*Strychnos schultesiana* krukoff) stems and seeds. *Revista Colombiana Forestal*, 12, 161–170.
- Castañeda, C. B., Manrique, M. R., y Ibañez, V. L. (2001). Estudio fitoquímico y farmacológico de plantas con efecto Hipoglicemiante. *Cultura*. Lima, Perú: Universidad de San Martín de Porres.
- Castillón, L., Moreno, G., Navarro, M., Gutiérrez, E., Sánchez, R., y Tequida, M. (2013). *Microbiología general. Manual de prácticas*. Sonora, México: Universidad de Sonora.
- Chasquibol, N., Lengua, L., Delmás, I., Rivera, D., Bazán, D., Aguirre, R., y Bravo, M. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 6(2), 9–20. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2009000800010>
- Corrales, L., Castillo, A., & Melo, A. (2013). Evaluación del potencial antibacterial *in vitro* de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *Ciencias Biomédicas*, 11(19), 51–63.
- Coy, C., Parra, J., y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (rutaceae). *Revista Elementos*, 4, 31–39.
- Dalla Via, L., García, A., Braga, A., Martínez, M., Grancara, S., Martinis, P., ... Toninello, A. (2014). An Eudesman Derivative from *Verbesina persicifolia* D.C. as a Natural Mild Uncoupler in Liver Mitochondria. A New Potential Anti-obesity Agent? *Current Pharmaceutical Design*, 20(2), 253–261. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990028>

- Dalla Via, L., Mejia, M., García, A. N., Braga, A., Toninello, A., y Martínez, M. (2015). Anti-inflammatory and antiproliferative evaluation of 4 β -cinnamoyloxy,1 β ,3 α -dihydroxyeudesm-7,8-ene from *Verbesina persicifolia* and derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(17), 5816–5828. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.002>
- Davidson, P. M., y Zivanovic, S. (2003). The use of natural antimicrobials. *In Food Preservation Techniques* Tennessee, USA: Woodhea. Pp. 5–30. Publishing. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1533/9781855737143.1.5>
- Delaquis, P. J., y Mazza, G. (1995). Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. *Food Technology*, 49(11), 73–84.
- Delaquis, P. J., y Sholberg, P. (1997). Antimicrobial Activity of Gaseous Allyl Isothiocyanate. *Journal of Food Protection*, 60(8), 943–947. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.8.943>
- Díaz, E., Mayo, O., Miró, I., Pérez, Y., y Tsoraeva, A. (2017). Determinación de la eficacia de los desinfectantes empleados en las áreas asépticas de un centro productor de biofarmacéuticos. *VacciMonitor*, 26(2), 54–59.
- Dürst, U., Bruder, E., Egloff, L., Wüst, J., Schneider, J., y Hirzel, H. (1991). *Micrococcus luteus*: a rare pathogen of valve prosthesis endocarditis. *Z Kardiol*, 294-303.
- Estrada, E. (2018). *Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos*. Retrieved August 23, 2018, from <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>
- Estrada, M. (2005). *Aislamiento, evaluación y caracterización de fracciones antimicrobianas de las diversas partes de la zanahoria*. Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- FAO, y OMS. (2004). *Caracterización de peligros de patógenos en los alimentos y el agua*. Roma, Italia: FAO/OMS.

- Food and Agriculture Organization. (2018). *Alimentos sanos y seguros*. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/014/am401s/am401s05.pdf>
- Fernández, E. (2008). *Microbiología e inocuidad de los alimentos* (2° ed.). Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Figuroa, I. M., y Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1–2), 25–42. <https://doi.org/10.1107/S1744309108039882>
- Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2007). *Diagnóstico Microbiológico* (12° ed.). Madrid, España: Panamericana, S.A.
- Frazier, W., y Westhoff, D. (2000). *Microbiología de los alimentos* (4° ed.). Zaragoza, España: Acribia, S. A.
- Freeman, C., Klutman, N., y Lamp, K. (1997). Metronidazole. *A therapeutic review and update. Drugs* (54), 679-708.
- García, J. (2007). *Espicias: delicias exóticas*. Barcelona, España: Intermon Oxfam.
- García, M. A., Aguilar, A., Gutiérrez, M., Rodríguez, F., Morales, J. A., Guerrero, P. J., y Del Toro, C. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de *Tempisque (Sideroxylum capiri PITTIER)*. *Biocencia*, 18(3), 3–8.
- Garcinuño, R. (2013). *Contaminación de los alimentos durante los procesos de origen y almacenamiento*. UNED, 51–63.
- Gutierrez, J., Barry, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028>
- Harris, L., Daeschel, M., Stiles, M., y Klaenhammer, T. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protection*,

52(6), 384–387. Retrieved from <http://fsweb2.schaub.ncsu.edu/usdaars/ Acrobatpubs/P190-220/p214.pdf>

Henao, J., Muñoz, L., Ríos, E., Padilla, L., y Giraldo, G. A. (2009). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides h.b.k.* Cultivada en el departamento del Quindío. *Revista De Investigaciones Universidad Del Quindio*, 1(19), 159–164. https://doi.org/http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/f4d9_n1918.pdf

Herald, P. J., y Davidson, P. M. (1983). Antibacterial Activity of Selected Hydroxycinnamic Acids. *Journal of Food Science*, 48(4), 1378–1379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb09243.x>

Hernández, L., López, C., Uresti, C., Soto, O., Juanz, A., Aguilar, M., y Castro, G. (2013). *Estudio ednofarmacológico exploratorio de plantas medicinales en la comunidad de Arroyo del Potrero, municipio de Martínez de la Torre, Veracruz*. Chiapas, México: Congreso Mexicano de Botánica.

Hernández, M. (2016). *Microbiología de los Alimentos: fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud*. México, D. F.: Médica Panamericana.

Hinton, G. (03 de marzo de 2018). IREKANI. Obtenido de UNIBIO: <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/20494?mode=full&proyecto=irekani>

Ito, K., & Pouch, F. (2001). Microorganisms of alteration or deterioration. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (4°, pp. 48–111). USA: American Public Health Association. Retrieved from http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/4Alteracion_6541.pdf

Jay, J. (1994). *Microbiología moderna de los alimentos* (3° ed.). Zaragoza, España: Acribia, S.A.

Jay, J. (2000). Taxonomy, Role, and Significance of Microorganisms in Foods. In *Modern Food Microbiology* (6°, pp. 11–32). Nevada, USA: Aspen Publishers.

- Klinger, I. (2001). Foodborne Human Pathogens and Their Toxic Metabolites in Israel. In *Microbial Food Contamination* (Vol. 115, pp. 1091–1110).
- Leistner, L. (1995). Principles and applications of hurdle technology. En G. W. Gould, *New methods of food preservation* (págs. 1-21). Londres, Inglaterra: Blackie Academic & Professional.
- Lizcano, A., y Vergara, J. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos* (Vol. 39). Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- López-Rosas, C. (2014). *Evaluación de la actividad anticonvulsivante del extracto metanólico de hojas de Verbescina persicifolia en ratas macho de la cepa Wistar*. Veracruz, México: Universidad Veracruzana.
- López-Canúl, G. (2015). Evaluación del efecto anti-nociceptivo y anti-alodínico del extracto acuoso de huichin (*Verbescina persicifolia DC*) administrado de forma aguda en ratas macho de la cepa Wistar. Veracruz, México: Universidad Veracruzana.
- Mantilla, J., y Sanabria, A. (1985). Actividad antimicrobiana de plantas superiores colombianas. *Universidad Nacional de Colombia*, 1(1), 25–33.
- Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Pharmaceutical Chemistry Faculty, 1–34. Retrieved from <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>
- Martínez, Y., Soto, F., Almeida, M., Hermosilla, R., y Martínez, O. (2012). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale L.* (marañón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 320–329.
- Mora, C. (2011). *Modo de acción de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona como inhibidor de β -lactamasa: estudio cinético y*

- caracterización inicial mediante espectrometría de masas*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Morata, A. (2010). *Nuevas tecnologías de conservación de alimentos* (2° ed.). Madrid, España: A. Madrid Vicente.
- Mossel, D., Moreno, B., y Struijk, C. (2006). *Microbiología de los alimentos* (2° ed.). Zaragoza, España: Acribia, S. A.
- Muñoz, F. (2016). Identificación de grupos funcionales y taninos naturales. *In Manual de prácticas del laboratorio de Química para Ingeniería forestal* (pp. 1–8). Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes.
- Naidu, A. S., y Davidson, P. M. (2000). Phyto-phenols. *In Natural Food Antimicrobial Systems* (p. 31). California, USA: CRC Press.
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R., y Crecelius, A. T. (2000). Flavonoids. *In Natural Food Antimicrobial Systems*. California, USA: CRC Press.
- Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos (CODEX STAN 193-1995). Consultada el día 10 de agosto de 2018.
- Ocaña, M., Muñoz, O., Castro, V. D., y Hernández, M. (2000). *Posible efecto hepatoprotector de la Verbescina persicifolia en lesión hepática inducida por paracetamol/EtOH en ratas hembra de la cepa Wistar*, 1–6. <https://doi.org/1946-5351>
- Oleszek, W. A. (2000). Saponins. *In Natural Food Antimicrobial Systems* (p. 30). California, USA: CRC Press.
- Orantes, E. (2008). *Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca Quararibea yunckeri Standley Subsp. izabalensis W.S. Alverson ex Véliz (Bombacaceae)*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Retrieved from http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2698.pdf
- Peredo, H., Palou, E., y López, A. (2009). *Aceites esenciales: métodos de extracción*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.

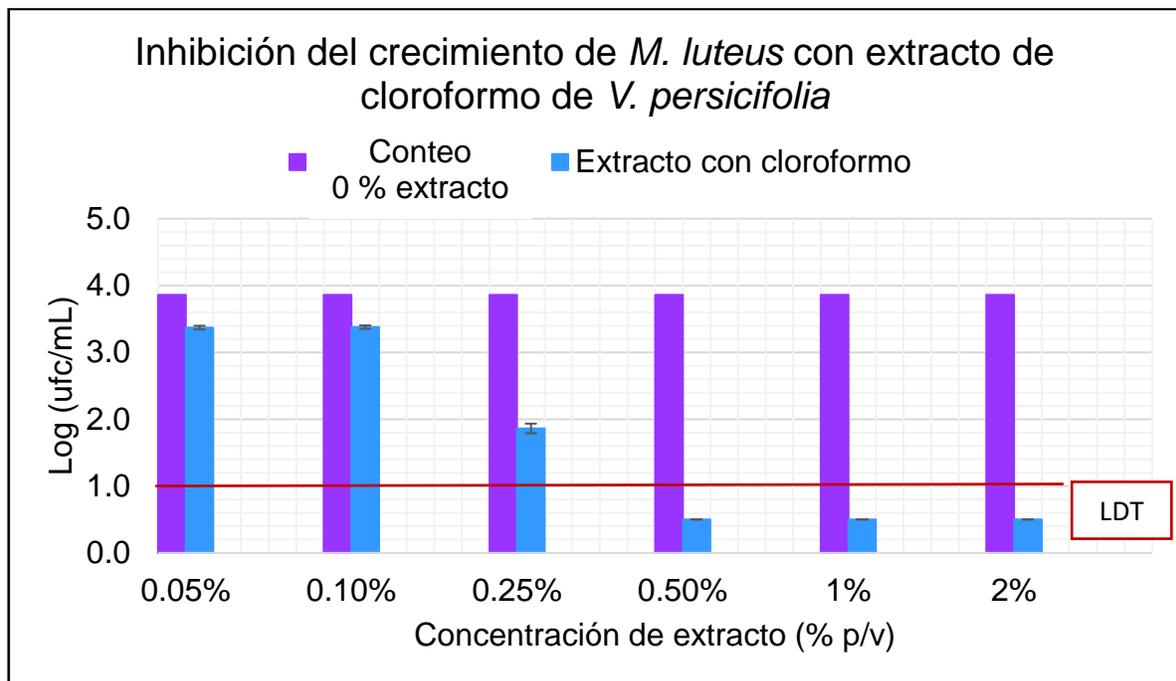
- Pérez, J., Isaza, G., y Acosta, S. (2007). Actividad antibacteriana de extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*. *Biosalud*, 6(May), 59–68.
- Ramírez, M., Barajas, L., Pérez, C., Sáenz, A., y Silva, S. (2012). Synthesis and biological activity of chalcones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43, 7–14.
- Ray, B. (2004). *Fundamental Food Microbiology*. New York (3°). Florida, USA: CRC Press. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Ray, B., y Bhunia, A. (2010). *Fundamentos de Microbiología de los alimentos* (4° ed.). México, D. F.: McGrawHill.
- Repetto, M. (2000). *Toxicología fundamental* (3°). Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.
- Ringuelet, J., y Viña, S. (2013). *Productos naturales vegetales* (1°). Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de La Plata. <https://doi.org/http://doi.org/10.1093/aob/mcn043>
- Rivas, B., Leal, I., Loaiza, L., Morillo, Y., y Colina, J. (2017). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en extractos de cuatro especies de orégano. *Revista Técnica*, 40(3), 134–143. Retrieved from <http://go.galegroup.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA535100126&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=02540770&p=AONE&sw=w>
- Roca, W. (1980). *El cultivo de meristemas de Yuca*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153–170. <https://doi.org/1665-0441>
- Sahinoglu, E., y Uslu, T. (2013). Use of ultrasonic emulsification in oil agglomeration for coal cleaning. *Fuel*, 113, 719–725. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.06.046>
- Schlegel, H. (1997). *Microbiología general*. Barcelona, España: Omega S. A.

- Shafiur, M. (2003). *Manual de conservación de los alimentos*. Zaragoza, España: Acribia, S. A.
- Shafiur, M. (2007). Handbook of Food Preservation. *Food Research International* (2°, Vol. 35). Florida, USA: CRC Press. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00143-5)
- Sharma, A., Flores, R. del C., Cardoso, A., y Villarreal, M. L. (2017). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 208, 264–329. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.045>
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., y Cullen, P. J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 5987–6000. <https://doi.org/10.1021/jf900668n>
- Toribio, M., Oriani, D., Fernández, J., y Skliar, M. (2004). Actividad antimicrobiana de *Verbesina encelioides*. *In Vet*, 7(1), 41–45.
- Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., y Mercado, M. (2005). Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *MVZ-Córdoba*, 10(1), 511–543.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9° ed.). Madrid, España: Médica Panamericana S.A.
- Vega, E. y López, A. (2009). *Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. Pp 1-3.
- Velasco, R., y Tapia, R. (2014). *Curso práctico de Microbiología*. México, D. F.: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Vélez, R., D'Armas, H., Jaramillo, C., y Vélez, E. (2018). Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). *FACSalud*, 1, 31–39.

- Verde, M. J., García, S., y Rivas, C. (2016). Metodología Científica Para El Estudio De Plantas Medicinales. *Investigación de Plantas de Importación Médica*, 1–40. <https://doi.org/10.3926/oms.335>
- Vibrans, H. (2011). *Malezas de México: Verbesina croata*. México: Conabio.
- Villacorta, J. (2013). *Cuantificación de sesquiterpenlactonas provenientes de las hojas de Calea urticifolia (JUANISLAMA) recolectadas en el periodo de enero a junio de 2012*. San Salvador, El Salvador: Universidad El Salvador. Retrieved from <http://ri.ues.edu.sv/3268/1/16103237.pdf>
- Whitmore, B. B., y Naidu, A. S. (2000). Thiosulfinates. *In Natural Food Antimicrobial Systems*. California, USA: CRC Press.

12. Anexos

Anexo 1



Anexo 2

