

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



MAESTRÍA EN CIENCIA DE ALIMENTOS

**“Efecto antibacteriano de la cáscara de
Oxalis tuberosa en la vida de anaquel de
productos de panificación”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

L.G. Denis de Jesús Dimas López

Directores:

Dr. Javier Piloni Martini

Dra. Norma Güemes Vera

Asesores:

Dr. Sergio Soto Simental

Dra. Aurora Quintero Lira

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Noviembre 2018





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Agropecuarias
School of Forestry and Environmental Studies

COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Efecto antibacteriano de la cáscara de *Oxalis tuberosa* en la vida de anaquel de productos de panificación", que desarrolla el estudiante LG Denis de Jesús Dimas López.

Asistentes:

Dra. Norma Guemes Vera
Dr. Javier Piloni Martini
Dr. Sergio Soto Simental
Dra. Aurora Quintero Lira

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, LG Denis de Jesús Dimas López, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 17 de octubre de 2018

Dra. Norma Guemes Vera
Dr. Javier Piloni Martini
Dr. Sergio Soto Simental
Dra. Aurora Quintero Lira

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DEL INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



Agradecimientos Especiales

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el apoyo recibido

Al Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Laboratorio de Alimentos, a los doctores Aurea Bernardino Nicanor y Leopoldo González Cruz por el apoyo para la determinación de antioxidantes.

Al Dr. Vicente Vega Sánchez y a la Dra. Nydia Edith Reyes Rodríguez por el apoyo durante la identificación de especies bacterianas aunado a la paciencia y confianza, por la convivencia y por los consejos, de verdad fue un honor compartir ese tiempo con ustedes.

Agradecimientos

A mis padres y hermano por el apoyo durante el transcurso de la maestría, por ser un impulso para la mejora diaria y ser la fortaleza para afrontar las adversidades que se presentaron. En especial a mis padres por ser un ejemplo de lucha constante y de que es posible conseguir lo que se desea siempre y cuando se trabaje para conseguirlo, a mi hermano por ser una inspiración durante las jornadas difíciles.

A mis Asesores: Dra. Norma, no me alcanzarían las líneas para agradecerle por la confianza, por ayudarme a crecer a nivel personal y académico, estoy infinitamente agradecida porque me mostró que soy capaz de hacer cosas fuera de mi zona de confort y que tenemos la facultad de abrir horizontes pero solo necesitamos un empujón, Dr. Piloni, gracias por la paciencia durante la fase experimental, por enseñarme y creer en las capacidades para poder profundizar en temas que yo no hubiera imaginado, sus enseñanzas no las voy a olvidar fácilmente, muchas gracias por la confianza que sé no fue fácil ganar y espero no perder, Dr. Sergio, muchísimas gracias por todo, de usted me llevo paciencia, calma, conocimiento y una mejora constante, gracias por creer en mis capacidades y en hacerme ver mis errores, compartimos pláticas muy amenas dentro y fuera del tema de investigación, gracias por dejarme convivir con Cris, Dra. Aurora gracias por las retroalimentaciones, por mostrar siempre una energía positiva que se contagia y llena de alegría incluso un día largo y cansado.

A mis amigos: Fer, Naye, Sam, muchísimas gracias por escucharme y alentarme cuando sentía que ya no podía seguir, Juan, muchas gracias por apoyarme y siempre estar ahí, Dulce, gracias por ser una gran amiga ha sido un placer conocerte, gracias por el apoyo y porque juntas pudimos seguir adelante en contra de los momentos difíciles cuando ni nosotras mismas creíamos en nosotros, Uriel, Fernando, Néstor por ayudarme cuando estaba perdida en los temas, por la paciencia y por hacer fácil el entendimiento de ciertas cosas, por esos momentos principalmente de alegría, no pude encontrar mejor crew durante estos dos años y los que faltan... Toño, gracias por la ayuda y por explicar ciertas cosas de forma sencilla para que lo pudiera entender más rápido, por el apoyo y por estar ahí cuando era necesario

Índice

Resumen	VI
ABSTRACT	VII
1. Introducción	1
2. Cereales.....	3
2.1 Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	3
2.2 Productos de panificación	5
2.2.1 Panificación en México	5
2.2.1.1.1 Harina de trigo.....	6
2.2.1.1.2 Azúcar.....	7
2.2.1.1.3 Huevo.....	7
2.2.1.1.4 Levadura	7
2.2.1.1.5 Grasas	8
2.3 Vida de anaquel	9
3. Bacterias	10
3.1 Dominio bacteria	10
3.2 Importancia de las bacterias en alimentos	10
3.3 Identificación de bacterias.....	11
3.3.1 Morfología celular	12
3.3.2 Tinciones.....	12
3.3.3 Morfología colonial	13
3.3.4 Pruebas bioquímicas.....	14
3.3.5 Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)	14
3.4 Principales bacterias contaminantes en alimentos	15
3.4.1 Deterioradores de productos de panificación.....	16
4. Papa roja (<i>Oxalis tuberosa</i>)	18
4.1 Composición nutrimental	19
4.1.1 Antioxidantes.....	20
4.1.1.1 Compuestos fenólicos	20

4.1.1.2 Flavonoides	21
4.1.1.3 Antocianinas.....	21
5. Justificación	22
6. Objetivos	23
6.1 Objetivo General.....	23
6.2 Objetivos Específicos.....	23
7. Materiales y Métodos	24
7.1 Obtención de <i>Oxalis tuberosa</i> y elaboración de harina.....	24
7.2 Obtención de extracto de <i>Oxalis tuberosa</i>	24
7.3 Aislamiento de microorganismos	25
7.4 Identificación de bacterias por 16S rARN	26
7.5 Determinación de efecto antimicrobiano y concentración mínima inhibitoria	28
7.6 Contenido de fenoles totales en los extractos	29
7.7 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH, EC ₅₀	29
7.8 Capacidad antioxidante por el radical ABTS ⁺	30
7.9 Elaboración de pan dulce y diseño de tratamientos	30
7.10 Determinación de carga microbiológica	32
7.11 Índice de peróxido	32
7.12 Análisis de Perfil de Textura (APT).....	33
7.13 Actividad de agua (a _w)	34
7.14 Determinación de color.....	34
7.15 Análisis estadístico	34
8. Resultados y Discusión	35
8.1 Obtención de harina de <i>Oxalis tuberosa</i>	35
8.2 Obtención del extracto antibacteriano.....	36
8.3 Aislamiento de microorganismos	39
8.4 Determinación del efecto antibacteriano.....	44
8.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	50
8.6 Cuantificación de fenoles totales en los extractos	51
8.7 DPPH, EC ₅₀	53
8.8 Inhibición del radical ABTS ⁺	54
8.9 Análisis microbiológicos.....	56

8.10 Análisis de Perfil de Textura (APT) en pan tipo danés	59
8.11 Capacidad Antioxidante en pan tipo danés	62
8.12 Índice de peróxido en pan tipo danés	64
8.13 Actividad de Agua (a_w)	66
8.14 Color CIE L*a*b*	68
9. Conclusiones	72
10. Referencias.....	74
11. Anexos	90

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes de harina de trigo	4
Tabla 2. Microorganismos deterioradores de pan.....	17
Tabla 3. Composición nutrimental de <i>Oxalis tuberosa</i>	20
Tabla 4. Condiciones para eliminación parcial en rotavapor.....	25
Tabla 5. Condiciones de termociclador.....	27
Tabla 6. Formulación de masa danesa.....	31
Tabla 7. Balance de materia para la obtención de harina	36
Tabla 8. Rendimiento de extracción	36
Tabla 9. Carga microbiológica en pan comercial	39
Tabla 10. Morfología celular y pruebas bioquímicas en colonias halladas	40
Tabla 11. Características morfológicas en colonias bacterianas encontradas.....	41
Tabla 12 Identificación de bacterias aisladas por la técnica 16S rARN	43
Tabla 13. Actividad antibacteriana para el extracto de hexano	46
Tabla 14 Efecto antibacteriano para extracto con acetona	47
Tabla 15 Efecto inhibitorio para el extracto con etanol.....	48
Tabla 16. CMI del extracto de etanol y penicilina.....	51
Tabla 17. Cuantificación de fenoles totales en los extractos.....	52
Tabla 18. Actividad antioxidante de los extractos contra el radical ABTS ⁺	56
Tabla 19. Microbiológicos durante vida de anaquel.....	58
Tabla 20. APT durante vida de anaquel	61

Tabla 21. Capacidad antioxidante durante vida la de anaquel durante la vida de anaquel	64
Tabla 22. Color en corteza durante el periodo de almacenamiento.....	71
Tabla 23. Color de miga durante el periodo de almacenamiento.	71

Índice de figuras

Figura 1. Morfología del grano de trigo.....	4
Figura 2. Papa roja <i>Oxalis tuberosa</i>	18
Figura 3. Proceso de extracción de cáscara de <i>Oxalis tuberosa</i>	24
Figura 4. Doblado de masa danesa	31
Figura 5. Curva típica de APT	33
Figura 6. Extractos de cáscara de <i>Oxalis tuberosa</i>	37
Figura 7. Cinética de inhibición de DPPH	53
Figura 8. Índice de peróxido en vida de anaquel	65
Figura 9. a_w durante vida de anaquel.....	68

Resumen

La papa roja *Oxalis tuberosa* es un tubérculo originario de la región Andina, que se ha adaptado al suelo mexicano siendo su cosecha anual de noviembre a febrero. En estudios realizados sobre la papa roja han encontrado que tiene poder antioxidante y en investigaciones más recientes han hallado que tiene un gran efecto antimicrobiano inhibiendo *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Uno de los principales problemas en la panificación es la contaminación por microorganismos, por eso la industria ha incorporado aditivos para prolongar la vida de anaquel, sin embargo la demanda por obtener productos menos sintéticos ha llevado al uso de antimicrobianos naturales como aceites esenciales. Debido a la necesidad de productos antioxidantes y antimicrobianos de origen natural, se optó por la elaboración de extractos antimicrobianos a partir de harina de cáscara de *Oxalis tuberosa* y solventes como hexano, acetona y etanol, estos fueron evaluados en cuanto a la actividad de antimicrobiana y antioxidante obteniendo que el extracto con etanol logra inhibir a bacterias Gram positivas y negativas, en cuanto al contenido de antioxidantes mostró un total de 9.23 mg EAG/mg para fenoles, posteriormente fue aplicado en un pan danés analizando los parámetros de textura, color, a_w , índice de peróxido y crecimiento microbiológico, para tener un punto de comparación se elaboró un control y un pan al cual le fueron agregadas bacterias deterioradoras de productos, todos los tratamientos fueron almacenados durante 30 días en bolsas de celofán. Durante el almacenamiento el pan con extracto (PE) estuvo dentro de los límites permisibles de la carga microbiológica y comprobando que la aplicación de este inhibe el crecimiento de bacterias obteniendo 4.48 log (UFC/mL) mientras que el control está 7 fases logarítmicas arriba de este resultado.

ABSTRACT


Red potato *Oxalis tuberosa* is an andean tuber, which has adapted to the Mexican soil in its annual harvest from november to february. In studies on the red potato it was found that it has an antioxidant power and in the most recent investigations it was found with antimicrobial effect inhibiting *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus niger*.

One of the main problems for bread it's the contamination by microorganisms, that is why the industry has incorporated preservatives to prolong the shelf life, however the demand for obtaining less synthetic products has led to adopt the use of natural antimicrobials as essential oils. Due to the need of antioxidants and antimicrobial products of natural origin, it was choose the elaboration of antimicrobial extracts from *Oxalis tuberosa* peel and solvents such as hexane, acetone and ethanol, these were evaluated in terms of antimicrobial activity and antioxidant obtaining that the extract with ethanol was able to inhibit Gram positive and negative bacteria with a total of 9.23 mg EAG / mg for phenols, later it was applied in a Danish bread that was analyzed in parameters of texture, color, a_w , peroxide index and microbiological growth, to have a point of comparison, it was use a control and a bread inoculated with deteriorating bacteria, all treatments were stored for 30 days in cellophane bags. During storage the bread with extract (PE) remained within the allowed limits of the microbiological load and it was found that the application of this inhibits the growth of bacteria obtaining 4.48 log (CFU / mL) while the control is 7 logarithmic phases above this result.

1. Introducción

El consumo de productos de panificación ha ido aumentando en la última década debido a la accesibilidad de producción y adquisición por parte de la población, en México el pan dulce es el producto de preferencia, siendo más adquirido el pan a granel elaborado en panaderías artesanales o panaderías semi-industriales (Secretaría de Economía, 2017). Durante el periodo de almacenamiento el pan comienza a perder propiedades fisicoquímicas y convirtiéndose en un medio de crecimiento para microorganismos debido a factores como disponibilidad de nutrientes en la matriz alimentaria, temperatura proporcionada por el ambiente y actividad de agua a_w (Guynot *et al.*, 2003). El pan es frecuentemente contaminado por hongos, levaduras y bacterias, ya que durante el proceso de empaqueo el pan no ha sido enfriado completamente y atrapa humedad en el empaque lo cual favorece al crecimiento de estos microorganismos, sin embargo también existe una alta probabilidad de contaminación por bacterias principalmente por el género *Bacillus* debido a la presencia de esporas en materias primas como harina y azúcar, así mismo un factor determinante en cuanto a la proliferación bacteriana son las buenas prácticas de manufactura, el uso de ingredientes adecuadamente limpios, desinfectados y la manipulación por parte del consumidor (Valerio *et al.*, 2015).

Han sido tomados distintos caminos de acción en contra de los deterioradores del pan siendo el más común el uso de conservadores sintéticos, sin embargo algunos de ellos han presentado tener efectos nocivos en la salud del consumidor, también se han adicionado compuestos de origen natural como el ácido ascórbico como medio de conservación sin embargo la sociedad no lo encuentra adecuado. El uso de aceites esenciales, antioxidantes y antimicrobianos de origen natural ha sido una excelente opción para sustituir a los compuestos sintéticos, en la naturaleza es encontrada una variedad de productos con alta capacidad antioxidante como té negro, especias, ajo, canela y jengibre, por mencionar algunos, y han obtenido buenos resultados en su aplicación en cárnicos, lácteos,



productos con alto contenido de huevo, algunos de estos productos son aplicados directamente en la matriz alimentaria o realizan extractos para obtener los compuestos bioactivos y ser adicionados al alimento (Lai & Roy, 2004). En diferentes investigaciones ha sido determinado que la papa *Oxalis tuberosa* posee una alta capacidad antioxidante principalmente por la presencia de fenoles y antocianinas lo cual la hace resistente a microorganismos (Flores *et al.*, 2002) (Godínez, 2016).

En el siguiente trabajo de investigación fue realizado un extracto a partir de la cáscara de *Oxalis tuberosa* para aplicarlo en productos de panificación y evaluar si existe una inhibición de microorganismos deterioradores que son encontrados en el pan con el fin de aumentar la vida de anaquel del producto terminado.

2. Cereales

A nivel mundial los cereales son de suma importancia en la alimentación debido a su bajo costo y fácil acceso, éstos constituyen el 50% de la ingesta de carbohidratos en la dieta actual, una tercera parte del consumo de proteínas y del 50 - 60% del aporte requerido de vitamina B1, B2 y B12, dentro de los cereales destaca el consumo de: trigo, arroz, centeno, cebada, mijo y avena (Belitz *et al.*, 2009). En el área de la panificación el trigo juega un papel muy importante, donde la harina es obtenida por la molienda del cereal y representa la base para casi todos los productos de panificación. Su amplio uso en la industria, es debido a la formación de gluten (matriz proteica) que brinda propiedades viscoelásticas a las masas elaboradas con este cereal (Codinã *et al.*, 2013).

2.1 Trigo (*Triticum aestivum*)

Morfológicamente el trigo consta de tres componentes principales: germen, endospermo y salvado (Figura 1). El endospermo representa el 82% del peso total del grano y está compuesto principalmente de almidón y proteínas (Juárez *et al.*, 2014). Dentro de las proteínas que son encontradas en el endospermo hay cuatro fracciones, albuminas, globulinas, gliadinas y gluteninas, siendo estas dos últimas las encargadas de formar una red tridimensional llamada gluten. Al formar una masa viscoelástica estas proteínas tienen un papel definido, las gliadinas son encargadas de dar viscosidad a la masa mientras que las gluteninas brindan fuerza y elasticidad. La red de gluten es desarrollada a partir de la desnaturalización de las fracciones proteicas lo que es conseguido con el esfuerzo mecánico que se realiza durante el amasado (Belitz *et al.*, 2009).

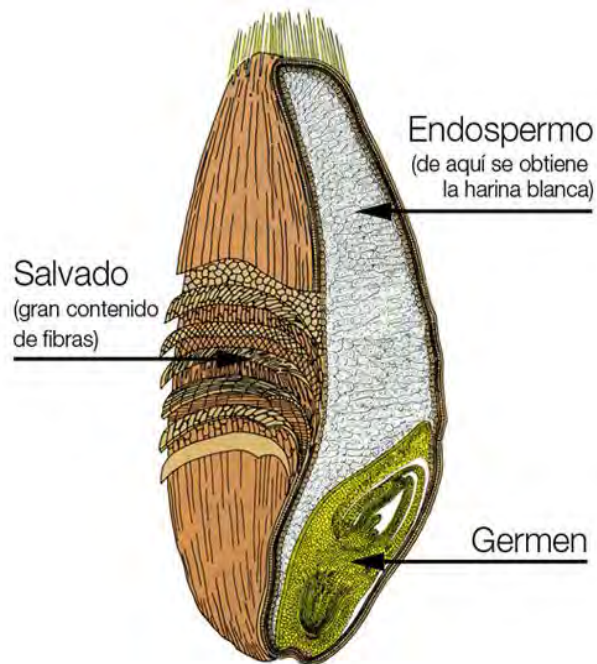


Figura 1. Morfología del grano de trigo

Tras la separación de las partes del trigo se realiza la molienda del endospermo lo que es conocido como harina, la cual está compuesta por almidón, proteínas polisacáridos diferentes al almidón y lípidos (Tabla 1). Las harinas son clasificadas de acuerdo al porcentaje de proteína que contienen dividiéndose en tres grupos: harina de proteína cristalina la cual contiene del 12.5% - 16.5% utilizada para la fabricación de pastas, harina panadera de 10.5% - 14.4% y harina suave de 8% - 10.5% la cual es utilizada para la elaboración de galletas (De la Vega, 2009).

Tabla 1. Componentes de harina de trigo

	%
Almidón	70-75
Proteína	10-12
Polisacáridos	2-3
Lípidos	2

2.2 Productos de panificación

El pan es un símbolo sagrado para la cultura cristiana, judía, griega y egipcia, siendo los egipcios quienes iniciaron la producción de pan. Este producto es básico en la dieta de la mayoría de los países debido a su alto valor nutricional y una producción simple con utensilios e ingredientes fáciles de encontrar, el proceso general para la elaboración de los productos de panificación es la mezcla de ingredientes, amasado, fermentación, ponchado/formado y horneado. La industria de la panificación comienza en Europa debido a la propagación del trigo como cultivo, donde la producción de la mayoría de los productos es enfocada en pan de mesa para acompañar carnes frías o quesos, sin embargo después de la aparición del azúcar que llegaba desde Asia el pan comenzó a tomar otro giro y también fueron creados productos dulces que eran enfocados principalmente para la clase burguesa debido al alto costo del azúcar (Serna-Saldívar, 2016).

2.2.1 Panificación en México

Los productos de panificación están incluidos dentro de la canasta básica de la población mexicana. En México se puede encontrar una amplia variedad de pan debido a que en cada estado tiene un producto representativo que hace alusión a la cultura y tradiciones del lugar, es por eso que han sido registrados alrededor de 1,000 variedades que son distinguidas por la masa de elaboración, forma y región (Profeco, 2018).

Las principales masas utilizadas en la panadería mexicana son blanca o salada, dulce, hojaldre y danesa, esta última es una masa compleja ya que los ingredientes utilizados son similares a los de la masa dulce sin embargo la incorporación de la materia grasa requiere de procesos mecánicos y una administración de tiempo y temperatura para no afectar la textura del producto final. Dentro de los productos de panificación dulces los de mayor importancia

económica son los derivados de la masa danesa debido a la cantidad de insumos con la que es elaborada no obstante el costo no impide que estos productos sean de los más consumidos en el país.

2.2.1.1 Masa Danesa

La principal característica de los panes elaborados con masa danesa es la formación de capas múltiples en la miga, para lograr esto la materia grasa es aplicada por medio de rodillo y la masa es doblada de 3 a 7 veces para conseguir esa característica especial. Otra de las características de esta masa es que contiene del 4 al 15% de azúcar, una vez horneado puede adoptar diferentes formas como cuernitos, roles de canela, chocolatín y el pan obtenido puede bañarse con almíbar o es glaseado o relleno dependiendo de la variedad. El pan danés generalmente es elaborado con harina de trigo, huevo, azúcar, levadura y grasa como: margarina o mantequilla (Serna, 2016).

2.2.1.1.1 Harina de trigo

Es el producto de la molienda del endospermo del trigo, tiene un alto contenido en carbohidratos y proteínas, de éstas últimas resaltan la gliadina y glutenina las cuales forman el complejo proteico denominado gluten que es fundamental para el volumen del pan. De todas las harinas es la única que posee la capacidad de formar una masa cohesiva capaz de retener el gas que es formado debido a la fermentación ocasionada por las levaduras, brindando estructura al producto final. El centeno es otro cereal que tiene esta capacidad sin embargo las propiedades viscoelásticas que son logradas con el trigo no son comparadas con ningún otro cereal (Belitz, 2009).

2.2.1.1.2 Azúcar

El termino refiere a los productos con diferente grado de refinamiento obtenidos de la caña de azúcar, el nivel de procesamiento puede notarse en la coloración y tamaño del grano, el producto que es consumido generalmente en los hogares es la azúcar estándar o granulada, esta es utilizada como endulzante de bebidas, productos de repostería y panadería (Perez-Portundo, 2012). Este ingrediente cumple con funciones específicas en panadería, agrega dulzura y sabor al producto, suaviza y al mismo tiempo hace la textura del pan más fina, sirve como alimento a las levaduras que otorgan el volumen al pan por la fermentación liberando CO₂ que queda encapsulado por la red de gluten, dentro de estas funciones cabe destacar que junto con las proteínas brindan un color dorado a la corteza del pan debido a la reacción de Maillard (Gisslen, 2013).

2.2.1.1.3 Huevo

Las funciones primordiales del huevo en los productos de panificación corresponden a: dar estructura como resultado de la coagulación de las proteínas, los productos con alto contenido de azúcar y grasa debilitan la red de gluten pero el huevo la estabiliza, la yema de huevo contribuye a otorgar volumen y textura tersa al pan debido a los emulsificantes que posee, proporciona humedad y color a la miga (Gisslen, 2013).

2.2.1.1.4 Levadura

Las levaduras son hongos unicelulares no filamentosos, son capaces de crecer como anaerobios facultativos, estas realizan una respiración aeróbica para metabolizar los azúcares hasta dióxido de carbono y agua, si carecen de oxígeno fermentan los azúcares produciendo etanol y CO₂ (Coronel Navarro, 2015). El

agente leudante biológico más utilizado en la industria de la panificación es la levadura *Saccharomyces cereviceae* la cual es encontrada en tres formas comerciales: fresca o comprimida, seca-activa e instantánea o liofilizada. La levadura instantánea es la que posee mayor vida de anaquel y rendimiento, las funciones destacables del uso de este leudante son el incremento de volumen al pan por la generación de CO₂ como resultante de la fermentación y la formación de precursores de sabor por la fermentación alcohólica.

2.2.1.1.5 Grasas

Los productos grasos utilizados se eligen tomando en cuenta su punto de fusión, dureza a diferentes temperaturas, sabor y capacidad emulsificante. Las grasas más utilizadas son grasas animales, vegetales, margarina y derivados de la leche como mantequilla. La NMX-F-165-S-1978 establece que la margarina es un producto elaborado por la emulsificación líquida o plástica de grasas animales o vegetales con leche o agua. Dentro de la panadería existen dos tipos de margarina una es destinada para pasteles y otra para pan, las que son utilizadas en la elaboración de pan son significativamente más duras y elásticas en comparación a las destinadas a pastelería, por lo que son excelentes para el proceso de rolado y la formación de capas en productos elaborados con masa danesa (Gisslen, 2013).

En general los ingredientes utilizados en la elaboración del pan son perecederos y para el caso de la masa danesa la cantidad de grasa utilizada juega un papel importante en la vida de anaquel del producto terminado debido a que con la exposición a luz y temperatura esta tiende a oxidarse ocasionando el rechazo por el consumidor, es por eso que en la industria de panificación y de alimentos son elaborados modelos para determinar el periodo de tiempo en el que deben consumir los productos.

2.3 Vida de anaquel

El pan es un alimento muy complejo debido a sus características fisicoquímicas, sin embargo el deterioro del producto comienza desde su salida del horno con la retrogradación de almidones, a los cambios como la pérdida de humedad en la miga, ablandamiento de la corteza y cambios de sabor a través del tiempo y es denominado “envejecimiento del pan”. Aunado a esto debido a que es un sistema rico en carbono y nitrógeno es susceptible al deterioro por hongos, levaduras y bacterias, por lo que en la industria alimentaria ha recurrido al uso de aditivos como retardadores en el envejecimiento y el uso de conservadores sintéticos (Salgado & Jimenez, 2012).

La vida de anaquel es el periodo de tiempo después de la producción del alimento en condiciones controladas, durante este periodo el producto tendrá pérdida de propiedades sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas. Este tiempo de vida es influenciado por la materia prima, el proceso y las condiciones sanitarias durante este, envasado, almacenamiento y prácticas de los consumidores. Existen métodos para prolongar la vida de anaquel de los alimentos, estos métodos son basados principalmente en modelos matemáticos y procesos de aceleración en los cuales se somete al alimento a cambios de temperatura en periodos cortos de tiempo, uno de los modelos más conocidos es el Factor Q_{10} , este es derivado de la ecuación de Arrhenius. También existen otros métodos que son encaminados a predecir la cantidad de microorganismos que crecen en el alimento en cierto periodo de tiempo con lo que se puede calcular la fecha de consumo preferente. La mayoría de los métodos y tecnologías para la preservación de los alimentos son guiados a la inhibición de la carga microbiológica debido a que esta puede influir en los aspectos fisicoquímicos y sensoriales del producto, así como causar enfermedades a los consumidores (Carrillo & Reyes, 2007).

3. Bacterias

3.1 Dominio bacteria

Los microorganismos que están dentro de este dominio son descritos como células procariotas con una amplia diversidad morfológica y fisiológica, las cuales tienen importancia médica, ambiental y alimenticia ya que dependiendo de sus características son clasificadas como benignas o patógenas para la salud humana, así como ayudar a sintetizar algunos desechos o subproductos de procesos industriales para convertirlos en productos reutilizables (Madigan *et al.*, 2010). Dentro de las bacterias que destacan en la tecnología de alimentos son encontradas las bacterias ácido lácticas ya que juegan un papel importante debido a su uso en productos lácteos, principalmente en las fermentaciones, de igual forma algunos metabolitos como las bacteriocinas han sido empleadas como antimicrobianos alternativos para preservar la vida de anaquel de diferentes productos (Parra, 2010). Aunque han sido empleados varios microorganismos en la industria alimentaria y existen reportes que no tienen efectos negativos en la salud de los consumidores de dichos productos, algunas bacterias pueden ser perjudiciales debido a que son causantes de diversas infecciones o enfermedades derivadas del consumo de alimentos contaminados.

3.2 Importancia de las bacterias en alimentos

Existen varias formas de interpretar la presencia de los microorganismos en los alimentos, una de ellas es desde el punto de vista toxicológico, es decir, hablando de ellos como contaminantes que causan el deterioro del producto y que si es consumido puede causar desde síntomas como vómito, diarrea hasta enfermedades como salmonelosis, diarrea del viajero o causar daños severos en el sistema inmunológico.

Otra forma de abordarlos es como auxiliares en procesos para la elaboración de alimentos, un ejemplo de esto es el uso de las bacterias ácido lácticas (BAL) las que son utilizada para la fermentación de productos lácteos como el yogurt o quesos, en la fermentación de vegetales como en el sauerkraut o kimchi que son ricos en probióticos ayudando así al organismo, las BAL también son usadas en la industria de la panificación, con ellas es elaborada la masa madre o sourdough obteniendo un producto de corteza firme, con un ligero sabor ácido. Por otro lado las BAL también son aplicadas en la preservación de los alimentos debido a que los metabolitos secundarios de éstas pueden inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en los productos alimenticios, un ejemplo de esta acción es la nisina, bacteriocina que es excretada por *Lactococcus lactis*, la nisina es efectiva contra bacterias Gram positivas protegiendo a productos lácteos y cárnicos de *C. botulinum*, *B. cereus* y *L. monocytogenes* (DiCagno *et al.*, 2016). Para poder determinar que bacterias son benéficas y dañinas para los alimentos y el ser humano es necesario realizar una identificación a nivel colonial y celular de los microorganismos, debido a la constante investigación de estos organismos han sido desarrolladas diferentes técnicas de identificación y hoy en día existe la opción de hacerla por medio del material genómico que con el apoyo de otras técnicas nos da un panorama más confiable del tipo de cepa.

3.3 Identificación de bacterias

Debido a la necesidad de conocer las características de los microorganismos y así poder clasificarlos en categorías han sido realizados diversos estudios para medir de forma cualitativa y cuantitativa éstas características a nivel celular y en la formación de colonias, éstas pruebas pueden ir desde lo más sencillo como observar la forma de la célula, pasando a diversas tinciones y pruebas bioquímicas hasta la identificación de la cepa por medio del 16S rARN y de PCR.

3.3.1 Morfología celular

Para poder observar las células es necesario el uso de un microscopio óptico, con esto es posible distinguir seis formas para bacterias:

- Cocos: Corresponden a células esféricas u ovoides que forman agrupaciones como: diplococos, tétradas y sarcinas entre otras agrupaciones.
- Bacilos: Son células de forma cilíndrica que pueden formar diplobacilos o cadenas denominadas estreptobacilos.
- Espirilos: Bacilos que son curvados en forma de espiral
- Espiroquetas: Son una agrupación de bacterias que forman cadenas largas que asemejan la forma de un sacacorchos
- Bacterias con apéndices: Estas tienen una protuberancia o hinchamiento en un extremo formando tubos o tallos.
- Filamentosas: Células largas que forman cadenas delgadas, asemejando un poco a las hifas no septadas (Black *et al.*, 2012).

3.3.2 Tinciones

Existe una variedad de tinciones las cuales pueden aplicarse dependiendo de lo que se esté buscando en cuanto a la célula, como ejemplo, las tinciones simples en las cuales la bacteria es teñida de un solo color a la bacteria, son utilizadas para observar la forma de la célula, por otro lado las tinciones compuestas en las cuales dos o más tintes son aplicados para clasificar las bacterias dependiendo de características especiales, también hay tinciones positivas en las cuales la célula es coloreada en un fondo claro y negativas en las cuales es usado en un fondo oscuro para observar las estructuras celulares (Jácome *et al.*, 2014).

- Tinción Gram: Esta tinción está relacionada con la composición de la pared celular de la bacteria, según esta distinción es posible clasificarlas en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas.

- Gram positivas: La pared celular está compuesta por capas de peptidoglicano lo cual permite la retención de tinte cristal-violeta después de la decoloración con acetona dando a la célula un color azul intenso o púrpura.
- Gram negativas: las bacterias que entran en esta clasificación son caracterizadas por tener una membrana externa con lipopolisacáridos por lo que no son capaces de retener el cristal violeta y sólo son coloreados con la safranina la cual otorga un color rojo.

3.3.3 Morfología colonial

La morfología colonial es derivada de la celular ya que corresponde a las características que forma la agrupación de células o biomasa tomando en cuenta los siguientes aspectos:

- Forma de la colonia: Delimitada por los bordes y espesor, los cuales le dan formas como circular, puntiforme, irregular, rizoide y fusiforme.
- Bordes: Describe la delimitación de la colonia celular, considerándose como entero, ondulado, lobulado y filamentoso.
- Elevación: Hace alusión a la forma que adquiere el espesor de la colonia, clasificando en plana, convexa y elevada la cual es como una semiesfera.
- Superficie: Es la percepción visual que tiene la colonia; lisa, rugosa o plegada.
- Consistencia: Al realizar una recolección con asa bacteriológica la colonia puede ser seca, viscosa, filamentosa o viscosa.
- Color: Esta percepción puede darse de diferentes formas, ya que las colonias tienden a comportarse diferente dependiendo del medio de cultivo y si éste posee algún colorante como indicador.

- Características ópticas
 - Luz transmitida: Al observar a través de la colonia, si no permite el paso de luz es considerada opaca, translúcida si permite el paso de luz pero no hay distinción objetos a través de ella y transparente si es que se pueden ver objetos a través de ella.
 - Luz reflejada: Determinada al observar la superficie de la colonia dividiéndola en opaca o brillante.

Con estas características morfológicas es posible comenzar a agrupar la colonia en algún género de bacterias por medio de la comparación con las morfologías reportadas en la bibliografía sin embargo es necesario realizar otro tipo de pruebas para tener certeza en la identificación (Ingraham & Ingraham, 2004).

3.3.4 Pruebas bioquímicas

Este tipo de ensayos surgen debido a que las bacterias presentan reacciones metabólicas las cuales son catalizadas por enzimas, las que son clasificadas como endoenzimas y exoenzimas dependiendo del lugar del ambiente celular, para poder identificarlas son empleadas las pruebas bioquímicas las cuales abarcan desde la fermentación de azúcares a la reducción de nitratos. Un ejemplo de estas son las (API) fabricadas por bioMerieux las cuales permiten identificar a bacterias de forma específica o a las pertenecientes a un género.

3.3.5 Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)

Las bacterias han sido clasificadas por sus características como la forma de la célula, capacidad de fermentación, existencia de organelos como los flagelos, sin embargo, estas no aportan datos sobre su ascendencia genómica, es por eso que se realiza la comparación de secuencias del 16S rARN con las que es posible relacionarlas a nivel taxonómico. La PCR ayuda a la creación de n número de copias de determinada región de ADN, para lograr esto es necesaria la enzima Taq Polimerasa e iniciadores específicos para la región de interés así como

buffers y cofactores para estabilizar la reacción, la PCR consta de ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del material genómico (Yanagihara *et al.*, 2011).

Los ciclos a son repetidos de 25 a 35 veces en un termociclador para lograr una cantidad significativa de copias de ADN:

Desnaturalización (96°C): la reacción es calentada para separar, o desnaturalizar, las cadenas de ADN. Esto proporciona cadenas en las cuales actuaran los iniciadores para comenzar a crear las copias.

Emparejamiento (55 - 65°C): la reacción es enfriada para que los iniciadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla.

Extensión (72°C): la temperatura de la reacción sube para que la Taq polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN.

Posterior a la reacción los resultados obtenidos son visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa, en esta técnica la corriente eléctrica impulsa los fragmentos de material genético por la matriz del gel y estos son separados por su tamaño originando la presencia de bandas visibles debido a un colorante que se aplica antes de llevar a cabo la electroforesis. Por medio de esta técnica, en conjunto con la identificación morfológica y pruebas bioquímicas la identificación de microorganismos es más acertada por lo cual es probable acercarse a la determinación de la especie de interés así como las medidas que deben seguirse para su uso o como combatirla en caso de ser patógena.

3.4 Principales bacterias contaminantes en alimentos

El dominio bacteria es dividido en diferentes taxones dependiendo de sus características, en alimentos, una de las familias más importante en cuanto a la contaminación es *Enterobacteriaceae*, aunque organismos pertenecientes a esta

familia están de forma común en el tracto gastrointestinal también pueden ser causantes de infecciones que derivan en enfermedades dependiendo de la capacidad de patogenia de la especie y las características del hospedero siendo las más comunes *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Yersina pestis* y *Serratia marcescens* (Famiglietti *et al.*, 2005). También pueden encontrarse algunas otras especies causantes de enfermedades en humanos, estas dependerán del alimento y el estado en el que se encuentre el producto ya que debido a la composición nutrimental, a_w , humedad, temperatura y oxígeno por lo que presentaran cierta afinidad por un tipo de alimento en específico, como ejemplos: algunas cepas de *Staphylococcus* que pueden ser encontradas en huevo, leche o sus derivados, cepas de *Listeria spp.* que son encontradas principalmente en productos de origen animal y cepas del género *Bacillus* o *Lactobacillus* que se encuentran en lácteos o productos elaborados con cereales (Parayre *et al.*, 2007).

3.4.1 Deterioradores de productos de panificación

Las principales alteraciones causadas por microorganismos en el deterioro del pan son causadas por la presencia de hongos y bacterias, teniendo en menor escala el deterioro por levaduras, los principales géneros y especies de cada clase son encontrados en la tabla 2. En el caso de los hongos el crecimiento depende de la temperatura, la concentración de oxígeno en el empaque y la contaminación previa al empaquetado (Nobile *et al.*, 2003), el crecimiento de los hongos es acelerado si es empacado antes de que el producto esté completamente frío debido a la generación de vapor que aumenta la humedad en el medio en que se encuentra. El enmohecimiento comienza con la aparición de manchas sobre la superficie del producto mostrando coloraciones amarillentas, grisáceas o completamente oscuras (Stanley, 2007).

Tabla 2. Microorganismos deterioradores de pan

Bacterias	Hongos	Levaduras
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Asperillus flavus</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Hansenula anomala</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Debaromyces hanseii</i>
<i>Bacillus firmus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Endomyces fibuliger</i>
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Zygsaccharomyces rouxi</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Penicillium custrosum</i>	<i>Pichia burtonii</i>
	<i>Penicillium roqueforti</i>	
	<i>Rhizopus</i>	
	<i>Fusarium</i>	
	<i>Mucor</i>	
	<i>Eurotium</i>	
	<i>Cladosporium</i>	

El crecimiento bacteriano es favorecido por climas cálidos y con una humedad de entre 40% a 60%, es percibido por un olor dulce afrutado, una degradación enzimática de la miga por parte de proteasas y amilasas excretadas por las bacterias convirtiéndola en una masas suave y pegajosa con cambios de coloración (Pepe *et al.*, 2003). Así mismo el crecimiento de bacterias en el pan puede verse influenciado por las materias primas, ha sido reportada la prevalencia de cepas de *Staphylococcus* en leche y huevo, el agua también puede estar contaminada por enterobacterias y la manipulación inadecuada del producto pueden ser las causas de la contaminación bacteriana.

Actualmente el uso de conservadores de origen natural como antioxidantes, aceites esenciales o metabolitos secundarios de bacterias ha sido incursionado en la industria alimentaria es por eso que están en constante búsqueda de fuentes botánicas ricas en biocompuestos o que tenga un uso medicinal. Los principales productos que son utilizados son plantas, frutos con alto contenido en antioxidantes como arándanos, blueberry o aquellos que tienen capacidad antiinflamatoria como los cítricos y especias. También los biocompuestos son encontrados en fuentes poco convencionales como en tubérculos y raíces, dentro de estos aparece la papa roja *Oxalis tuberosa* que es fuente de carbohidratos, hierro, calcio y antioxidantes.

4. Papa roja (*Oxalis tuberosa*)

La papa es uno de los cuatro cultivos más importantes a nivel mundial y existen diferentes variedades propagadas, la región andina es el lugar de origen de varios tubérculos, entre los cuales aparece la papa roja (*Oxalis tuberosa*) (Cajamarca, 2010). La papa roja pertenece a la familia *Oxalidaceae*, la planta puede medir de 20 a 40 cm de altura, su pigmento va desde el verde en la parte superior hasta el ojo en la parte inferior (Rosero, 2010). Los tubérculos miden de 5 a 15 cm de longitud, no tienen una forma definida, algunos son cilíndricos y otros en forma de ovalo, con protuberancias o yemas por todo el cuerpo (Figura 2). Estos tubérculos van desde el color blanco pasando por amarillo, rosa, rojo, morado y en algunos casos los pigmentos son concentrados tanto que pueden dar una tonalidad negra (Pomar, 2002).



Figura 2. Papa roja *Oxalis tuberosa*

Pertenece a los denominados “tubérculos menores” nombre obtenido debido a que su producción no es significativa. Dentro de estos tubérculos la papa roja resalta ya que en la región Andina es el segundo tubérculo más cultivado detrás de la papa blanca (*Solanum tuberosa*) sin embargo no hay registros de su producción. En México la papa roja fue introducida hace 200 años por el intercambio entre la cultura azteca e inca (Hernández *et al.*, 2004), es consumida de forma natural o en preparaciones básicas, su sabor es agridulce no solo por su contenido de antioxidantes, sino también debido a su concentración de oxalatos (Pérez, 2009).

4.1 Composición nutrimental

Es considerada como fuente de carbohidratos, calcio y hierro por lo que es usada como remedio para el alivio de úlceras cutáneas y la recuperación post parto (Chirinos *et al.*, 2009).

La composición nutrimental cambia dependiendo del estado de la papa ya que al secarse al sol hay una reducción en la concentración de ácido oxálico y un aumento de los componentes descritos en la Tabla 3. La papa roja también es rica en proteínas mostrando similitud con los aminoácidos encontrados en la carne siendo la mayoría aminoácidos azufrados. La coloración característica de la *Oxalis tuberosa* es otorgada por los polifenoles y antocianinas en la pulpa y cáscara del tubérculo las cuales aparte de brindar coloración atribuyen características antioxidantes a la papa (Kita *et al.*, 2013).

Chirinos *et al.*, (2009) realizaron una caracterización del perfil antioxidante de la *Oxalis tuberosa* por medio de HPLC, detectando que los compuestos fenólicos presentes son ácido cafeico, vinílico, cinámico, flavonas, flavonoles y antocianinas siendo la principal la malvidina.

Tabla 3. Composición nutrimental de *Oxalis tuberosa*

Parámetros (%)	Fresca	Secado al sol
Humedad	80.1	51.0
Ceniza	3.9	4.3
Azúcares totales	14.1	36.4
Azúcares reductores	4.7	21.1
Azúcares no reductores	9.4	15.6
Fibra	0.8	3
Proteína	1.1	5.3
Ácido oxálico (mg/100g)	135	72
Ácido ascórbico (mg/100g)	187.19	65.34

4.1.1 Antioxidantes

A las moléculas capaces de prevenir o retardar la oxidación de compuestos biológicos, como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, son denominados antioxidantes, estos son clasificados en enzimáticos (como catalasa, glutatión reductasa, entre otras) y no enzimáticos que corresponden a ácidos fenólicos, flavonoides, algunas vitaminas y compuestos orgánicos (Espín, *et al.*, 2007).

4.1.1.1 Compuestos fenólicos

Están formados por un anillo aromático unidos a uno o más grupos hidroxilo (La Cueva, 2010). Constituyen la mayoría de los antioxidantes naturales y son extraídos de cultivos agrícolas, hortícolas y plantas medicinales. Las clases que destacan son tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos (ácido gálico, elágico, ferúlico) (Naczk & Shahidi, 2006).

4.1.1.2 Flavonoides

Son formados a partir de aminoácidos aromáticos (tirosina y fenilalanina) y malonato, la clasificación es dada por el nivel de oxidación y la substitución de radicales en el anillo C, de las diferentes clases las de mayor interés son flavones, flavanonas, isoflavonoides, flavonoles y antocianinas. Estos compuestos son encontrados en frutas, vegetales, nueces, granos y algunas especias (Pietta, 2000).

4.1.1.3 Antocianinas

Son pigmentos hidrosolubles responsables de la coloración de algunos alimentos, están compuestas por una molécula de antocianidina unida a un azúcar por enlaces β -glucosídicos (Aguilera *et al.*, 2011). Se conocen aproximadamente 20 antocinidinas, siendo las más importantes cianidina, petunidina y malvidina. El color de las antocianinas depende de factores intrínsecos como la posición de los grupos flavilio y los sustituyentes químicos que contenga, la coloración azul es otorgada por el aumento de grupos hidroxilo y el rojo por los grupos metaoxilo. Al pasar por el tracto digestivo las antocianinas permanecen intactas, proporcionando beneficios al organismo como la reducción de enfermedades coronarias, actúan como antiinflamatorio, anticancerígeno y antitumorales, estas propiedades son atribuidas a la actividad antioxidante. En alimentos ha sido comprobada una alta capacidad contra radicales libres como peróxidos (ROO.), superóxido (O_2), hidroxilo (-OH) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2), (Kim *et al.*, 2009).

5. Justificación

El consumo de productos de panificación en México asciende a 34 Kg per cápita, dentro de los cuales entre el 70-75% corresponde a pan blanco y el 25 - 30% a pan dulce. Estos productos son susceptibles al deterioro provocado por microorganismos lo que puede repercutir en la salud del consumidor y causar pérdidas económicas, para retardar el crecimiento de microorganismos no deseados en el pan ha sido implementado el uso de conservadores a nivel industrial y semi-industrial, sin embargo, la creciente demanda de la población por consumir productos sin agentes sintéticos ha llevado a la industria a utilizar antimicrobianos naturales como aceites esenciales o compuestos antioxidantes que en los últimos años se ha demostrado que tienen efecto inhibitorio en microorganismos que son dañinos para la salud.

En el año 2002 un estudio realizado con papa *Oxalis tuberosa* mostró que el tubérculo posee propiedades antimicrobianas, además de mostrar una alta capacidad antioxidante, en el estado de Hidalgo la papa roja es consumida de forma regular durante los meses de noviembre a febrero, siendo muy apreciada la pulpa del tubérculo para la elaboración de platillos dulces y salados. En 2016, fue demostrado que la mayor parte de compuestos con poder antimicrobiano son localizados en la cáscara de la papa; con el presente trabajo de investigación se desea evaluar el efecto antimicrobiano de la cáscara de papa roja (*Oxalis tuberosa*) para extender la vida de anaquel de productos de panificación.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de extractos de cáscara de papa roja *Oxalis tuberosa* sobre la vida de anaquel de productos de panificación dulce por medio de ensayos *in vitro* con bacterias aisladas de pan tipo danés e *in vivo* aplicando el extracto en pan.

6.2 Objetivos Específicos

1. Aislar bacterias deterioradoras de productos de panificación con técnicas microbiológicas e identificarlas por medio de técnicas fenotípicas (morfología colonial y celular) y genéticas (secuenciación del 16S rARN).
2. Determinar efecto antibacteriano de extractos de *Oxalis tuberosa* (base de etanol, hexano y acetona) en bacterias deterioradoras de productos de panificación.
3. Medir la capacidad antioxidante de los extractos de harina de cáscara de papa roja *Oxalis tuberosa* por medio de los métodos DPPH EC₅₀, ABTS⁺ y la cuantificación de fenoles totales.
4. Seleccionar un extracto de *Oxalis tuberosa* para su aplicación en pan dulce tipo danés de acuerdo al rendimiento, actividad antimicrobiana y capacidad antioxidante.
5. Aplicar el extracto antibacteriano en pan dulce y determinar los cambios fisicoquímicos (cambios de color, textura, a_w y actividad antioxidante) durante un periodo de almacenaje, mediante análisis de perfil de textura, color, actividad de agua e índice de rancidez, cuantificación de fenoles totales, DPPH EC₅₀ y ABTS₊.
6. Evaluar la capacidad antimicrobiana del extracto durante el periodo de almacenamiento realizando conteo de hongos, levaduras y coliformes totales.

7. Materiales y Métodos

7.1 Obtención de *Oxalis tuberosa* y elaboración de harina

La papa roja (*Oxalis tuberosa*) fue adquirida del mercado local de Acaxochitlán Hidalgo, ubicado en las coordenadas 20°09'30"N 98°12'08"O. Para la obtención de harina, la papa fue seleccionada y lavada para su posterior pelado, para el secado la cáscara fue colocada en bandejas y llevada a un horno (Luckie San Juan) a temperatura constante de 55°C por 24 h (Sahu *et al.*, 2016). Las hojuelas de cáscara obtenidas fueron molidas en un molino para especias (Krups Spice grinder GX4100), la harina pasó por un tamiz de malla (Tyler No. 40-425) y almacenada en recipientes herméticos a temperatura ambiente hasta su uso.

7.2 Obtención de extracto de *Oxalis tuberosa*

El extracto fue obtenido con tres solventes distintos, los cuales corresponden a etanol y acetona al 100% y hexano al 95%. Para la obtención de los extractos fue realizada una extracción directa (Figura 3), la cual consta de una solución en relación 1:1 de harina de papa roja con el solvente correspondiente, esta fue macerada y refrigerada a 4°C durante 48 h, posteriormente filtrada, el sobrenadante fue almacenado en frascos ámbar a 4°C, el residuo obtenido fue macerado nuevamente con el mismo solvente a las mismas condiciones (Gyawali *et al.*, 2015)

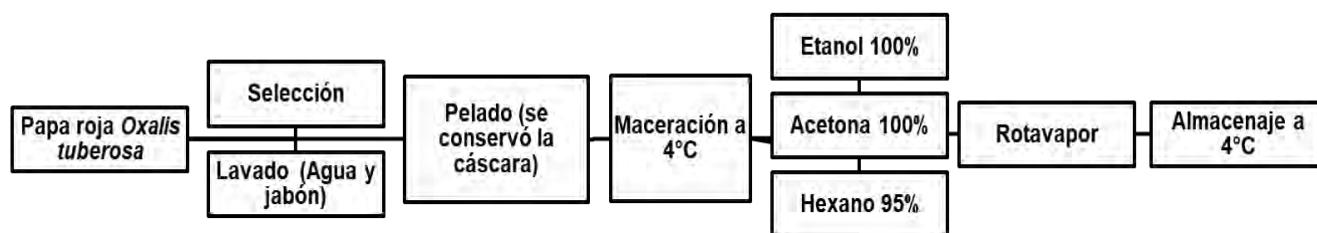


Figura 3. Proceso de extracción de cáscara de *Oxalis tuberosa*

Para la eliminación parcial del solvente fue utilizado un rotavapor (Büchi. Modelo: R-215) con las condiciones indicadas en la Tabla 4 y la eliminación total del solvente fue en parrilla de calentamiento (Thermo Fisher) a 50°C.

Tabla 4. Condiciones para eliminación parcial en rotavapor

Solvente	Temperatura (°C)	Refrigerante (°C)	Presión (mbar)
Hexano	35	-5	125
Acetona	35	-5	190
Etanol	35	-5	43

7.3 Aislamiento de microorganismos

Con el fin de conocer la carga bacteriana, de mohos y levaduras fue realizado el conteo y aislamiento de microorganismos deterioradores de productos de panificación, la muestra fue un pan dulce tipo danés en una panadería local de Tulancingo Hgo., tras un periodo de almacenamiento de 30 días a temperatura ambiente y en bolsa de polipapel, con 10 g de muestra fueron realizadas las diluciones seriadas base 10 con agua peptonada, utilizando las diluciones: -2, -4, -6 y -8 para la siembra. Los medios de cultivo fueron: Agar nutritivo (AN) para el conteo general de bacterias, papa dextrosa (PDA) utilizado para hongos y levaduras, Mc Conkey (MC) que muestra la presencia de enterobacterias, Sal y Manitol (SM) en el que crecen *Staphylococcus* y *Streptococcus* y por último medio Man Rogosa Sharpe (MRS) para bacterias ácido lácticas.

Para el medio MRS la inoculación fue efectuada por medio de la técnica de vertido en placa con 1 mL de las diluciones, mientras que para AN, PDA, MC y SM fue la técnica de barrido en placa con asa Drigalski en forma de L, las placas fueron llevadas a una incubadora (ThermoScientific) a 28°C y los conteos de unidades formadoras de colonias (UFC) fueron realizados a las 24, 48 y 72 h. Posterior a las 72 h las colonias que presentaron diferencias morfológicas fueron sembradas en los medios de cultivo de procedencia por la técnica de estría cruzada, repitiéndose hasta obtener un cultivo puro, a las colonias seleccionadas y purificadas se les realizó tinción Gram, prueba catalasa y morfología colonial.

7.4 Identificación de bacterias por 16S rARN

La identificación del 16S rARN fue efectuado a las 10 bacterias aisladas por medio de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), para realizar la técnica fue necesaria la obtención, cuantificación y replicación de cadenas de ADN.

- Obtención de ADN: Para la extracción de ADN fue utilizado el kit DNeasy Blood & Tissue, que consta de una serie de buffers y enzimas que liberan el DNA, de un cultivo axénico fue tomada una muestra, vertida en un tubo eppendorf con 1mL de agua estéril, la solución fue llevada a centrifugación a 7500 rpm por 10 min, el sobrenadante es desechado y el pellet re-suspendido en 175 µL de buffer Tris 10 mM-EDTA 1mM (TE), 5µL de lisozima (100mg/mL) y 180 µL de buffer Animal Tissue Lysis (ATL) llevándolo a incubación a 37°C por 30 min. Posteriormente fueron agregados 25 µL de proteinasa K y 200 µL de buffer Animal Lysis (AL) sin etanol con la ayuda de un vortex, la solución fue homogeneizada e incubada en baño maría a 56°C de 6 a 8 h, tras dicho periodo fueron agregados 200 µL de etanol. La solución fue traspasada a una columna DNAeasy minispin y centrifugada a 8,000 rpm por un minuto, el sobrenadante es desechado, fueron añadidos 500 µL de Animal Wash Buffer 1 (AW1) tras la centrifugación la misma cantidad de Animal Wash Buffer 2 (AW2) y por último 200 µL de Animal Elution Buffer (AE) para poder conservar el material en refrigeración.

- Cuantificación de DNA: de las muestras mencionadas anteriormente fueron tomados 2µL y la lectura de la absorbancia fue realizada en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, si las muestras presentaban 50ng/mL de material genómico y una absorbancia de 1.5-2.0 con una longitud de onda de λ 260-280 el material genómico podía ser usada para la realización de PCR.
- PCR: el DNA obtenido y cuantificado fue usado para la reacción de PCR en la cual fueron mezclados 5µL de DNA, 5µL de buffer incluido en el kit Go Taq Flexi de Promega, 4 µL de MgCl₂ del mismo kit, 1µL de DNTP's, 1µL del iniciador 27F, 1 µL del iniciador 1492R y 0.25µL de Taq polimerasa, la solución fue llevada a un termociclador Eppendorf, Mastercycler epgradient S con las condiciones descritas en la Tabla 5 repitiendo el ciclo 35 veces, durante este proceso son realizados cambios en las cadenas de ADN como son el rompimiento, alineación, extensión y replicación del material genómico.

Tabla 5. Condiciones de termociclador

1	93°C	3 min
2	94°C	1 min
3	56°C	1 min
4	72°C	2 min
5	72°C	10 min
6	4°C	-

- Electroforesis en gel de agarosa: el gel fue preparado con 70 mL de buffer Tris Borato EDTA (TBE) 1X, 1.05g de agarosa y 0.1µL de bromuro de etidio, el gel es formado en un molde con peine para 14 muestras y una vez

que está sólido es cubierto con TBE y las muestras de ADN son cargadas en los pozos formados con un buffer indicador y un marcador de peso molecular, la electroforesis se efectuó a una potencia de 75 V por 45 min.

- Purificación del DNA: utilizando el kit Wizard Genomic DNA purification, que consta de soluciones para lavar membranas, el gel que contiene las bandas de DNA el material genómico fue disuelto y recolectado en un tubo el cual fue almacenado a -20°C , el DNA recolectado fue enviado a Microgene Korea y a LANGEBIO CINVESTAV para su secuenciación y posterior comparación con los bancos genéticos Genbank y EZTAXON.

7.5 Determinación de efecto antimicrobiano y concentración mínima inhibitoria

Para determinar si los extractos poseían un efecto antibacteriano fueron realizados ensayos microbiológicos utilizando las bacterias aisladas previamente, los medios de cultivo AN, MRS, MC y SM fueron inoculados por medio de barrido en agar con hisopo estéril con una concentración de 1×10^8 CFU/mL cubriendo completamente la superficie de la placa, discos estériles de papel filtro quedaron impregnados con los extractos a diferentes concentraciones (1:2, 1:10, 1:50, 1:100) colocándolos sobre la superficie del agar previo a la incubación, ésta fue a 28°C por 72 h, la lectura del halo de inhibición fue cada 24 h tomando en cuenta el diámetro del disco, como control positivo fue utilizada penicilina bajo las mismas condiciones de los extractos y agua estéril como control negativo (CLSI, 2012)

Con base a los resultados obtenidos fue elegido el extracto con mayor efecto contra bacterias tomando en cuenta la concentración que presenta los primeros indicios de inhibición para que a partir de esa concentración se realicen las diluciones necesarias con la finalidad de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

7.6 Contenido de fenoles totales en los extractos

La metodología a seguir fue utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu modificando las cantidades de los reactivos. Las muestras fueron preparadas colocando 1.58 mL del extracto diluido (0.158 g/mL de EH, 0.0022 g/mL de EA, 0.0013 g/mL de Ee) en tubos de vidrio, adicionando 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, mezclando con la ayuda de un vortex, después de la homogeneización pasaron a un periodo de reposo de 6 min, tras este periodo fueron añadidos 300 μ L de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20% y fue reposada por un período de 15 min a 50°C finalmente realizando la lectura en un espectrofotómetro (OPTIMA SP-3000 nano) a 765 nm (Singleton *et al.*, 1965). Los resultados obtenidos fueron expresados en equivalentes de ácido gálico, para lo que fue realizada una curva de calibración preparando una solución de ácido gálico a una concentración de 20 μ g/mL y haciendo diluciones en concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5, 2.5 y 5 mg/L (Ramos, 2014).

7.7 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH, EC_{50}

Siguiendo la técnica propuesta por Brand-Williams *et al.*, (1995), en la cual el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo fue diluido en metanol al 80 % hasta obtener una solución 0.1 mM, para la curva patrón fueron realizadas diluciones a concentraciones de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 nM por 10 mL de solvente para medir la absorbancia a 517 nm y así estabilizar el radical.

Para la medición de la actividad antioxidante del extracto fueron utilizados 2 mL de la solución de DPPH 0.1 mM y añadiendo 0.05 mL del extracto previamente obtenido con lectura de absorbancia a 517 nm cada 10 min en un período de 60 min, midiendo el porcentaje de inhibición, 50% para considerar un efecto antioxidante (Paulin, 2016).

7.8 Capacidad antioxidante por el radical ABTS⁺

La actividad antioxidante fue determinada por la inhibición del radical 2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) siguiendo la metodología de Reyes *et al.*, (2009). Para acondicionar el radical fue preparada una solución del reactivo ABTS⁺ a una concentración 7 mM, mezclándola con 13.2 mg de K₂S₂O₈ al 2.45 mM, tras un reposo en oscuridad de 16-20 h la absorbancia fue determinada en espectrofotómetro a 732 nm hasta conseguir 0.7 nM, una vez estandarizada la solución procede a la lectura en espectrofotómetro. Para la lectura de los extractos fueron necesarios 1450 µl de la solución de ABTS y 50 µl de los extractos diluidos, la reacción fue efectuada en oscuridad total y la absorbancia tomada a los 30 min. Los resultados fueron comparados con una curva de calibración de Trolox (Re *et al.*, 1999).

7.9 Elaboración de pan dulce y diseño de tratamientos

Para aplicar el extracto de *Oxalis tuberosa* que presentó mayor capacidad antibacteriana y antioxidante en un modelo alimenticio, fue elaborado un producto de panificación de la variedad dulce, utilizando masa danesa. La formulación utilizada para el producto es la descrita en la tabla 6, la metodología a seguir incluye la incorporación de ingredientes a excepción de la materia grasa, ya que esta fue incorporada por la técnica de rolado para obtener la multicapa característica de los productos elaborados con masa danesa, esta fue doblada (figura 4), extendida y vuelta a doblar, repitiendo el proceso de 3 a 7 veces (Gisslen, 2013). La masa fue envuelta con papel film y comenzó el periodo de fermentación por 30 min, después de la fermentación siguió la formación del pan, el cual será tipo rol, por lo que fue realizada una mezcla de margarina y azúcar la cual fue extendida a lo largo de la masa y una vez extendida fue enrollada y cortada aproximadamente a 7 cm de grosor para seguir con el proceso de levado por 20 minutos. El pan fue barnizado con una mezcla de huevo-leche y horneado a 180°C por 15 minutos.

Tabla 6. Formulación de masa danesa

Ingrediente	Porcentaje panadero (%)
Harina	40.98
Huevo	9.84
Levadura	1.23
Azúcar	8.20
Sal	0.82
Leche	10.25
Agua	8.20
Margarina	28.25

Se realizaron tres grupos de evaluación los cuales son el grupo control (PC) al cual le fue agregado 7 mL de almíbar simple (solución 10% sacarosa) , mientras que al grupo con extracto (PE) le fueron agregados 7 mL de una solución agua-extracto a un pan de 30 g, la cantidad de extracto utilizado corresponde a la CMI máxima encontrada para las cepas aisladas que corresponde a 0.33 mg/mL utilizando un total de 2.21 g de extracto por muestra, por último al grupo con inóculo (PI) le fueron incorporados 7 mL de solución agua-extracto, más una carga aprox. de 1×10^6 de cepas de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amiloquefaciens*. Los tratamientos fueron almacenadas en bolsas de celofán durante 30 días.

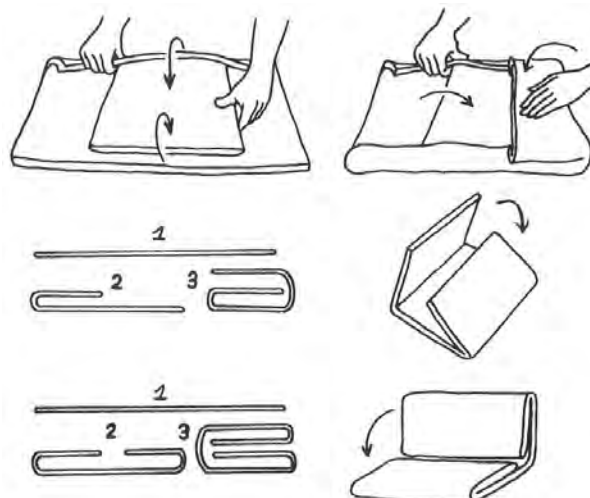


Figura 4. Doblado de masa danesa (Gisslen, 2013)

7.10 Determinación de carga microbiológica

Para comprobar la efectividad del extracto en el pan fueron efectuados análisis microbiológicos modificando la NOM 111 y 112 (1994) con respecto a los medios de cultivo a utilizar. La norma dictamina que la metodología a seguir es la maceración de 10 g de muestra en agua estéril siendo utilizados los tratamientos PC, PE, PI respectivamente, con el sobrenadante de la maceración son realizadas diluciones seriadas base 10 utilizando: -2, -4, -6 y -8 y son sembradas en placas con medio AN, SM, MC, MRS y PDA, las placas fueron incubadas a 28°C realizando conteos a las 24, 48 y 72h, el muestreo fue realizado a los días 1, 7, 14, 21 y 28 del periodo de almacenaje realizando la prueba por triplicado

7.11 Índice de peróxido

La metodología establece que 1 mL de tiosulfato de sodio 0.01 N representa 80 µg de O₂ y que el índice de peróxido corresponde a la cantidad de microgramos de oxígeno activo en un gramo de sustancia (Budryn *et al.*, 2013). Fueron elaboradas soluciones de tiosulfato de sodio 0.01 N; ácido acético y cloroformo (3:2) en la proporción de tres volúmenes de ácido acético glacial, por dos de cloroformo; solución saturada de yoduro de potasio recientemente preparada, disolución indicadora de almidón. Posteriormente fueron pesados 5 g de la grasa obtenida del pan por medio de extracción en frío con hexano, agregándoles 20 mL de disolución de ácido acético-cloroformo y 1 mL de yoduro de potasio la mezcla fue agitada seguida de un periodo de reposo de 15 min protegiendo de la luz, finalmente fueron agregados 25 mL de agua destilada, en agitación suave, la valoración fue realizada con Na₂S₂O₃ hasta obtener un color amarillo, 5 mL de solución de almidón fueron agregados mostrando un cambio de color a azul oscuro, por ultimo continuó la valoración hasta el vire de color crema (Ramos, 2014).

7.12 Análisis de Perfil de Textura (APT)

Para monitorear los cambios de textura del pan durante el periodo de almacenaje se realizó el Análisis de Perfil de Textura (APT) por medio del texturómetro marca Brookfield, en el cual se colocó la muestra (tratamientos PC, PE y PI) y fue comprimida por medio de la Sonda 36 de aluminio, al 20% de deformación con una celda de carga de 4.5Kg a una velocidad de 1mm/s. La prueba consta de dos compresiones las cuales son reportadas por medio de una curva típica (Figura 5) que representa los parámetros a evaluar, para el caso de esta investigación los parámetros fueron: dureza, cohesividad, adhesividad, masticabilidad y elasticidad (Zhu *et al.*, 2016).

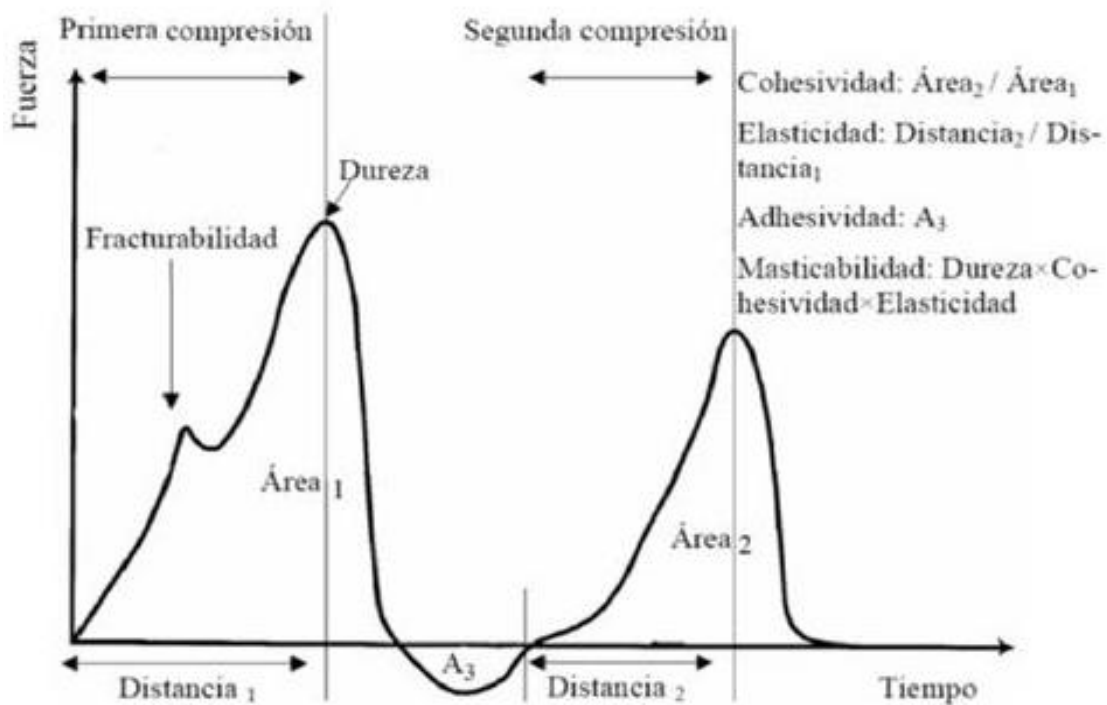


Figura 5. Curva típica de APT

7.13 Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua está íntimamente ligada a la proliferación de microorganismos en los productos de panificación, para la evaluación de a_w fue necesaria una muestra de aproximadamente 2 g la cual estuvo conformada por la miga y corteza del pan, fue utilizado el equipo HygroPalm AW-1, la muestra fue colocada en un vial (WP-40), llevada a un periodo de reposo por 10 min a 23°C y traspasada a la sonda AW-DIO para la lectura de la muestra (Budryn *et al.*, 2013).

7.14 Determinación de color

El color de los tratamientos PC, PE y PI fue determinado a través de los parámetros L^* , a^* y b^* , el parámetro L representa el coeficiente de luminosidad (negro= 0 a blanco= 100) y las coordenadas a^* b^* determinan el color, para a^* las tonalidades van de rojo (positivas) a verde (negativas) y para b^* amarillo (positivas) a azul (negativas). Fue utilizado un colorímetro Minolta modelo 508d, que utiliza el sistema internacional CIELAB con iluminante C y un ángulo observador de 10°. Fueron tomados tres puntos diferentes de la superficie del pan registrando los valores de L^* , a^* y b^* , para calcular la cromaticidad (C^*) y el ángulo de matiz (h°), (Pérez Portuondo, 2012).

7.15 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, los resultados de vida de anaquel fueron evaluados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y si hubo diferencias significativas entre las medias fue empleado el método *Tukey* para compararlas utilizando un nivel de significancia $p < 0.05$, con el paquete estadístico SPSS Statistics y los gráficos fueron realizados con el software Sigma Plot.

8. Resultados y Discusión

8.1 Obtención de harina de *Oxalis tuberosa*

La tabla 7 muestra el balance de materia para la obtención de harina de papa roja, iniciando con 86.32 kg la *Oxalis tuberosa* fue seleccionada y pelada resultando 9.43 kg de cáscara y tras el secado un total de 3 kg de harina que representa el 3.5% del total de la papa inicial, esta harina fue utilizada para la elaboración de los extractos antibacterianos con distintos solventes de extracción.

Al ser la papa roja un producto de temporada es necesario emplear un método de conservación para tener disponibilidad de la materia prima, así mismo ha sido demostrado que el secado reduce el contenido de oxalatos en la papa los cuales son nocivos para la salud (Jimenez *et al.*, 2015), mientras que los compuesto bioactivos son concentrados durante el proceso, no obstante el calentamiento materia para lograr la deshidratación no debe exceder los 100-120 °C ya que al sobrepasar los límites comienza una serie de cambios estructurales y fisicoquímicos afectando la capacidad antioxidante de los productos (Dorta *et al.*, 2012), ya que el secado de la muestra fue realizado a 50°C se espera que los compuestos no presenten reducción de la capacidad antioxidante.

El rendimiento de la harina es comparable con el de Ramos (2014) quién obtuvo el 2.97% de rendimiento de harina de cáscara de papa roja, el rendimiento de esta investigación es mayor probablemente por la forma de tratar la materia prima o por perdidas durante la molienda. Existen pocos trabajos que van enfocados solo a la cáscara del producto, en su mayoría la harina obtenida corresponde a la parte almidonosa de tubérculo teniendo rendimientos mayores al 50% no obstante la mayor concentración de biocompuestos yacen en la cáscara por lo que con la finalidad de estudiar una posible aplicación la cáscara fue utilizada.

Tabla 7. Balance de materia para la obtención de harina

	kg	%
Papa roja fresca	86.32	100
Papa roja seleccionada	85.71	98.99
Cáscara de papa roja fresca	9.43	11.00
Cáscara papa roja seca	3.05	3.56
Harina de papa roja	3.00	3.50

8.2 Obtención del extracto antibacteriano

En la tabla 8 son presentados los valores obtenidos tras la maceración, eliminación parcial del solvente en rotavapor y el concentrado en parrilla de calentamiento. Fue obtenido un total de 0.98 g para el extracto de Hexano (EH), 0.96 g para el de acetona (EA) y 6.08 g para el de etanol (Ee), lo que representa el 0.49%, 0.48% y 3.04% respectivamente para cada extracto.

Tabla 8. Rendimiento de extracción

Extracto	Sobrenadante (mL)	Eliminación de Solvente (g)	Extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)
EH	465	2.87	0.98	0.49±0.006 ^a
EA	415	7.61	0.96	0.48±0.08 ^a
Ee	450	24.86	6.08	3.04±0.06 ^b

^{a, b} representan diferencias significativas $p > 0.05$


El rendimiento de los extractos EA y EH es significativamente menor ($p < 0.05$) que el de Ee, esto probablemente a la polaridad del solvente, ha sido demostrado en diversas investigaciones que el etanol junto con el metanol y agua logran extraer una mayor cantidad de biocompuestos de fuentes vegetales según la cantidad de grupos $-OH$, tiempo de contacto, tamaño de partícula y relación masa-solvente (Soto & Rosales, 2016) en relación al etanol la acetona y hexano poseen menor polaridad por lo estos pueden ser inadecuados para los compuestos que son encontrados en la cáscara de papa roja. En el caso de los extractos obtenidos, según la composición química de las antocianinas que consta de una aglicona unida a un azúcar por medio de enlaces β -glucosídicos (Aguilera *et al.*, 2011), la polaridad del etanol es capaz de extraer con mayor eficiencia los compuestos bioactivos en comparación a la acetona y hexano, es por eso que su rendimiento es mayor

En cuanto al aspecto de los extractos (Figura 6), EA y Ee tienen un color rojizo mientras que EH es de color amarillo, esto se explica por los compuestos bioactivos de arrastre por los solventes utilizados, en el caso del hexano el color amarillo lo confieren las grasas así mismo su manipulación es difícil ya que es insoluble en agua, mientras que para EA y Ee la presencia de compuestos glucosilados y la antocianinas pueden brindar el color rojo, así mismo EA y Ee presentan mayor solubilidad comparado con EH.



Figura 6. Extractos de cáscara de *Oxalis tuberosa*

EH: Extracto con Hexano; EA: Extracto con Acetona; Ee: Extracto con Etanol



Alara *et al.*, (2018) reportan que el rendimiento de extracción depende directamente de la concentración del solvente y la polaridad de este, los autores realizaron extractos de *Vernonia amygdalina* con diferentes porcentajes de etanol, en el 100% de etanol obtuvieron un rendimiento de 17.34 ± 0.11 g/g, ellos atribuyen este rendimiento a la solubilidad de carbohidratos, proteínas y compuestos semi polares.

Al comparar con los resultados de este trabajo el rendimiento del extracto de etanol (Ee) es menor al obtenido por Alara (2009), el investigador aplicó temperatura al momento de la extracción por lo que su rendimiento fue del 7.25%, este resultado tiene que ver con la materia prima utilizada y la temperatura de extracción, ya que la que el autor realiza fue a 45°C mientras que la de este trabajo de investigación fue a 4°C , esto para no afectar la estructura de los flavonoides y sus derivados ya que al someterse a altas temperaturas la estructura de los anillos de los antioxidantes puede desestabilizarse y convertirse en chalcona lo cual disminuye la capacidad antioxidante.

En 2017 Gullón *et al.* elaboraron extractos con hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) utilizando etanol, metanol y agua como solventes a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos, ellos encontraron que con una concentración de etanol al 80 % a 50°C por 300 min puede obtenerse un rendimiento de 35.7 % sin embargo la temperatura y el tiempo de exposición afectaron de forma negativa la medición de la capacidad antioxidante, en la presente investigación no es utilizada una temperatura elevada para la extracción para no afectar la capacidad antioxidante del extracto, y debido a esto el rendimiento es menor al encontrado por los autores, sin embargo, vale la pena obtener un bajo rendimiento sin disminuir las propiedades funcionales del extracto.

8.3 Aislamiento de microorganismos

La cantidad de microorganismos hallada en el pan danés comercial (tabla 9) fue de 10.68 log UFC/mL para la carga bacteriana, en general el valor fue obtenido de Agar nutritivo (AN), este resultado da un panorama general debido a que no es un medio selectivo y contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de varios tipos de bacterias, en el medio Mac Conkey (MC) fue hallada una carga de 10.73 log (UFC/mL), este medio tiene los nutrimentos para bacterias Gram negativas e inhibe a las Gram positivas, en Man Rogosa Sharpe (MRS) fueron contabilizados 7.80 log (UFC/mL) en el cual crecen bacterias ácido lácticas principalmente, el conteo de hongos y levaduras (medio PDA) fue de 9.52 log (UFC/mL) y por último en Sal y Manitol (SM) una carga de 9.67 log (UFC/mL) en general estos resultados muestran que el producto tiene una alta cantidad de microorganismos debido al periodo de almacenamiento y a la manipulación previa a este.

Tabla 9. Carga microbiológica en pan comercial

Medio de cultivo	Carga log(ufc/mL)
AN	10.68± 0.052
MC	10.73±0.032
MRS	7.80±0.025
PDA	9.52±0.031
SM	9.67±0.021

Tras obtener un cultivo axénico (siendo descartadas las colonias con similitudes) quedaron 10 bacterias aisladas, tres de medio nutritivo (AN) codificándolas con; ANB1, ANB3, ANB5, tres más encontradas en medio McConkey (MC) con un código: MCB1, MCB2, MCB5, tres en medio sal y manitol (SM) denominadas SMB3, SMB5, SMB6 y por ultimo una hallada en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) nombrada MRS, la observación de las características celulares de las bacterias aisladas son presentadas en la tabla 10, las bacterias Gram negativas que son las tres del medio MC y las otras 7 son Gram positivas, las del medio SM presentaron forma de cocos mientras que las demás fueron bacilos y sólo MCB1 fue catalasa negativo.

En la tabla 11 son mostradas las características morfológicas tras la observación de las colonias formadas, en MC los colorantes rojo neutro y cristal violeta dan la coloración a las colonias MCB1 y MCB2 debido a la capacidad de fermentación de carbohidratos.

Tabla 10. Morfología celular y pruebas bioquímicas en colonias halladas

	Morfología Celular		
	Tinción Gram	Catalasa	Forma
ANB1	+	+	Bacilo
ANB3	+	+	Bacilo
ANB5	+	+	Bacilo
MRS	+	*	Bacilo
SMB3	+	+	Coco
SMB5	+	+	Coco
SMB6	+	+	Coco
MCB1	-	-	Bacilo
MCB2	-	+	Bacilo
MCB5	-	+	Bacilo

Tabla 11. Características morfológicas en colonias bacterianas encontradas

Morfología Colonial								
	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Luz T.	Luz R.
ANB1	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Creмоса	Blanco	Opaca	Opaca
ANB3	Circular	Entero	Plana	Lisa	Creмоса	Crema	Traslúcida	Brillante
ANB5	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Creмоса	Crema	Opaca	Brillante
MRS	Irregular	Filamentoso	Elevada	Plegada	Membranosa	Blanco	Traslúcida	Brillante
SMB3	Circular	Entero	Plana	Lisa	Membranosa	Crema	Opaca	Brillante
SMB5	Circular	Entero	Plana	Lisa	Membranosa	Crema	Opaca	Brillante
SMB6	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Membranosa	Amarilla	Opaca	Brillante
MCB1	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Morada	Opaca	Opaca
MCB2	Puntiforme	Ondulado	Plana	Lisa	Creмоса	Rosa	Traslúcida	Brillante
MCB5	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Café	Opaca	Brillante

Luz T: Luz transmitida; Luz R: Luz reflejada

Para el caso de las bacterias SMB3, SMB5 y SMB6 que son aisladas de medio sal y manitol en el que crecen bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* las aisladas en este trabajo son consideradas del género *Staphylococcus* debido a que son catalasa positivas contrario a los *estreptococos* que son catalasa negativos (Tabla 11).

Las cepas de la tabla 12 corresponden a la identificación por medio del 16S rARN, y la comparación con bancos de datos, las cepas aisladas de agar nutritivo y la de MRS corresponden a bacterias del género *Bacillus*, las cuatro cepas son representativas de los deterioradores comunes de productos de panificación, éstas degradan la miga debido a la acción de las amilasas y proteasas que son liberadas por estos microorganismos (Vaičiulytė-Funk *et al.*, 2015).

En agar McConkey fueron aisladas *E.coli* y *Klebsiella* que dan un panorama de las prácticas de manufactura en la panadería local y de la exposición que tiene el producto al público, también fue aislada *Providencia rettgeri* que es asociada con la diarrea del viajero y gastroenteritis ya que es un enteropatógeno encontrado principalmente en el colon y puede ser transmitido por contacto directo con un huésped o por la ingesta de alimentos que hayan sido manipulados por un hospedero sin las medidas de higiene necesarias (Yoh, *et al.*, 2005). Estos microorganismos son nocivos para el ser humano ya que pueden causar diarreas y vómitos al ser consumidos en grandes cantidades, sin embargo la NOM-247-SSA1-2008 para cereales y productos derivados permite 20 UFC/g de coliformes totales La presencia de *P. rettgeri* no es común en los alimentos sin embargo han sido encontrados casos donde se reporta su incidencia en agua contaminada por heces, como un patógeno que aparece en quemaduras de piel y frecuentemente es asociada con infecciones oculares (Maiti *et al.*, 2013) debido a estos reportes es de suponer que la presencia de este patógeno no es solo por malas prácticas de manufactura, sino también por el posible contacto del producto con personas que portaban la cepa en la piel por infecciones cutáneas sin cuidado médico.

En el caso de las bacterias aisladas del medio SM fueron encontradas dos cepas (*S. succinus*, *S. epidermis*) comunes en la microbiota de la piel tanto de animales como de humanos y es posible que la muestra de pan haya sido contaminado por la manipulación del personal o de los consumidores de la tienda, sin embargo la cepa que causa alerta en esta identificación es *S. saprophyticus* que es un patógeno de las vías urinarias afectando principalmente a niños, personas de la tercera edad y aquellas que padecen diabetes (Obaidat, 2017).

Tabla 12 Identificación de bacterias aisladas por la técnica 16S rARN

	Cepa
ANB1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
ANB3	<i>Bacillus subtilis</i>
ANB5	<i>Bacillus cereus</i>
MCB1	<i>Escherichia coli</i>
MCB2	<i>Providencia rettgeri</i>
MCB5	<i>Klebsiella oxytoca</i>
MRS	<i>Bacillus velenzis</i>
SMB3	<i>Staphylococcus succinus</i>
SMB5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SMB6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

8.4 Determinación del efecto antibacteriano

Utilizando una concentración aproximada de 1×10^6 UFC/mL de bacterias del género *Bacillus* para inocular cajas Petri con los medios AN, MC, MRS, SM. El extracto de hexano, sólo presentó efecto contra bacterias Gram positivas aisladas de agar nutritivo (Tabla 13) , a partir de la dilución 1:10 comienzan a aparecer halos de inhibición mayores al diámetro del papel filtro (0.5 cm) siendo *B. subtilis* la más susceptible a estas condiciones mostrando un halo de 1 cm de diámetro, para una concentración más alta (1:2) *B. amyloliquefaciens* resultó con la mayor susceptibilidad y tuvo un halo de diámetro de 2.03 cm, estos resultados no son comparables con los del control positivo (C+) ya que para la penicilina hubo inhibición en todas las bacterias el halo más bajo fue de 0.6 cm para *E. coli* y el más grande para *B. subtilis* con 4.63 cm. El bajo poder de inhibición que tiene este extracto puede ser debido a los biocompuestos que son obtenidos con el hexano, como ya se había mencionado antes, el hexano sirve para obtener principalmente grasas de los productos alimenticios y es posible que la inhibición de las cepas del género *Bacillus* sea debido a algunos ácidos grasos con actividad microbiológica (Walter *et al.*, 2011).

En el extracto donde fue utilizada acetona como solvente los resultados obtenidos (Tabla 14) son más favorables a comparación con los obtenidos con hexano, ya que la acción inhibitoria comienza a mostrarse a partir de la concentración 1:50 y actúa contra bacterias Gram positivas y negativas, en esta dilución *B. velenzis* tiene un halo de 1.03 cm mientras que *B. amyloiquefaciens*, *B. subtilis* y *E. coli* apenas pasan los 0.6 cm de diámetro, al elevar la concentración a 1:2 la única cepa en la que no hubo efecto fue en *Klebsiella*, en los *Staphylococo* fue obtenido un diámetro de 0.60 cm lo que y en las demás el halo sobrepasa 1.03 cm de inhibición, los resultados de EA son similares a los del C+ incluso para las bacterias aisladas de SM ya que ha sido demostrado que algunos *estafilococos* son resistentes a la penicilina.

Por último el extracto de etanol presento el mejor efecto de los tres, ya que mostró inhibición para Gram negativas y positivas (Tabla 15) a partir de la concentración 1:50 teniendo un diámetro de 0.60 cm y al aumentar a 1:2 todos los halos de inhibición pasaron 1.1 cm, los resultados de Ee pueden ser comparados con algunos de C+ sin embargo con la penicilina los *bacilos* son más susceptibles.

Una posible explicación de que Ee muestre mejores resultados tiene que ver con la polaridad del solvente, el hexano es utilizado generalmente para extraer compuestos no polares por ejemplo grasas, mientras que la acetona presenta mayor afinidad a compuestos polares y pueden ser extraídos algunos compuestos antioxidantes los que pueden actuar dañando la membrana celular y retrasando o interrumpiendo procesos metabólicos causando la muerte de la bacteria. La acetona como solvente ha sido ampliamente usada debido a su capacidad de extraer compuestos polares y no polares, agregado a que su separación de biocompuestos es relativamente fácil y rápida ya que también se considera un compuesto volátil. El etanol es el solvente más polar de los tres utilizados y es capaz de extraer compuestos glucosilados, según la composición de las antocianinas la antocianidina (aglicona) está unida a un carbohidrato es por eso que es más fácil extraerlas con etanol que con los otros solventes y por ende el efecto antibacteriano tiende a aumentar a comparación de los otros dos.

Weerakkody *et al.*, (2010) experimentaron con extractos elaborados con hierbas y especias utilizando solventes como agua, etanol y hexano probándolos contra bacterias Gram positivas y negativas, al igual que el presente trabajo el extracto con hexano muestra menor eficacia contra las bacterias, sin embargo ellos aumentan la concentración utilizada y comienzan a obtener resultados positivos. En el presente trabajo no fue realizado un aumento de concentración ya que la finalidad es elegir un extracto que sobresalga aplicando las mismas condiciones para los tres, por otra parte al aumentar la concentración utilizada se aumenta la materia prima (harina de *Oxalis tuberosa* y solvente) por lo que se vuelve un producto poco viable.

Tabla 13. Actividad antibacteriana para el extracto de hexano

	EH					
	C+ (cm)	C-	1:2 (cm)	1:10 (cm)	1:50 (cm)	1:100 (cm)
<i>B. cereus</i>	1.66±0.12 ^{aC}	NAI	1.33±0.12 ^{aB}	0.83±0.12 ^{bA}	0.67±0.06 ^{bA}	0.63±0.06 ^{bA}
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3.93±0.12 ^{aA}	NAI	2.03±0.15 ^{bA}	0.86±0.12 ^{cA}	NAI	NAI
<i>B. subtilis</i>	4.63±0.35 ^{aA}	NAI	1.17±0.25 ^{bB}	1.00±0.10 ^{bA}	NAI	NAI
<i>B. velenziz</i>	3.40±0.17 ^{aB}	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
<i>S. succinus</i>	1.93±0.21 ^{aC}	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
<i>S. epidermis</i>	1.77±0.06 ^{aC}	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
<i>S. saprophyticus</i>	1.13±0.23 ^{aC}	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
<i>E. coli</i>	0.60±0.01 ^{aC}	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
<i>P. rettgeri</i>	1.37±0.15 ^{aC}	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
<i>K. oxytoca</i>	3.43±0.21 ^{aB}	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI

^{a, b, c} Representan diferencias significativas (p<0.05) de la misma cepa en las distintas diluciones. ^{A, B, C} representan diferencias significativas (p<0.05) de la misma dilución sobre las bacterias aisladas. NAI: No presenta actividad inhibitoria; C+: Control positivo con penicilina; C-: Control negativo con agua destilada estéril.

Tabla 14 Efecto antibacteriano para extracto con acetona

	EA					
	C+ (cm)	C-	1:2 (cm)	1:10 (cm)	1:50 (cm)	1:100 (cm)
<i>B. cereus</i>	2.40±0.10 ^{aA}	NAI	1.03±0.15 ^{bB}	0.67±0.06 ^{bB}	NAI	NAI
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2.93±0.12 ^{aA}	NAI	1.17±0.15 ^{bB}	0.63±0.06 ^{cB}	0.63±0.06 ^{cB}	0.60±0.01 ^{cB}
<i>B. subtilis</i>	1.73±0.06 ^{aB}	NAI	1.23±0.38 ^{aB}	0.67±0.06 ^{bB}	0.63±0.06 ^{bB}	0.60±0.01 ^{bB}
<i>B. velenziz</i>	2.13±0.15 ^{aAB}	NAI	1.13±0.15 ^{bB}	0.90±0.10 ^{bA}	1.03±0.15 ^{bA}	1.07±0.21 ^{bA}
<i>S. succinus</i>	0.60±0.01 ^{aC}	NAI	0.60±0.01 ^{aC}	0.60±0.01 ^{aB}	NAI	NAI
<i>S. epidermis</i>	0.60±0.01 ^{aC}	NAI	0.60±0.01 ^{aC}	0.60±0.01 ^{aB}	NAI	NAI
<i>E. coli</i>	2.10±0.10 ^{bAB}	NAI	3.03±0.15 ^{aA}	1.10±0.10 ^{cA}	0.63±0.06 ^{dB}	NAI
<i>P. rettgeri</i>	0.87±0.12 ^{bC}	NAI	2.80±0.30 ^{aA}	NAI	NAI	NAI
<i>K. oxytoca</i>	3.43±0.21 ^{aA}	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI

^{a, b, c} Representan diferencias significativas ($p < 0.05$) de la misma cepa en las distintas diluciones. ^{A, B, C} representan diferencias significativas ($p < 0.05$) de la misma dilución sobre las bacterias aisladas. NAI: No presenta actividad inhibitoria; C+: Control positivo con penicilina; C-: Control negativo con agua destilada estéril.

Tabla 15 Efecto inhibitorio para el extracto con etanol

	Ee					
	C+ (cm)	C-	1:2 (cm)	1:10 (cm)	1:50 (cm)	1:100 (cm)
<i>B. cereus</i>	1.83 ± 0.25 ^{aB}	NAI	1.85±0.06 ^{aA}	0.67 ± 0.1 ^{bB}	0.60±0.01 ^{bA}	NAI
<i>B. amyloliquefaciens</i>	4.07 ± 0.42 ^{aA}	NAI	1.70 ± 0.1 ^{bA}	0.60±0.01 ^{cB}	0.60±0.01 ^{cA}	0.60±0.01 ^{cA}
<i>B. subtilis</i>	4.63 ± 0.35 ^{aA}	NAI	1.17±0.25 ^{bB}	1.00±0.10 ^{bA}	0.60±0.01 ^{cA}	NAI
<i>B. velenzis</i>	4.13 ± 0.06 ^{aA}	NAI	1.87 ± 0.06 ^{bA}	0.60±0.01 ^{cB}	0.60±0.01 ^{cA}	NAI
<i>S. succinus</i>	1.96 ± 0.15 ^{aB}	NAI	1.70 ± 0.1 ^{aA}	0.60±0.01 ^{bB}	0.60±0.01 ^{bA}	0.60±0.01 ^{bA}
<i>S. epidermis</i>	1.77 ± 0.06 ^{aB}	NAI	1.60±0.01 ^{aB}	0.60±0.01 ^{bB}	0.60±0.01 ^{bA}	0.60±0.01 ^{bA}
<i>S. saprophyticus</i>	1.13±0.23 ^{bC}	NAI	1.76±0.01 ^{aA}	0.60±0.01 ^{cB}	0.60±0.01 ^{cA}	0.60±0.01 ^{cA}
<i>E. coli</i>	1.03 ± 0.15 ^{bC}	NAI	1.90±0.01 ^{aA}	0.60±0.01 ^{bB}	NAI	NAI
<i>P. rettgeri</i>	2.53 ± 0.12 ^{aB}	NAI	1.90±0.0 ^{aA}	0.60±0.01 ^{bB}	0.60±0.01 ^{bA}	NAI
<i>K. oxytoca</i>	2.17 ± 0.15 ^{aB}	NAI	1.85±0.01 ^{aA}	0.60±0.01 ^{bB}	0.60±0.01 ^{bA}	0.60±0.01 ^{bA}

^{a, b, c} Representan diferencias significativas (p<0.05) de la misma cepa en las distintas diluciones. ^{A, B, C} representan diferencias significativas (p<0.05) de la misma dilución sobre las bacterias aisladas. NAI: No presenta actividad inhibitoria; C+: Control positivo con penicilina; C-: Control negativo con agua destilada estéril.

En la investigación realizada por Elisha *et al.*, (2017) fueron utilizadas hierbas medicinales y acetona como solvente para la elaboración de extractos contra bacterias como *E.coli*, *S. aureus*, *E. fecalis*, *B. cereus*, *S. tiphy* y *P. aeruginosa*, al igual que en esta investigación, las bacterias G. positivas muestran sensibilidad a concentraciones bajas atribuyéndose a la intervención que tienen los compuestos fenólicos en la célula bacteriana.

En 2011 Walter *et al.*, realizaron extractos con semillas de *Moringa oleífera* y *Moringa stenopetala*, ellos encuentran actividad antibacteriana contra *S. tiphy* y *V. cholera*, en la investigación la actividad es atribuida a los aceites de la semilla, estos en el tracto digestivo actúan como adherentes a la mucosa del intestino por lo que la infección no se propaga. En el presente trabajo de investigación no es utilizada una semilla y el contenido de grasa o extracto etéreo en la papa roja es de 0.47 g/100g (León *et al.*, 2011), tal vez por esto la efectividad contra las bacterias disminuye.

Existen pocos estudios reportados de la actividad antimicrobiana de la *Oxalis tuberosa* sin embargo, en 2002 Flores *et al.*, lograron aislar la fracción protéica representativa del tubérculo y probaron su efecto antibacteriano y antifúngico, ellos no encontraron un efecto para cepas del género *Bacillus*, *Escherichia* o *Streptomyces*, sí encontrando efecto contra *Pseudomonas*, *Serratia* y *Agrobacterium*, caso contrario a lo que fue encontrado en este trabajo para las cepas de *Bacillus*, esto puede ser debido a que en el caso de los extracto el efecto inhibitorio es por los compuestos bioactivos y en la investigación realizada por Flores, los autores trabajan con un aislado proteico por lo que el mecanismo de acción puede ser diferente.

8.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Con base en los resultados del efecto inhibitorio fue determinada la CMI de los extractos y de penicilina para utilizarla como control (Tabla 16), para el extracto las bacterias Gram negativas *E. coli*, *P. rettgeri* y *K. oxytoca* mostraron la mayor concentración para inhibir el crecimiento (0.33 mg/mL), mientras que para penicilina estos mismos microorganismos expresaron la menor concentración (0.18 mg/mL), sin embargo, el extracto con 0.18 a 0.33 mg/mL asemeja la efectividad del antibiótico de 0.20 y 0.30 mg/mL en las bacterias asiladas de sal y manitol, ya que muchas especies de *Staphylococcus* son resistentes a este antibiótico. La capacidad de inhibición de los extractos es atribuida a la cantidad de antioxidantes que poseen, ya que ha sido reportado que estos compuestos tienen diferentes vías para la muerte de microorganismo causando principalmente un daño al metabolismo de la célula.

El efecto de los antioxidantes puede considerarse como bacteriostático que es descrito como la respuesta de los microorganismos a las sustancias que interrumpen el metabolismo celular, lo que deriva en que la bacteria no pueda dividirse y la carga bacteriana no incrementa y eventualmente la célula no puede seguir produciendo energía para sobrevivir entrando en fase de latencia y con el paso del tiempo la célula muere (Carson *et al.*, 2002).

La presencia de compuestos bioquímicos como fenoles, aldehídos y monoterpenos son ejemplos de actividad bacteriostática, estos actúan con mayor fuerza en bacterias Gram positivas por lo que las concentraciones de aceites esenciales o extractos de origen natural tienden a ser menores para actuar con estas cepas, si bien su uso también es aplicado contra Gram negativas las concentraciones utilizadas pueden ser mayores (Mayaud *et al.*, 2008).

Tabla 16. CMI del extracto de etanol y penicilina

Cepa	Ee mg/mL	Penicilina mg/mL
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.33	0.20
<i>B. subtilis</i>	0.27	0.20
<i>B. cereus</i>	0.27	0.20
<i>B. velenzisi</i>	0.22	0.18
<i>S. succinus</i>	0.18	0.20
<i>S. epidermis</i>	0.27	0.30
<i>S. saprophyticus</i>	0.33	0.30
<i>E. coli</i>	0.33	0.18
<i>P. rettgeri</i>	0.33	0.18
<i>K. oxytoca</i>	0.33	0.18

8.6 Cuantificación de fenoles totales en los extractos

En la tabla 17 son encontrados los resultados para la cantidad de fenoles en los extractos, para cada uno de ellos fue utilizada una concentración diferente debido al contenido de antioxidantes, para EH fue encontrado un contenido de 0.030 mgEAG/mg a una concentración de 158 g/L, para EA un total de 5.37 mgEAG/mg a la concentración de 2.21 g/L mientras que para Ee fueron obtenidos 9.23 mgEAG/mg utilizando 1.26 g/L.

Como había sido mencionado el hexano no fue el solvente ideal para la extracción de antioxidantes y esto es reflejado en la cantidad de fenoles para EH ya que de los tres extractos es el de menor contenido con mayor concentración de materia utilizada, una vez más Ee posee los mejores resultados siendo necesaria una concentración baja para obtener 9.23 mg equivalentes de ácido gálico.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de fenoles son similares con los obtenidos por Song *et al.* (2010) quienes evaluaron la actividad antioxidante de 56 hierbas medicinales originarias de China, obteniendo valores semejantes al extracto con etanol (9.23 mgEAG/mg) para las plantas *Bambusa breviflora* y *Cinnamomun cassia* tienen un contenido de 9.03 y 9.71 mgEAG/g respectivamente mientras que *Morus alba L.* es similar al extracto de acetona con 5.34 mg EAG/g, probablemente este parecido se deba a que las antocianinas y algunos compuestos derivados de los flavonoides se encuentran dispersos en el citoplasma o empaquetados en antocianoplastos (antocianinas) un mecanismo similar al que sucede con los cloroplastos y compuestos bioactivos en las hojas (Aguilera *et al.*, 2011).

Tabla 17. Cuantificación de fenoles totales en los extractos

Tratamiento	Fenoles Totales mgEAG/mg
EH	0.030±0.004 ^a
EA	5.37±0.011 ^b
Ee	9.23±0.07 ^c

a, b, c representan diferencias significativas $p > 0.05$ entre los tratamientos

8.7 DPPH, EC₅₀

Los resultados para el radical DPPH son mostrados en la figura 7, en ella puede observarse que el tratamiento EH no alcanza el 50% de inhibición del radical por lo que no fue determinada la concentración mínima (EC₅₀), para los tratamientos EA y Ee si fue obtenida la inhibición del 50% del radical por lo que fueron probadas las concentraciones de 0.012, 0.016, 0.20 y 0.24 g/mL para ambos extractos en la determinación del EC₅₀, en EA al inicio de la cinética es posible obtener un 55% de inhibición de DPPH a los 30 min puede observarse el 62% y al termino un máximo de 71.24%, con la ayuda de un modelo matemático fue obtenido el valor del EC₅₀ para EA que es de 0.0227 g/mL .

Por otra parte Ee tiene una concentración de 0.0129 g/mL el extracto logra la reducción del 55.41% del radical a los 10 min, muestra una tendencia a incrementar este valor y a los 30 min alcanza el 70%, por ultimo a los 60 min un máximo de 76.74% de inhibición.

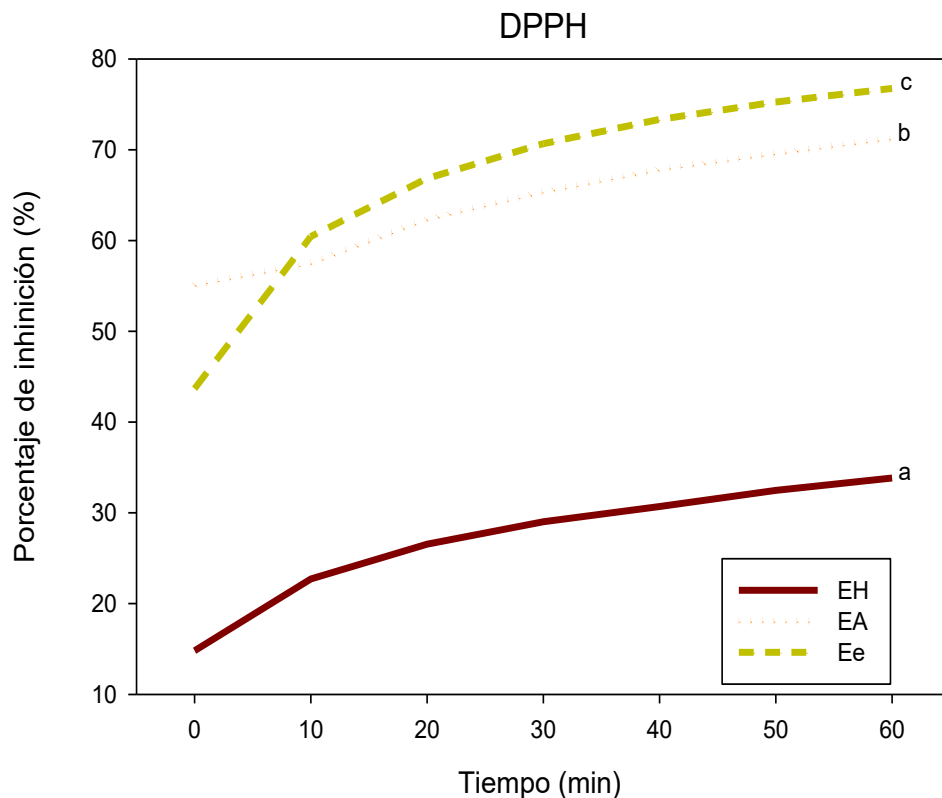


Figura 7. Cinética de inhibición de DPPH

Ha sido reportado que el método DPPH es más selectivo que ABTS debido que no reacciona con los flavonoides que no presentan el grupo –OH en el anillo B (Roginsky & Lissi, 2003) el cual puede encontrarse en las antocianinas, que de acuerdo a lo reportado por Chirinos *et al.*, (2009) constituyen en su mayoría a los antioxidantes que se encuentran en la cáscara de *Oxalis tuberosa*, la fracción representativa de las antocianinas en la papa roja es la malvidina, que corresponde a una antocianina no polar. Seeram y Muraleedharan, (2001) mencionan que la actividad antioxidante depende de la sustitución y el grado de sustituyentes del grupo hidroxilo, aunado a esto la unión de las antocianinas a azúcares hace que al aplicar un solvente polar como el alcohol la extracción de estos compuestos sea más eficaz lo cual puede ser la causa de una mayor actividad antioxidante en el extracto Ee.

8.8 Inhibición del radical ABTS⁺

Todos los concentrados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) que son mostrados en la tabla 18, con el tratamiento EH es alcanzado un 28.29% de inhibición del radical lo cual al compararse con la curva patrón de Trolox equivale a 311 mg, una vez más EH tiene menor actividad que los tratamientos EA y Ee. En EA fue logrado el 55.52 % de reducción de ABTS⁺ lo que equivale a 692.3 mg de Trolox, mientras que el tratamiento Ee inhibe el 62.48% del radical siendo el equivalente a 789.6 mg de Trolox como ya en los resultados anteriores el extracto de etanol contiene mayor cantidad de compuestos bioactivos, entre ellos son encontrados antioxidantes que tienen la capacidad de estabilizar o reducir el radical.

El radical ABTS⁺ muestra afinidad por compuestos hidrosolubles y liposolubles lo cual lo hace interactuar con compuestos glucosilados y con ácidos grasos, es por eso que EH tiene una inhibición de casi el 30% del radical, sin embargo debido a los compuestos bioactivos extraídos con etanol y acetona hay un mayor porcentaje de inhibición en EA y Ee.

En relación a los resultados de fenoles cuantificados hay similitudes a los resultados debido a que el de menor contenido es EH seguido por EA y Ee posee la mayor cantidad de EAG, los fenoles están relacionados con la capacidad antioxidante del producto, cabe mencionar que no significa que entre mayor cantidad sea mejor, sino que tiene que ver con los compuestos bioactivos y la forma en la que reaccionan con radicales libres.

En el trabajo de investigación realizado por Thaipong *et al.*, (2006) utilizaron metanol para extraer compuestos de semilla de guayaba, los resultados que obtuvieron muestran un máximo de 410.95 mg Eq. de Trolox, mientras que en esta investigación con Ee fueron obtenidos 789.6 mg Eq. de Trolox, esta diferencia puede ser debido a la materia prima y la parte de donde se extrajeron los compuestos, ya que generalmente la cáscara de los frutos contiene una mayor cantidad de antioxidantes como medio de protección contra factores ambientales y protección a las semillas en las que hay enzimas y el material genético para la proliferación de la planta.

Muthukrishnan y Manogaran (2018) evaluaron la capacidad antioxidante de la planta *Vetiveria zizanioides*, los autores utilizaron como solventes metanol, etanol, acetona y agua destilada. El extracto que tuvo mejor resultado en cuanto al contenido de fenoles y capacidad de estabilización del radical ABTS⁺ fue el de etanol, los resultados en cuanto al solvente de extracción son similares al presente trabajo sin embargo *Vetiveria zizanioides* tiene un máximo de 160 mg Eq. de Trolox, mientras *Oxalis tuberosa* quintuplica esa cantidad con 789 mg Eq. de Trolox, probablemente esto tiene que ver con el método de extracción, los autores utilizan el método Soxhlet donde hay una alza en la temperatura y ha sido reportado que los compuestos antioxidantes son termolábiles lo que causa que su estructura sea afectada reduciendo la capacidad para donar electrones a radicales libres, en esta investigación la extracción es realizada en frío y la eliminación del solvente es llevada a cabo en temperaturas que no afectan la estructura de los compuestos bioactivos.

Tabla 18. Actividad antioxidante de los extractos contra el radical ABTS⁺

Tratamiento	Eq. trolox (mg)	% de inhibición
EH	311.0±0.98 ^a	28.29±1.0 ^a
EA	692.3±0.83 ^b	55.52±0.82 ^b
Ee	789.6±0.45 ^c	62.48±0.43 ^c

a, b, c representan diferencias significativas $p > 0.05$ entre los tratamientos

8.9 Análisis microbiológicos

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 19, para los medios de cultivo MC y SM no hubo crecimiento bacteriológico durante el periodo de almacenamiento lo cual difiere de la muestra de pan comercial evaluada previamente para el aislamiento de microorganismos, ratificando que la aparición de cepas de estos medios es debido a la contaminación durante el proceso de elaboración y la manipulación post horneado.

Al inicio de la evaluación hubo crecimiento en medio nutritivo para los tratamientos PC y PI con 3.06 log(UFC/mL) y 2.30 log(UFC/mL) respectivamente mientras que para PE no hubo presencia de bacterias, sin embargo, para mohos y levaduras hubo crecimiento en los tres tratamientos. Fue hasta el día 21 donde comienzan a aparecer bacterias en el tratamiento PE, el conteo es significativamente menor ($P > 0.05$) que el de PC y PI ya que se encuentra 6 logaritmos por debajo de estos tratamientos al pasar el tiempo el aumento de hongos y levaduras fue gradual y aunque los tratamientos no presentan diferencias significativas en este parámetro, si hay diferencias numéricas, siendo el tratamiento PE el de menor carga, para el día 28 fueron alcanzados 11.20 log(UFC/mL) para PC en medio nutritivo, 10.50 log(UFC/mL) en MRS y 10.93 log(UFC/mL) en PDA para este mismo tratamiento,

en PE fueron contabilizados 4.48 log(UFC/mL) en AN, 6.17 log(UFC/mL) en MRS y 10.47 log(UFC/mL) en PDA, mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a PC y PI, en este último fue monitoreado un conteo de 10.84 log(UFC/mL) en AN, 10.17 log(UFC/mL) en MRS y 10.88 log(UFC/mL) en PDA.

Es probable que las bacterias que tienen crecimiento en el medio nutritivo sean del género *Bacillus* debido a que ha sido reportado que éstas pueden entrar en etapa de esporulación al no encontrar sustrato o condiciones adecuadas para su proliferación (Brul *et al.*, 2011), estas esporas están principalmente en los cereales debido a su forma de cultivo y pueden soportar el proceso de horneado debido a la alta resistencia a temperaturas que van de 105-115°C, mientras que en el horneado el centro de la miga puede alcanzar 97-100°C por lo que algunas de estas pueden sobrevivir (Vaičiulytė-Funk *et al.*, 2015).

Wei *et al.* (2009) aplicaron extractos (acuoso y etanólico) de pasas en pan de caja e inocularon el producto con cepas del género *Bacillus* en una concentración aproximada de 1×10^6 , así como en este trabajo, obteniendo que el extracto etanólico disminuye significativamente de 7.70 Log en el control a 3.41 Log en el tratamiento con extracto a los 7 días de almacenamiento sin embargo, comparado con esta investigación el tratamiento PI que corresponde a pan inoculado con bacterias del género *Bacillus* y con extracto de *Oxalis*, al mismo tiempo de almacenaje, muestra un crecimiento de 3.0 Log siendo menor la carga bacteriana comparada con la encontrada por estos autores, puede ser por la materia prima del extracto, por los mecanismos de acción de los compuestos activos sobre las bacterias y la forma de aplicar el extracto, los autores lo hacen como sustitución de porcentaje de agua en la formulación y en este trabajo es un agregado al producto.

Por otro lado Saeed *et al.*, (2003) evaluaron el efecto de concentrados de clavo extraídos con metanol a diferentes concentraciones, sin embargo ellos aplican el concentrado en porcentaje de sustitución de agua para el posterior horneado del producto, el conteo de microorganismos lo realizan a los 15 días de almacenamiento obteniendo 2.49 log (UFC/mL) para el tratamiento con mayor contenido de concentrado (2.5%), comparándolo con el presente trabajo al mismo tiempo de almacenamiento (15 días) el extracto de *Oxalis tuberosa* muestra mejores resultados ya que no hay crecimiento bacteriano, probablemente porque el extracto fue aplicado después del proceso de horneado, ya que algunos compuestos bioactivos que brindan la capacidad antimicrobiana son termolábiles y puede que no soporten la temperatura de horneado que oscila de entre 180° y 220°C.

Tabla 19. Microbiológicos durante vida de anaquel


DÍA	Tratamiento	AN	MRS	PDA	MC	SM
		log(UFC/mL)				
1	PC	3.06±0.02 ^{aA}	3.0±0.1 ^{aA}	3.05±0.05 ^{aA}	ND	ND
	PE	ND	ND	2.60±0.02 ^{aA}	ND	ND
	PI	2.30±0.01 ^{aA}	2.4±0.02 ^{aA}	3.08±0.005 ^{aA}	ND	ND
7	PC	6.20±0.1 ^{bB}	6.48±0.015 ^{bcC}	6.63±0.006 ^{cB}	ND	ND
	PE	ND	ND	6.26 ±0.005 ^{bB}	ND	ND
	PI	5.02±0.005 ^{aAB}	4.98±0.01 ^{aB}	6.64±0.002 ^{cB}	ND	ND
14	PC	8.38±0.003 ^{bcC}	8.98±0.005 ^{cD}	8.68±0.009 ^{cC}	ND	ND
	PE	ND	ND	8.30±0.002 ^{bC}	ND	ND
	PI	6.85±0.02 ^{aB}	7.24±0.002 ^{aC}	8.71±0.003 ^{cC}	ND	ND
21	PC	10.87±0.002 ^{cC}	10.30±0.001 ^{bcE}	9.84±0.005 ^{bD}	ND	ND
	PE	4.24±0.01 ^{aA}	5.31±0.01 ^{aB}	9.41±0.009 ^{bD}	ND	ND
	PI	10.77±0.004 ^{cC}	10.03±0.057 ^{bE}	9.80±0.001 ^{bD}	ND	ND
28	PC	11.20±0.005 ^{cD}	10.50±0.005 ^{cE}	10.93±0.003 ^{cE}	ND	ND
	PE	4.48±0.01 ^{aA}	6.17±0.01 ^{bB}	10.47±0.006 ^{cD}	ND	ND
	PI	10.84±0.004 ^{cC}	10.17±0.005 ^{cE}	10.88±0.004 ^{cE}	ND	ND

PC: Pan Control, PE: Pan con extracto, PI: Pan inoculado con microorganismos deterioradores, ND: No se detectó crecimiento. a,b,c,d,e representan diferencias significativas p<0.05 entre los tratamientos mientras que A,B,C, D, E representan diferencias significativas p<0.05 a través del tiempo.

8.10 Análisis de Perfil de Textura (APT) en pan tipo danés

Durante el periodo de almacenaje fueron evaluados los cambios de textura que presentó el pan (Tabla 20), lo cual está íntimamente ligado al crecimiento microbiano y a la actividad de agua que el producto presenta. Al inicio del almacenamiento no hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos para los parámetros, en dureza en PC fue alcanzada una dureza de 11.24 N, en PE 10.91 N y en PI 10.36 N, en la adhesividad los datos son parecidos y esto puede ser por la incorporación del almíbar y extracto en la corteza del pan danés, en el día 7 la elasticidad y cohesividad no presentan diferencias a través del tiempo oscilando entre los 0.39 y 0.45 para cohesividad y 0.73 y 0.79 mm en elasticidad. Las diferencias en dureza comienzan a aparecer hasta el día 21, el control posee 11.12 N en dureza mientras que PE muestra 9.50 N y PI 8.78 N, el cambio en la dureza impacta en la masticabilidad de PI que corresponde a 0.052 J, siendo que PE y PC tienen valores menores de 0.024 J y 0.035 J respectivamente. Sin embargo la mayor diferencia numérica fue hasta el día 28 donde la dureza del control (11.24 N) fue superior a la de los tratamientos PE (9.87 N) y PI (6.21 N), en cuanto a los demás parámetros no hubo diferencias significativas al día 28.

Los resultados obtenidos pueden ser comparados con los de Passarinho *et al.* (2014), ellos aplican aceite esencial de orégano en pan tipo caja rebanado con la finalidad de conocer si este tiene un efecto durante la vida de anaquel del producto, sin embargo, sólo realizan el almacenaje durante 15 días ya que reproducen las condiciones de un pan comercial abriendo el empaque una vez por día. En el APT que ellos realizan comienzan con una dureza de 2.25 N la cual es menor a la que se encuentra en este trabajo (10.96 N para PE), esto puede ser debido a la forma en que se toma esta medición, ellos ya han afectado la textura del producto al rebanarlo, por lo que su dureza es menor comparada con la de un producto sin modificaciones.



Con el paso del tiempo la dureza incrementa a un máximo de 9.96 N a los 10 días y hasta el final del experimento, Passarinho (2014) atribuye este endurecimiento a la retrogradación que afecta principalmente a la miga del producto y a la redistribución de humedad que se da debido a la constante interacción del producto con el medio ambiente al abrir el empaque, estos factores también pueden influenciar los cambios de dureza en el presente trabajo.

Otra forma de incorporar agentes antimicrobianos en productos de panificación es sustituyendo un porcentaje de alguno de los ingredientes principales por el compuesto bioactivo de estudio, este es el caso de Sudha *et al.*, (2016) quienes incorporan en sustitución de hasta el 15% de harina de carambola en la elaboración de pan blanco ellos encuentran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos ya que el pan con mayor sustitución de harina aumenta al doble la dureza del producto respecto al control. Es por eso que con la finalidad de no afectar los parámetros de textura que van íntimamente ligados con los aspectos sensoriales y de aceptación del producto es mejor el uso de extractos o aceites esenciales, esto también porque al obtener el extracto han sido concentrados la mayoría de compuestos de interés. Por lo que en esta investigación el producto al que se le atribuye la actividad antimicrobiana y antioxidante fue aplicado de forma independiente a la formulación del pan danés ya que el objetivo es mejorar el periodo de almacenaje sin afectar otros atributos del producto que puedan causar el rechazo del mismo.

Tabla 20. APT durante vida de anaquel

Día	Tratamiento	Dureza (N)	Adhesividad (-)(J)	Cohesividad	Elasticidad (mm)	Masticabilidad (J)
1	PC	11.24±2.00 ^{aB}	6x10 ⁵ ±7x10 ^{6aB}	0.40±0.02 ^{aA}	0.73±0.039 ^{aA}	0.033±0.006 ^{aB}
	PE	10.91±1.63 ^{aAB}	5x10 ⁵ ±1x10 ^{6aAB}	0.41±0.02 ^{aA}	0.78±0.033 ^{aA}	0.034±0.009 ^{aB}
	PI	10.36±0.94 ^{aAB}	4.3x10 ⁴ ±6x10 ^{6aAB}	0.43±0.02 ^{aA}	0.78±0.006 ^{aA}	0.033±0.004 ^{aB}
7	PC	12.67±2.52 ^{aB}	4.9x10 ⁴ ±3.8x10 ^{5bAB}	0.39±0.01 ^{aA}	0.78±0.046 ^{aA}	0.039±0.008 ^{bB}
	PE	9.17±1.96 ^{aA}	1.4x10 ⁴ ±8x10 ^{5aA}	0.42±0.02 ^{aA}	0.73±0.028 ^{aA}	0.027±0.005 ^{aA}
	PI	8.83±1.9 ^{aA}	1.9x10 ⁴ ±1.8x10 ^{5aA}	0.45±0.06 ^{bA}	0.79±0.044 ^{aA}	0.031±0.006 ^{abAB}
14	PC	11.13±1.24 ^{aB}	2.4x10 ⁴ ±2.5x10 ^{5bA}	0.38±0.02 ^{aA}	0.70±0.06 ^{aA}	0.030±0.006 ^{aAB}
	PE	10.84±2.15 ^{aAB}	7.5x10 ⁵ ±7x10 ^{6aB}	0.40±0.01 ^{aA}	0.69±0.05 ^{aA}	0.029±0.004 ^{aA}
	PI	9.53±1.46 ^{aA}	9x10 ⁵ ±9x10 ^{6aC}	0.42±0.008 ^{bA}	0.70±0.01 ^{aA}	0.029±0.003 ^{aA}
21	PC	11.12±1.88 ^{bB}	6.4x10 ⁴ ±8x10 ^{5bB}	0.41±0.02 ^{aA}	0.76±0.04 ^{aA}	0.035±0.004 ^{ab}
	PE	9.50±0.85 ^{bA}	4.1x10 ⁴ ±4x10 ^{5aAB}	0.41±0.03 ^{aA}	0.70±0.01 ^{aA}	0.024±0.003 ^{aA}
	PI	8.78±0.73 ^{aA}	9.4x10 ³ ±1x10 ^{4bC}	0.41±0.007 ^{bA}	0.70±0.01 ^{aA}	0.052±0.002 ^{bC}
28	PC	11.24±1.33 ^{bB}	1.9x10 ² ±1x10 ^{4aA}	0.39±0.02 ^{aA}	0.68±0.03 ^{aA}	0.018±0.004 ^{aA}
	PE	9.87±1.82 ^{bAB}	1.5x10 ⁴ ±2x10 ^{5aA}	0.40±0.01 ^{aA}	0.70±0.03 ^{aA}	0.019±0.004 ^{aA}
	PI	6.21±1.74 ^{bA}	5.2x10 ³ ±3x10 ^{6bAB}	0.41±0.02 ^{aA}	0.68±0.05 ^{aA}	0.027±0.005 ^{bA}

PC: Pan Control, PE: Pan con extracto, PI: Pan inoculado con microorganismos deterioradores, a, b, c_{representan diferencias significativas p<0.05} entre los tratamientos mientras que ^{A,B,C,} representan diferencias significativas p<0.05 a través del tiempo.

8.11 Capacidad Antioxidante en pan tipo danés

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 21, el control tiene una baja capacidad antioxidante iniciando con 0.037 mgEAG/g valor que disminuye gradualmente y al final del periodo es de 0.036 mgEAG/g lo cual es esperado ya que no se ha aplicado ningún aditivo que tenga influencia en este parámetro, pese a obtener una cantidad muy baja en contenido de fenoles, puede inhibirse 0.14% y 0.94% de los radicales ABTS⁺ y DPPH respectivamente. A comparación del control PE y PI tienen una mayor cantidad de fenoles totales, al día 1 PE presenta 0.58 mgEAG/g y PI 0.55 mgEAG/g, al igual que con el control la disminución del contenido disminuye para el día 30 teniendo para PE 0.50 mgEAG/g y en PI 0.47 mgEAG/g, en cuanto a la reducción del radical DPPH en PE la inhibición inicial es de 84.99% y de ABTS⁺ de 80.23% lo que equivale a 903.34 eq. De Trolox y al final de la evaluación para el mismo tratamiento es de 81.29 % en DPPH y de 76.80 % para ABTS⁺. Por ultimo en PI los datos son similares a los de PE, sin embargo numéricamente son menores ya que inicia con el 82.43 % de reducción de DPPH y el 77.62 % de inhibición en ABTS⁺ para el final de la vida de anaquel los datos bajan a 79.16 % en DPPH y 74.42 para ABTS⁺.

La cantidad de antioxidantes detectada en el control pueden ser debido a los derivados de la reacción de Maillard, durante esta reacción interactúan aminoácidos con azúcares reductores lo cual tras una serie de sub-reacciones deriva en melanoides, estos han sido estudiados y muestran una capacidad antioxidante baja lo que coincide a lo encontrado en la investigación. En cuanto a la disminución de los fenoles y la capacidad antioxidante a través del tiempo puede ser por la interacción de los compuestos a la luz y al oxígeno así mismo como a la interacción que tienen con las bacterias que combaten.

En 2008 Michalska *et al.*, evaluaron la actividad antioxidante de la Reacción de Maillard en pan de centeno, ellos encuentran un total de 2.26 mgEAG/g en fenoles totales, es posible que este valor encontrado sea mucho mayor al del control (0.037 mgEAG/mg) en este trabajo debido a la materia prima utilizada ya que el centeno es considerado como buena fuente de sustancias biológicas activas como lo son aminoácidos y antioxidantes, mientras que en el trigo ha sido hallado que algunos compuestos como el tocoferol queda en el salvado el cual es removido para poder realizar harinas blancas.

Zhu *et al.*, (2016) evaluaron la capacidad antioxidante de infusión de té negro en la elaboración de pan al vapor, encontrando un máximo de 24.9 mgEAG/g en el tratamiento con mayor contenido de infusión y un máximo de 58.4% de inhibición del radical ABTS en el mismo tratamiento, mientras que para este trabajo fue encontrado un máximo de 0.58 mgEAG/mg en Fenoles Totales lo cual es significativamente menor a lo encontrado por los autores, sin embargo, la capacidad de reducción del radical ABTS es mayor con *Oxalis tuberosa* logrando inhibir hasta el 76.80 % al final del periodo de almacenaje, esto puede ser debido a la afinidad que tienen los compuestos en el extracto realizado en esta investigación para estabilizar el radical, debido a que con diferencia del té negro en la papa roja se encuentran más compuestos unidos a azúcares los cuales reaccionan con ABTS.

Con los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante en el pan, es posible atribuir la acción antibacteriana a estos compuestos, ya que a lo largo del periodo de almacenaje la presencia de antioxidantes prevalece y va disminuyendo gradualmente, esto puede ser debido a la interacción que tiene con las células bacterianas ayudando a disminuir la población o biomasa, en comparación con el control que tiene poca actividad antioxidante la cantidad de microorganismos se encuentra aproximadamente 7 fases logarítmicas arriba del pan que contiene el extracto al final de la vida de anaquel, mientras que para PE a medida que aumenta la carga bacteriológica la capacidad antioxidante disminuye.

Tabla 21. Capacidad antioxidante durante vida la de anaquel durante la vida de anaquel

Día	Tratamiento	Fenoles Totales	DPPH	ABTS ⁺	
		mgEAG/mg	% inhibición	% inhibición	Eq. Trolox
1	PC	0.037±4x10 ^{4b}	0.94±0.061 ^b	0.14±0.05 ^b	2.78±0.20 ^b
	PE	0.58±0.006 ^a	84.99±0.54 ^a	80.23±0.50 ^a	903.94±5.85 ^a
	PI	0.55±0.002 ^a	82.43±0.40 ^a	77.62±0.64 ^a	873.39±7.51 ^a
15	PC	0.0369±0.0001 ^b	0.9±0.001 ^b	0.12±0.006 ^b	2.56±0.76 ^b
	PE	0.55±0.013 ^a	83.06±0.45 ^a	77.91±0.15 ^a	876.86±1.80 ^a
	PI	0.50±0.00 ^a	79.36±0.35 ^a	75.92±0.10 ^a	853.60±1.20 ^a
30	PC	0.036±6x10 ^{4b}	0.85±0.006 ^b	0.09±0.002 ^b	1.98±0.17 ^b
	PE	0.50±0.0023 ^a	81.29±0.28 ^a	76.80±0.05 ^a	863.90±0.64 ^a
	PI	0.47±0.002 ^a	79.16±0.35 ^a	74.42±0.10 ^a	836.10±1.27 ^a

PC: Pan Control, PE: Pan con extracto, PI: Pan con microorganismos deterioradores, a, b, c representan diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos y a través del tiempo

8.12 Índice de peróxido en pan tipo danés

Los datos obtenidos (Figura 8) muestran que al inicio del periodo de almacenamiento no hay diferencias significativas entre los tratamientos el resultado para el control fue de 7.46 meq.O₂/kg, para el tratamiento PE de 6.93 meq.O₂/kg y del tratamiento PI 7.04 meq.O₂/kg pero en la etapa final el tratamiento PC, al cual no le fue aplicado el extracto, obtuvo 13.06 meq.O₂/kg, presentando diferencias significativas (P>0.05) respecto a PE y PI que tienen un valor de índice de peróxido de 8.80 meq.O₂/kg y 8.85 meq.O₂/kg respectivamente.

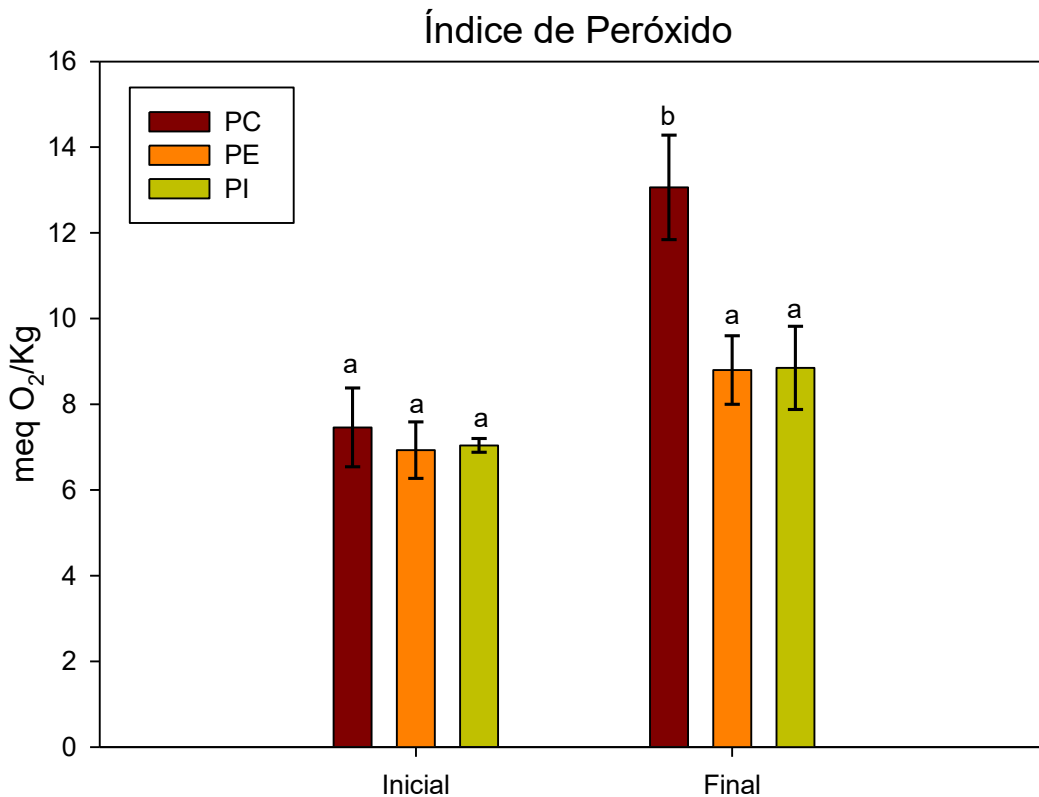


Figura 8. Índice de peróxido en vida de anaquel

PC: Pan Control, PE: Pan con extracto, PI: Pan con microorganismos deterioradores. a, b, representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos y a través del tiempo.

Debido a que los radicales libres se forman rápidamente por la exposición a la luz, oxígeno y altas temperaturas los procesos de freído, asado y horneado son bastante perjudiciales para la materia grasa que está en la formulación de los alimentos, estos radicales libres son considerados causas para el desarrollo de enfermedades en los consumidores principalmente hepáticas o precursoras de cáncer. Para controlar los niveles de lipoperoxidación la NMX-F-101-SCFI-2012 establece que no se deben rebasar 20 meq. O₂/kg en los alimentos, siguiendo la NMX el pan danés se encuentra dentro de los límites permisibles incluso al final del periodo de almacenamiento.

Budryn *et al.*, (2013) incorporaron extractos de té verde y café sin tostar en la elaboración de donas como representativos de productos de panificación fritos, ellos realizan la valorización de peróxidos tras la cocción del producto encontrando que la incorporación del extracto de té verde reduce significativamente ($P > 0.05$) la formación de radicales libres, sin embargo según los datos obtenidos por los autores, las donas sobrepasan los límites establecidos para los alimentos alcanzando hasta 18 meq. O_2/kg , mientras que en el presente trabajo los niveles de oxidación se mantienen dentro de los límites. Esto puede ser debido a la forma de cocción de los productos ya que al realizar un producto frito es muy probable que este absorba una alta cantidad de grasa antes de su cocción, por otro lado también influye el estado del aceite de freído y el hecho que los autores incorporaron los extractos como sustituto de agua, el cual en contacto con altas temperaturas como la del freído que oscila de $180^\circ C$ a $220^\circ C$ puede reducir su capacidad antioxidante.

8.13 Actividad de Agua (a_w)

Para relacionar los resultados de crecimiento bacteriano y APT durante la vida de anaquel fueron tomadas las mediciones de la actividad de agua (Figura 9) mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, siendo PI el de menor a_w a partir del día 7 con un valor 849.2 y terminando al día 30 con 833.4, mientras que PC y PE tienen una mayor a_w al final del periodo de almacenaje con valores de 871.4 y 869.2 respectivamente, a_w está relacionado al crecimiento microbiológico ya que la mayoría de las bacterias crecen a valores mayores a 0.90 lo cual concuerda con los resultados obtenidos al inicio de la vida de anaquel.

Debido a la pérdida de humedad del producto, a la retrogradación y a la temperatura la a_w es afectada con el paso del tiempo disminuyendo y siendo un factor determinante para el crecimiento bacteriológico, no obstante el crecimiento de hongos y levaduras aún es posible ya que es requerido un 0.80 para el crecimiento de estos microorganismos lo cual que coincide con los análisis microbiológicos, siendo que el control y PI muestran mayor cantidad de microorganismos en el medio de cultivo PDA que es un medio selectivo para hongos y levaduras. En el presente trabajo hay una disminución de los valores a lo largo del tiempo lo cual puede ser explicado por que el producto evaluado no contiene aditivos o conservadores que puedan ayudar a la retención de agua.

Kechichian *et al.*, (2010) elaboraron películas biodegradables adicionadas con canela y clavo en polvo las cuales aplican en pan blanco rebanado, ellos almacenan el pan durante 7 días a temperatura ambiente y evalúan la actividad de agua de las rebanadas encontrando 0.958 para el control, 0.960 y 0.962 para los tratamientos con clavo y canela respectivamente, en contraste con el presente trabajo la actividad de agua hallada por los autores es mayor que la del pan danés, esto puede ser debido a la protección que tiene la película ya que al aplicarla puede ser que tenga influencia en la respiración del producto impidiendo su contacto directo con el ambiente por lo tanto conservar una a_w mayor.

En la investigación realizada por Mohammad *et al.*, (2003) fueron utilizados diversos productos de panificación comerciales para relacionar la a_w con el crecimiento microbiano durante un periodo de almacenaje de 5 días, los resultados encontrados muestran que a lo largo del periodo el valor de a_w aumenta, obteniendo una media de 0.958 al primer día hasta 0.988 al quinto día, este incremento se ve relacionado con la actividad microbiológica al primer día no se encuentra una carga bacteriana y para el quinto día se encuentra un promedio de 98 UFC/g asociando este incremento a los valores óptimos de a_w para microorganismos comunes en la deterioración de pan, siendo específicos en el

género *Bacillus* y a que las bacterias pasan de la fase estacionaria a la logarítmica debido a su adaptación a la matriz alimentaria.

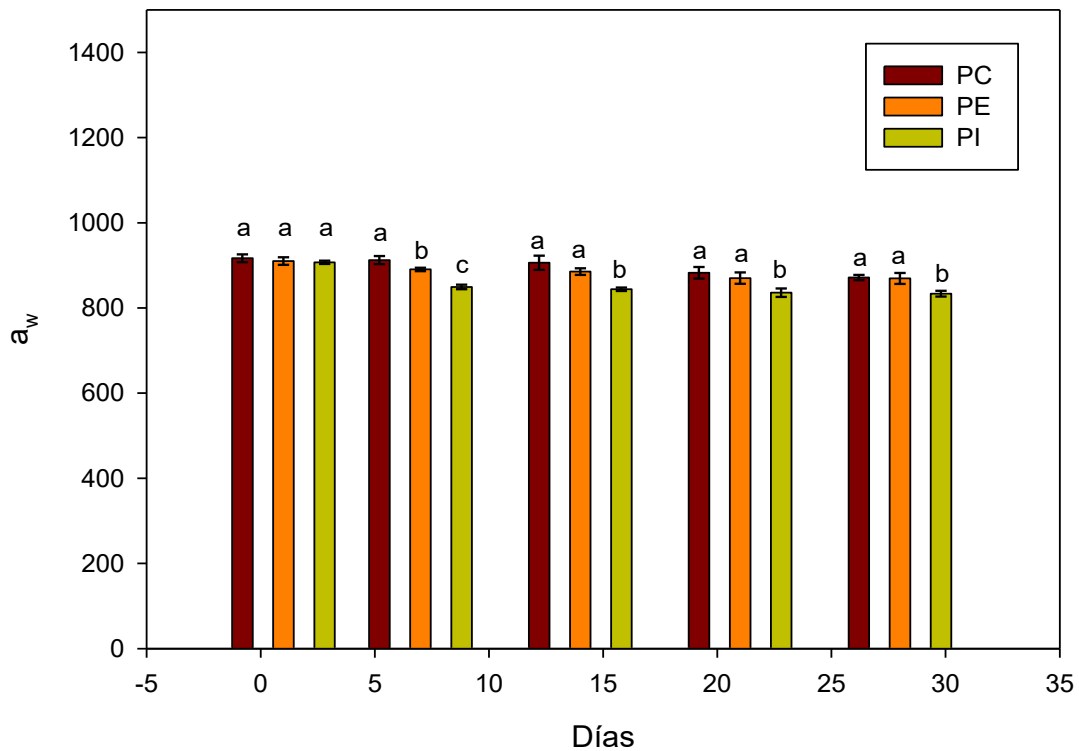


Figura 9. a_w durante vida de anaquel

PC: Pan Control, PE: Pan con extracto, PI: Pan con microorganismos deterioradores, a, b, c representan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos a través del tiempo

8.14 Color CIE $L^*a^*b^*$

En el color que presenta en la corteza no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) (Tabla 22), lo que indica que la adición del extracto antibacteriano no tiene influencia sobre el color, por lo menos en la corteza, al inicio del almacenaje los valores obtenidos son similares en el parámetro L^* , no obstante conforme avanza el periodo de almacenamiento la luminosidad va


disminuyendo de 62.82 para el tratamiento control (PC) a 59.68, PE inició con 65.58 y terminó con 57.44 y los valores de PI bajan de 65.56 a 57.52 indicando que el producto va oscureciendo esto puede ser debido a la exposición a la luz, la aparición de algunas levaduras y hongos en la corteza.

Para la corteza el parámetro a^* oscila entre 25 al día siete y de 19-24 para el día 30 otorgando a la corteza un color café claro que es complementado con los valores para b^* que van de 45 al inicio del periodo para terminar con 43 al día 30, el color café claro es producido por la reacción de Maillard característica de los productos de panificación y también un parámetro que influye directamente en la aceptación del producto es por eso que los aditivos naturales o sintéticos están encaminados a no afectar el color del producto, aunque el color del extracto aplicado tiende a los tonos rojos no afecta a primera instancia la percepción de color del pan.

Por otra parte en la miga del producto si existen diferencias significativas ($p>0.05$) principalmente se presentan en el parámetro a^* (Tabla 23), el cual brinda información sobre la apreciación del color verde a rojo, el tratamiento control PC muestra valores bajos que van de 1.52 al día 7 y termina con 1.24 estos datos aunados a los del parámetro b^* que van de 21.94 al inicio y 18.40 al finalizar dan un color con tendencia al tono beige-amarillo lo cual es característico de la miga de los productos elaborados con masa danesa.

Para los tratamientos PE y PI que son en los que se aplicó el extracto muestran una miga color vino al inicio de la vida de anaquel con valores de 10.24 y 10.30 respectivamente conforme avanza el tiempo la miga es más oscura tomando colores cercanos al café y presentando valores para PE 9.78 y PI de 9.81. El cambio de color en la miga de los tratamientos puede estar ligada a la actividad enzimática que resulta de los microorganismos deterioradores y también de la oxidación de la grasa que contiene el producto.

En la investigación de Zhu *et al.*, (2016) en la que aplican infusión de té negro en la elaboración de pan al vapor encuentran diferencias significativas en los



tratamientos que han sido adicionados con la infusión comparándolas con el control, los tratamientos muestran menor luminosidad (parámetro L*) y tendencia en el parámetro a* a los tonos rojizos, esto puede compararse con el presente trabajo para la evaluación realizada en la miga del producto teniendo valores mucho mayores en el parámetro a* comparados con el control.

Estos cambios son dados por los pigmentos naturales de la materia prima, para *Oxalis tuberosa* las antocianinas que brindan el tono rojo, a pesar de tener un cambio en cuanto al color de la miga, no significa que sea un factor determinante para el rechazo del producto debido a que se trata de la creación de un nuevo producto que aparte del aporte nutricional común de los productos de panificación, tiene una alta probabilidad de aportar una pequeña cantidad de antioxidantes al consumidor que al mismo tiempo protegen al producto del deterioro respecto al tiempo de almacenamiento.

Tabla 22. Color en corteza durante el periodo de almacenamiento.

Día	L*			a*			b*		
	PC	PE	PI	PC	PE	PI	PC	PE	PI
7	62.82±7.07 ^a	65.58±4.70 ^a	65.56±4.63 ^a	24.36±1.50 ^a	25.14±0.58 ^a	25.20±0.60 ^a	45.78±1.77 ^a	45.64±1.34 ^a	45.46±1.38 ^a
14	61.48±1.01 ^a	62.98±5.44 ^a	63.46±2.40 ^a	23.4±0.97 ^a	24.84±0.45 ^a	24.96±0.45 ^a	45.20±2.20 ^a	44.98±0.51 ^a	44.84±0.21 ^a
21	60.78±2.78 ^a	58.62±2.73 ^a	58.52±2.63 ^a	21.51±0.34 ^a	24.64±0.79 ^a	24.72±0.70 ^a	44.80±0.68 ^a	43.24±1.05 ^a	43.66±0.95 ^a
28	59.68±5.67 ^a	57.44±3.84 ^a	57.52±3.77 ^a	19.63±1.23 ^a	24.54±0.68 ^a	24.62±0.58 ^a	44.60±0.89 ^a	43.14±0.92 ^a	43.22±0.76 ^a

PC: Pan Control, PE: Pan con extracto, PI: Pan con microorganismos. a, b representan diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos

Tabla 23. Color de miga durante el periodo de almacenamiento.

Día	L*			a*			b*		
	PC	PE	PI	PC	PE	PI	PC	PE	PI
7	83.56±2.49 ^a	83.58±1.60 ^a	83.60±1.58 ^a	1.52±0.08 ^b	10.24±0.21 ^a	10.30±0.37 ^a	21.94±2.01 ^b	18.44±0.46 ^a	18.42±0.27 ^a
14	80.70±1.14 ^a	82.98±1.43 ^a	82.96±0.45 ^a	1.44±0.27 ^b	10.08±0.32 ^a	10.04±0.30 ^a	19.08±0.97 ^a	18.38±0.40 ^a	18.36±0.08 ^a
21	79.22±2.83 ^a	81.06±1.07 ^a	81.24±0.90 ^a	1.30±0.37 ^b	9.90±0.48 ^a	9.93±0.40 ^a	18.68±1.49 ^a	18.1±1.15 ^a	18.16±0.53 ^a
28	78.56±2.11 ^a	80.84±0.70 ^a	80.90±0.57 ^a	1.24±0.026 ^b	9.78±0.47 ^a	9.81±0.29 ^a	18.40±1.25 ^a	17.90±1.06 ^a	17.68±0.40 ^a

PC: Pan Control, PE: Pan con extracto, PI: Pan con microorganismos. a, b representan diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos

9. Conclusiones

- De la carga bacteriana analizada en un pan tipo danés comercial se lograron aislar 10 bacterias, 4 de ellas pertenecientes al género *Bacillus* y representativas de los deterioradores de panificación, en el medio de cultivo Sal y manitol se aislaron tres bacterias relacionadas a la microbiota de la piel las cuales pudieron llegar al pan por medio de los consumidores y trabajadores de la panadería comercial, por último se identificaron 3 bacterias pertenecientes a las *Enterobacterias* las que pueden causar enfermedades en el aparato digestivo.
- Los extractos obtenidos a partir de harina de *Oxalis tuberosa* presentan actividad antibacteriana contra Gram positivas y negativas, siendo Ee el de mayor efectividad ya que se necesita menor concentración de extracto para inhibir el crecimiento de las bacterias.
- En cuanto a la cuantificación de fenoles y capacidad antioxidante de los extractos, Ee muestra los mejores resultados con 9.23 mg/mgEAG, alcanzando un 77% de inhibición del radical DPPH y un 62.48% del radical ABTS.
- Con base en el rendimiento de extracción, capacidad antibacteriana y antioxidante el extracto para aplicar en un producto de panificación es el extracto con etanol (Ee) ya que mostró valores superiores en todos los parámetros evaluados además de ser el de extracción más viable.
- Durante el periodo de almacenamiento la incorporación del extracto no tiene efectos negativos en los parámetros evaluados en el Análisis de Perfil de Textura, mediante la prueba de peróxidos se demostró que el extracto protege al producto de oxidación lipídica debido a la acción de los antioxidantes y que a pesar que el tono del extracto es rojo no afecta la apreciación de color de la corteza del pan.

- La adición del extracto ayuda a retrasar el crecimiento de bacterias y al final del periodo de almacenamiento el producto aún es indicado para el consumo, sin embargo este consumo solo se limita en el aspecto bacteriológico debido a que la carga de hongos y levaduras sobrepasa los límites permisibles establecidos por la NOM-147-SSA1

10. Referencias

1. Aguilera M., Reza, M., Chew-Madinaveita, R. G., Meza-, J. A. (2011). *Propiedades funcionales de las antocianinas*. Biotecnia, 13(2), 16-22.
2. Ahmed, M. O., Baptiste, K. E. (2018). *Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health*. Microbial Drug Resistance, 24(5), 590-606.
3. Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Olalere, O. A. (2017). *Ethanollic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from Vernonia amygdalina leaf using two-level factorial design*. Journal of King Saud University-Science
4. Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Mudalip, S. K. A., Olalere, O. A. (2018). *Characterization and effect of extraction solvents on the yield and total phenolic content from Vernonia amygdalina leaves*. Journal of Food Measurement and Characterization, 12(1), 311-316.
5. Alcalde-Eon, C., Saavedra, G., de Pascual, S., Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). *Liquid chromatography–mass spectrometry identification of anthocyanins of isla oca (Oxalis tuberosa, Mol.) tubers*. Journal of Chromatography A, 1054(1-2), 211-215.
6. Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., Lightfoot, D. A. (2017). *Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts*. Plants, 6(4), 42.
7. Amajoud, N., Bouchrif, B., El Maadoudi, M., Senhaji, N. S., Karraouan, B., El Harsal, A., El Abrini, J. (2017). *Prevalence, serotype distribution, and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food products in Morocco*. The Journal of Infection in Developing Countries, 11(02), 136-142.
8. Andrés-Lacueva, C., Medina-Remon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Lamuela-Raventos, R. M. (2010). *Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables*. Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability, 53-80.

9. Andrews, J. M. (2001). *Determination of minimum inhibitory concentrations*. Journal of antimicrobial Chemotherapy, 48, 5-16.
10. Avila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M. G., Camacho-Dávila, A., Torres-Muñoz, J. V., Nevárez-Moorillón, G. V. (2010). *Extracts of Mexican oregano (Lippia berlandieri Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity*. Food and Bioprocess Technology, 3(3), 434-440.
11. Axel, C., Zannini, E., Arendt, E. K. (2017). *Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension*. Critical reviews in food science and nutrition, 57(16), 3528-3542.
12. Balatti, G. E., Ambroggio, E. E., Fidelio, G. D., Martini, M. F., Pickholz, M. (2017). *Differential interaction of antimicrobial peptides with lipid structures studied by coarse-grained molecular dynamics simulations*. Molecules, 22(10), 1775.
13. Banavar Ravi, S., Nirupad, S., Chippagiri, P., Pandurangappa, R. (2017). *Antibacterial Effects of Natural Herbal Extracts on Streptococcus mutans: Can They Be Potential Additives in Dentifrices*. International journal of dentistry
14. Barth, M., Hankinson, T. R., Zhuang, H., Breidt, F. (2009). *Microbiological spoilage of fruits and vegetables*. In Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages (pp. 135-183). Springer, New York, NY.
15. Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Cereals and cereal products*. Food chemistry, 670-745.
16. Bendini, A., Cerretani, L., Pizzolante, L., Toschi, T. G., Guzzo, F., Ceoldo, S., Levi, M. (2006). *Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of Passiflora spp. extracts*. European Food Research and Technology, 223(1), 102-109.
17. Bernal, M., Guzmán, M. (1984). *El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer*. Biomédica, 4(3-4), 112-121.
18. Bhanu, S. H., Thyagaraju, K. (2017). *Anticancer, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of some aromatic medicinal plants (pulicaria wightiana-asteraceae)*.

19. Bhuyan, D. J., Vuong, Q. V., Chalmers, A. C., van Altena, I. A., Bowyer, M. C., Scarlett, C. J. (2017). *Phytochemical, antibacterial and antifungal properties of an aqueous extract of Eucalyptus microcorys leaves*. South African Journal of Botany, 112, 180-185.
20. Black, J. G. (2012). *Microbiology: principles and explorations*. John Wiley & Sons.
21. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT-Food science and Technology, 28(1), 25-30.
22. Budryn, G., Żyżelewicz, D., Nebesny, E., Oracz, J., & Krysiak, W. (2013). *Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products*. Food research international, 50(1), 149-160.
23. Caballero, B., Finglas, P., & Toldrá, F. (2015). *Encyclopedia of food and health*. Academic Press.
24. Caroch, M., Morales, P., Ferreira, I. C. (2017). *Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives*. Trends in Food Science & Technology.
25. Carrillo, M., Reyes, A. (2007). *Vida útil de los alimentos*. Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias, 2(3), 20-45.
26. Chirinos, R., Betalleluz-Pallardel, I., Huamán, A., Arbizu, C., Pedreschi, R., Campos, D. (2009). *HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (Oxalis tuberosa Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity*. Food chemistry, 113(4), 1243-1251.
27. Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., & Bartkiene, E. (2013). *Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread*. Food Control, 31(2), 539-545.
28. CLSI, C. (2012). *Performance of standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards*. M2-A10.

29. CODINĂ, G. G., Mironeasa, S., Voica, D. V., & Mironeasa, C. (2013). *Multivariate Analysis of Wheat Flour Dough Sugars, Gas Production, and Dough Development at Different Fermentation Times*. Czech Journal of Food Science, 31(3).
30. Coronel Navarro, D. A. (2015). *Aislamiento e identificación de taxa de levaduras presentes en el fruto de mortiño (Vaccinium floribundum) con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica* (Tesis de Licenciatura).
31. Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2011). *Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids*. International journal of antimicrobial agents, 38(2), 99-107.
32. De la Vega Ruiz, G. (2009). *Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales*. México. Temas de Ciencias y Tecnología, 13(38), 27-32.
33. Dedios, J. Y., De La Cruz, E. S., Bacalla, J. S., Muñoz, O. F., Soto, A. L. (2007). *Caracterización y determinación de ecotipos de oca (oxalis tuberosa), para el procesamiento de harinas en la Quebrada de Ancash, distrito y provincia de Yungay, Región Ancash*. Industrial Data, 10(1), 7-10.
34. Del Nobile, M. A., Martoriello, T., Cavella, S., Giudici, P., & Masi, P. (2003). *Shelf life extension of durum wheat bread*. Italian Journal of Food Science, 15(3).
35. Del Rio, J. T. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera* (Doctoral dissertation, Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Química Industrial).
36. Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D., Zhao, Y. (2014). *Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts*. Food Control, 38, 184-191.
37. Deschuyffeleer, N., Audenaert, K., Samapundo, S., Ameye, S., Eeckhout, M., Devlieghere, F. (2011). *Identification and characterization of yeasts*

- causing chalk mould defects on par-baked bread. *Food microbiology*, 28(5), 1019-1027.
38. Di Cagno, R., Filannino, P., Vincentini, O., Lanera, A., Cavoski, I., Gobbetti, M. (2016). *Exploitation of Leuconostoc mesenteroides strains to improve shelf life, rheological, sensory and functional features of prickly pear (Opuntia ficus-indica L.) fruit puree*. *Food microbiology*, 59, 176-189.
39. Donner, J., Reck, M., Bunk, B., Jarek, M., App, C. B., Meier-Kolthoff, J. P., Wagner-Döbler, I. (2017). *The Biofilm Inhibitor Carolacton Enters Gram-Negative Cells: Studies Using a TolC-Deficient Strain of Escherichia coli*. *mSphere*, 2(5), 375-17.
40. Dorta, D. J.; Pigoso, A. A.; Mingatto, F. E.; Rodrigues, T.; Pestana, C. R.; Uyemura, S. A.; Santos, A. C.; Curti, C. (2012). *Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria*. *Phytotherapy Research*. 22(9): 1213-1218.
41. Elisha, I. L., Botha, F. S., McGaw, L. J., Eloff, J. N. (2017). *The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against Escherichia coli against five other bacteria and cytotoxicity of extracts*. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 133.
42. Espín, J. C., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A. (2007). *Nutraceuticals: facts and fiction*. *Phytochemistry*, 68(22), 2986-3008.
43. Famiglietti, A., Quinteros, M., Vázquez, M., Marín, M., Nicola, F., Radice, M., Kovensky Pupko, J. (2005). *Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae*. *Revista Argentina de microbiología*, 37(1), 57-66.
44. Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., Chun, O. K. (2011). *Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods*. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048.
45. Flores, T., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Flores, H. E. (2002). *Ocatin. A novel tuber storage protein from the andean tuber crop oca with antibacterial and antifungal activities*. *Plant Physiology*, 128(4), 1291-1302.

46. Gao, J., Morgan, W. A., Sanchez-Medina, A., Corcoran, O. (2011). *The ethanol extract of Scutellaria baicalensis and the active compounds induce cell cycle arrest and apoptosis including upregulation of p53 and Bax in human lung cancer cells*. Toxicology and applied pharmacology, 254(3), 221-228.
47. Gisslen, W. (2013). *Professional baking*. Ed. John Wiley & Sons. 6ta edición.
48. Gullón, B., Gullón, P., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G. (2017). *Optimization of solvent extraction of antioxidants from Eucalyptus globulus leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties*. Industrial Crops and Products, 108, 649-659.
49. Guynot, M. E., Sanchis, V., Ramos, A. J., Marin, S. (2003). *Mold-free shelf-life extension of bakery products by active packaging*. Journal of Food Science, 68(8), 2547-2552.
50. Gyawali, R., Hayek, S. A., Ibrahim, S. A. (2015). *Plant extracts as antimicrobials in food products: types*. Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality, 38-49.
51. Gyawali, R., Hayek, S. A., Ibrahim, S. A. (2015). *Plant extracts as antimicrobials in food products: mechanisms of action, extraction methods, and applications*. Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality, 49-68.
52. Hamad, G. M., Darwish, A. M., Abu-Serie, M. M., El Sohaimy, S. A. (2017). *Antimicrobial, Antioxidant and Anti-inflammatory Characteristics of Combination (Cassia fistula and Ocimum basilicum) Extract as Natural Preservative to Control & Prevent Food Contamination*. Journal of Food and Nutrition Research, 5(10), 771-780.
53. Hernández-Lauzardo, A. N., Méndez-Montealvo, G., Velázquez del Valle, M. G., Solorza-Feria, J., Bello-Pérez, L. A. (2004). *Isolation and partial characterization of Mexican Oxalis tuberosa starch*. Starch-Stärke, 56(8), 357-363.

54. Hsu, W. Y., Simonne, A., Weissman, A., Kim, J. M. (2010). *Antimicrobial activity of greater galangal [Alpinia galanga (Linn.) Swartz.] flowers*. Food Science and Biotechnology, 19(4), 873-880.
55. Ingraham, J., Ingraham C. (2004), *Introducción a la microbiología*, Ed. Reverté S.A., España
56. Inungaray, M. L. C., Reyes, A. (2013). *Vida útil de los alimentos*. Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias: CIBA, 2(3), 3.
57. Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., Franco-Cendejas, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. Investigación en discapacidad, 3(1), 10-18.
58. Jimenez, M. E., Rossi, A., Sammán, N. (2015). *Health properties of oca (Oxalis tuberosa) and yacon (Smallanthus sonchifolius)*. Food & function, 6(10), 3266-3274.
59. Juárez, Z. N., Bárcenas-Pozos, M. E., Hernández, L. R. (2014). *El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 8(1), 79-93.
60. Karatoprak, G. Ş., Aydin, G., Altinsoy, B., Altinkaynak, C., Koşar, M., Ocsoy, I. (2017). *The Effect of Pelargonium endlicherianum Fenzl. root extracts on formation of nanoparticles and their antimicrobial activities*. Enzyme and microbial technology, 97, 21-26.
61. Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P., Tadini, C. C. (2010). *Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch*. LWT-Food Science and Technology, 43(7), 1088-1094.
62. Kim, K. C., Kang, K. A., Zhang, R., Piao, M. J., Heo, Y. J., Chae, S., Hyun, J. W. (2009). *Risk reduction of ethyl acetate fraction of Empetrum nigrum var. japonicum via antioxidant properties against hydrogen peroxide-induced cell damage*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 72(21-22), 1499-1508.
63. King, S. R., Gershoff, S. N. (1987). *Nutritional evaluation of three underexploited andean tubers: Oxalis tuberosa (Oxalidaceae), Ullucus*

- tuberosus* (Basellaceae), and *Tropaeolum tuberosum* (Tropaeolaceae). *Economic Botany*, 41(4), 503-511.
64. Kita, A., Bąkowska-Barczak, A., Hamouz, K., Kułakowska, K., Lisińska, G. (2015). *The effect of frying on anthocyanin stability and antioxidant activity of crisps from red-and purple-fleshed potatoes (Solanum tuberosum L.)*. *Journal of food composition and analysis*, 32(2), 169-175.
65. Lai, P. K., Roy, J. (2004). *Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices*. *Current medicinal chemistry*, 11(11), 1451-1460.
66. Latou, E., Mexis, S. F., Badeka, A. V., Kontominas, M. G. (2010). *Shelf life extension of sliced wheat bread using either an ethanol emitter or an ethanol emitter combined with an oxygen absorber as alternatives to chemical preservatives*. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 457-465.
67. Lee, S. Y., Song, E. J., Lim, S. I., Hong, Y. K., Ahn, D. H. (2011). *Antimicrobial activity of Myagropsis myagroides and interaction with food composition*. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 85-92.
68. León, E., González, V., Elizabeth, S., Flores, P. (2011). *Composición química de "oca" (Oxalis tuberosa), arracacha (Arracaccia xanthorrhiza) y „tarwi" (Lupinus mutabilis). Formulación de una mezcla base para productos alimenticios*. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2(2), 239-252.
69. Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2010). *Brock Biología de los microorganismos*. 10a Edición.
70. Mahato, N., Sharma, K., Koteswararao, R., Sinha, M., Baral, E., Cho, M. H. (2017). *Citrus essential oils: Extraction, authentication and application in food preservation*. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-15.
71. Maiti, T. K., Pandey, P., Singh, V. K. (2013). *Providencia rettgeri: an unusual cause of central nervous system infections*. *The American journal of the medical sciences*, 346(2), 158-159.
72. Martín, B. (2005). *Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. Estandarización,*

- seguridad y mejora tecnológica*. Centro de la Tecnología de la Carne, 39, 209.
73. Martínez, R., Vizcaíno, V., Trillo, R., P., Pérez, L., J. (2006). *Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de Staphylococcus aureus con resistencia múltiple*. TESIS DE DOCTORADO, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
74. Matei, A., CORNEA, C. P., Rodino, S., BUTU, O. I. M. (2015). *Assessment of Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Strains Against Bread Spoilage Fungus Aspergillus ochraceus*. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 72, 2.
75. Mathlouthi, M. (2001). *Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs*. *Food control*, 12(7), 409-417.
76. Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., Aubert, G. (2008). *Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics*. *Letters in applied microbiology*, 47(3), 167-173.
77. Mejía-Muñoz, J. M., González-Castillo, S., Mora-Aguilar, R., Rodríguez-Pérez, J. E. (2006). *Propagación in vitro de papa ratona (Oxalis tuberosa Mol.)*. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2).
78. Melgar, B., Dias, M. I., Ciric, A., Sokovic, M., Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., Ferreira, I. (2017). *By-product recovery of Opuntia spp. peels: Betalainic and phenolic profiles and bioactive properties*. *Industrial Crops and Products*, 107, 353-359.
79. Mohammad, A. W., Hilal, N., & Seman, M. N. A. (2003). *A study on producing composite nanofiltration membranes with optimized properties*. *Desalination*, 158(1-3), 73-78.
80. Moscoe, L. J., Emshwiller, E. (2016). *Farmer Perspectives on OCA (Oxalis tuberosa; Oxalidaceae) Diversity Conservation: Values and Threats*. *Journal of Ethnobiology*, 36(2), 235-256.
81. Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., Tounsi, M. S. (2012). *Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of*

- mandarin (Citrus reticulata Blanco) and bitter orange (Citrus aurantium L.) seeds extracts*. *Industrial Crops and Products*, 39, 74-80.
82. Muthukrishnan, S., & Manogaran, P. (2018). *Phytochemical analysis and free radical scavenging potential activity of Vetiveria zizanioides Linn.* *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 1955-1960.
83. Naczki, M., Shahidi, F. (2006). *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis.* *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1523-1542.
84. Napolitano, A., Morales, F., Sacchi, R., Fogliano, V. (2008). *Relationship between virgin olive oil phenolic compounds and acrylamide formation in fried crisps.* *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(6), 2034-2040.
85. Needham, R., Williams, J., Beales, N., Voysey, P., Magan, N. (2005). *Early detection and differentiation of spoilage of bakery products.* *Sensors and Actuators B: Chemical*, 106(1), 20-23.
86. Nobile, C. J., Bruno, V. M., Richard, M. L., Davis, D. A., Mitchell, A. P. (2003). *Genetic control of chlamydospore formation in Candida albicans.* *Microbiology*, 149(12), 3629-3637.
87. NOM 111-SSA1-1994. *Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.* México: Diario Oficial de la Federación, 28.
88. NOM-112-SSA1-1994. *Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número más Probable.* México: Diario Oficial de la Federación, 28.
89. NOM-247-SSA1-2008. *Productos y Servicios. Cereales y sus productos. Cereales, Harinas de Cereales*
90. NOM-F-165-S-1978, *Margarina y Oleomargarina para uso industrial comestible*, Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, 1978
91. Nono, R. N., Barboni, L., Teponno, R. B., Quassinti, L., Bramucci, M., Vitali, L. A., Tapondjou, A. L. (2014). *Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory activities and phytoconstituents of extracts from the roots of Dissotis thollonii Cogn. (Melastomataceae).* *South African Journal of Botany*, 93, 19-26.

92. Obaidat, M. M., Salman, A. E. B., Roess, A. A. (2018). *High prevalence and antimicrobial resistance of mecA Staphylococcus aureus in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan*. Tropical animal health and production, 50(2), 405-412.
93. Parayre, S., Falentin, H., Madec, M. N., Sivieri, K., Le Dizes, A. S., Sohier, D., Lortal, S. (2007). *Easy DNA extraction method and optimization of PCR-temporal temperature gel electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products*. Journal of microbiological methods, 69(3), 431-441.
94. Parra Huertas, R. A. (2010). *Review lactic acid bacteria: functional role in the foods*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 8(1), 93-105.
95. Passarinho, A. T. P., Dias, N. F., Camilloto, G. P., Cruz, R. S., Otoni, C. G., Moraes, A. R. F., Soares, N.. (2014). *Sliced Bread Preservation through Oregano Essential Oil-Containing Sachet*. Journal of Food Process Engineering, 37(1), 53-62.
96. Paulin Yañez G. (2016) *Efecto de la cáscara de Oxalis tuberosa en la formación de acrilamida en productos de panificación fritos aplicado a un modelo animal*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica Agroindustrial, Tulancingo, Hidalgo
97. Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T., Villani F. (2003) *Rope producing strains of Bacillus spp from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria*. Applied and environmental Microbiology. 69(4): 2321-2329.
98. Pérez Portuondo, I. (2012). *Bacillus cereus y su papel en las intoxicaciones alimentarias*. Revista cubana de salud pública, 38, 98-108.
99. Pietta, P. G. (2000). *Flavonoids as antioxidants*. Journal of natural products, 63(7), 1035-104
100. Pomar Vela, G. M. (2002). *Tuberización in vitro de Oxalis tuberosa Mol." Oca" como una alternativa para la producción de tubérculo semilla*.

101. Profeco (2018), *Boletín de prensa 067/2018.- Reporte seminal comparativo de precios de los productos de la canasta básica.*
102. Raja, R. R., Pandiyan, P. S. (2017). *Evaluation of antimicrobial studies on ethanolic extracts and poly herbal formulations of abutilon indicum, aristolochia bracteolata, and andrographis paniculata by using flow cytometer.* International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences, 7(1).
103. Ramos Rivera, E.M. (2014). *Estudio del efecto de la actividad antioxidante de harina de cáscara de (Oxalis tuberosa) para la disminución de acrilamida en productos de panificación fritos.* Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica Agroindustrial, Tulancingo, Hidalgo
104. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.* Free radical biology and medicine, 26(9-10), 1231-1237.
105. Reyes-Munguía, A., Azúara-Nieto, E., Beristain, C. I., Cruz-Sosa, F., Vernon-Carter, E. J. (2009). *Propiedades antioxidantes del maguey morado (Rhoeo discolor) Purple maguey (Rhoeo discolor) antioxidant properties.* CyTA–Journal of Food, 7(3), 209-216.
106. Rizzello, C. G., Coda, R., De Angelis, M., Di Cagno, R., Carnevali, P., Gobbetti, M. (2009). *Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extract from Amaranthus spp. seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads.* International journal of food microbiology, 131(2-3), 189-196.
107. Rjeibi, I., Ncib, S., Alimi, H., Ben Saad, A., Saïd, I., Souid, S. (2017). *Comparison of phytochemicals, antimicrobial, and antioxidant capacities in different anatomical parts of Ficus Microcarpa (Moraceae).* Journal of food biochemistry, 41(3).
108. Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). *Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.* Food chemistry, 92(2), 235-254.

109. Rosero, M. (2010). *Colección, caracterización y conservación de variabilidad genética de oca (Oxalis tuberosa Mol.) en agroecosistemas paramunos del departamento de Nariño-Colombia*. Trabajo de grado para optar el título de Magister en Ciencias Línea De Investigación Recursos Fitogenéticos Neotropicales facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Colombia-Palmira.
110. Saba, F., Papizadeh, M., Khansha, J., Sedghi, M., Rasooli, M., Amoozegar, M. A., Fazeli, S. A. S. (2017). *A rapid and reproducible genomic DNA extraction protocol for sequence-based identification of archaea, bacteria, cyanobacteria, diatoms, fungi, and green algae*. *Journal of Medical Bacteriology*, 5(3-4), 22-28.
111. Saeed, M., Nadeem, M., Khan, M. R., Shabbir, M. A., Shehzad, A., Amir, R. M. (2013). *Antimicrobial activity of Syzygium aromaticum extracts against food spoilage bacteria*. *African journal of microbiology research*, 7(41), 4848-4856.
112. Sahu, T. K., Jaiswal, V., Singh, A. K. *A review on solar drying techniques and solar greenhouse dryer*. *IOSR Journal of Mechanical and Civil Engineering (IOSRJMCE) Vol, 13, 31-37*.
113. SALGADO NAVA, A., JIMENEZ MUNGUÍA, M. (2012). *Métodos de control de crecimiento microbiano en el pan*. *Temas Selectos Ingenieria De Alimentos*, 2, 160-172.
114. Sarker, U., Islam, M. T., Rabbani, M. G., Oba, S. (2017). *Variability in total antioxidant capacity, antioxidant leaf pigments and foliage yield of vegetable amaranth*. *Journal of Integrative agriculture*, (In press), doi, 10, S2095-3119.
115. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., Latha, L. Y. (2011). *Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1).
116. Secretaría de Economía (2017) *Conoce más sobre la industria panificadora en México*

117. Seeram, N. P., Momin, R. A., Nair, M. G., Bourquin, L. D. (2001). *Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries*. *Phytomedicine*, 8(5), 362-369.
118. Serna-Saldivar, S. O. (2016). *Cereal grains: properties, processing, and nutritional attributes*. CRC Press.
119. Shafaghat, A., Panahi, A., Shafaghatlonbar, M. (2017). *Chemical constituents, antioxidant and antibacterial activities of the hexane extract of Alchemilla sericata Reichenb.* *Trends in Phytochemical Research*, 1(1), 9-14
120. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
121. Song, F. L., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L., Li, H. B. (2010). *Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants*. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2362-2372.
122. Stanley, P., Cauvain, S.P., Young, L. (2007) *Technology of bread making*. Springer Science + Business Media, Second Edition
123. Sudha, M. L., Viswanath, P., Siddappa, V., Rajarathnam, S., Shashirekha, M. N. (2016). *Control of rope spore forming bacteria using carambola (Averrhoa carambola) fruit pomace powder in wheat bread preparation*. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 8(4), 555-564.
124. Taylor, M. (Ed.). (2014). *Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality*. Elsevier.
125. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. H. (2006). *Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts*. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 669-675.
126. Torres, J. D., González-Morelo, K., Acevedo, D. (2015). *Análisis del perfil de textura en frutas, productos cárnicos y quesos*. RECITEIA:

- Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos, 14(2), 63-75.
127. Tsiraki, M. I., Karam, L., Abiad, M. G., Yehia, H. M., Savvaidis, I. N. (2017). *Use of natural antimicrobials to improve the quality characteristics of fresh "Phyllo"—A dough-based wheat product—Shelf life assessment*. Food microbiology, 62, 153-159.
128. Vaičiulytė-Funk, L., Žvirdauskienė, R., Šalomskienė, J., Šarkinas, A. (2015). *The Effect Of Wheat Bread Contamination By The Bacillus Genus Bacteria On The Quality And Safety Of Bread*. Žemdirbystė (Agriculture), 102(3), 351-358.
129. Valcárcel-Yamani, B., Rondán-Sanabria, G. G., Finardi-Filho, F. (2013). *The physical, chemical and functional characterization of starches from Andean tubers: oca (Oxalis tuberosa Molina), olluco (Ullucus tuberosus Caldas) and mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón)*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 49(3), 453-464.
130. Valerio, F., Di Biase, M., Huchet, V., Desriac, N., Lonigro, S. L., Lavermicocca, P., Postollec, F. (2015). *Comparison of three Bacillus amyloliquefaciens strains growth behaviour and evaluation of the spoilage risk during bread shelf-life*. Food microbiology, 45, 2-9.
131. Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., SánchezEscalante, J., Sánchez-Escalante, A. (2014). *Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos*. Biotecnia, 16(1), 32-37.
132. Walter, A., Samuel, W., Peter, A., Joseph, O. (2011). *Antibacterial activity of Moringa oleifera and Moringa stenopetala methanol and n-hexane seed extracts on bacteria implicated in water borne diseases*. African Journal of Microbiology Research, 5(2), 153-157.
133. Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, M. S., Dykes, G. A. (2010). *In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria*. Food Control, 21(10), 1408-1414.

134. Wei, Q., Wolf-Hall, C., Hall III, C. A. (2009). *Application of raisin extracts as preservatives in liquid bread and bread systems*. Journal of food science, 74(4).
135. Yanagihara, K., Araki, N., Watanabe, S., Kinebuchi, T., Kaku, M., Maesaki, S., Kadota, J. I. (2012). *Antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of 857 methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from 16 medical centers in Japan*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 72(3), 253-257.
136. Yoh, M., Matsuyama, J., Ohnishi, M., Takagi, K., Miyagi, H., Mori, K., Honda, T. (2005). *Importance of Providencia species as a major cause of travellers' diarrhoea*. Journal of medical microbiology, 54(11), 1077-1082..
137. Zhang, H., Wu, J., Guo, X. (2016). *Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality*. Food Science and Human Wellness, 5(1), 39-48.
138. Zhu, F., Sakulnak, R., Wang, S. (2016). *Effect of black tea on antioxidant, textural, and sensory properties of Chinese steamed bread*. Food chemistry, 194, 1217-1223.
- Walter, A., Samuel, W., Peter, A., Joseph, O. (2011). *Antibacterial activity of Moringa oleifera and Moringa stenopetala methanol and n-hexane seed extracts on bacteria implicated in water borne diseases*. African Journal of Microbiology Research, 5(2), 153-157.

XXX Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos

XXXIV Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos
2, 3 y 4 de noviembre 2017, Nuevo Vallarta, Nayarit, México.

La Universidad de Guadalajara otorga la presente

CONSTANCIA

A: Dimas López, D.J., Güemes Vera, N., Piloni Martini, J., Godínez Oviedo, A.

por su participación como:

**Autores del trabajo libre presentado en modalidad cartel
“Efecto antibacteriano de la cáscara de *Oxalis tuberosa* en bacterias aisladas de
productos de panificación”**


Dra. Ma. Refugio Torres Vitela
Coordinadora General del Evento


Dra. Ruth Padilla Muñoz
Rectora del Centro Universitario de
Ciencias Exactas e Ingenierías


Dr. Oscar Blanco Alonso
Director de la División de Ciencias Básicas del Centro
Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías





COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

It is certified, that:

Denis Dimas; Norma Güemes; Javier Piloni; Aurea Bernardino; Leopoldo González; Aurora Quintero; Sergio Soto

Authors of the work:

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Oxalis tuberosa* PEEL EXTRACTS

Keyword: FTC39DEN20171214

Participated in the **poster** session of the X International Congress, XXI National Congress on Biochemical Engineering and the XVI Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings, held at 21st Century Convention Center, Mérida, Yucatán, México from March, 21st to 23th 2018.



Raúl Chávez Alvircio, IBQ
President



Deifilia Ahuatzí Chacón, PhD
Chair Scientific Committee



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Otorga el presente

4° CONGRESO DE CIENCIA, EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA



RECONOCIMIENTO

A: Denis de Jesús Dimas López, Javier Piloni Martini,
Sergio Soto Simental, Aurora Quintero Lira, Norma
Güemes Vera

Por su valiosa participación y exposición del cartel titulado:

**“EFECTO ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANO DE
EXTRACTO ETANOLICO DE LA CÁSCARA DE *Oxalis
tuberosa* EN LA VIDA DE ANAQUEL DE PAN DULCE”**

que se llevó a cabo los días:
19 al 22 de junio de 2018
en las instalaciones de esta Facultad

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 19 de junio de 2018

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
Jefa de la División de Ciencias Químico Biológicas

4° CONGRESO
CIENCIA. EDUCACIÓN
Y TECNOLOGÍA



4° CONGRESO
CIENCIA. EDUCACIÓN
Y TECNOLOGÍA