



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**“AISLAMIENTO, EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES
ANTIMICROBIANAS DEL JUGO DE ZANAHORIA FRESCO Y
ALMACENADO”**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICA

PRESENTA:

KAREMI MARTÍNEZ ÁNGELES

DIRECTORES DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA PÁEZ HERNÁNDEZ.

DRA. MA. DE LOURDES PACHECO HERNÁNDEZ.

PACHUCA, DE SOTO, HIDALGO, AGOSTO DE 2006.



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química Analítica del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, con el financiamiento parcial del proyecto *“Evaluación, caracterización y aislamiento de fracciones antimicrobianas del jugo de zanahoria. Potencial uso en alimentos como conservador natural contra microorganismos patógenos y deterioradores”* otorgado al Dr. Javier Castro Rosas (clave UA EH-DIP-ICBI-AAQ-119).

Parte de este trabajo se presentó en el XIX Congreso Nacional de Química Analítica, organizado por la Asociación Mexicana de Química Analítica en la ciudad de Guadalajara, Jalisco, del 11 al 13 de octubre de 2005.

DEDICATORIAS

A mis padres Emilio Martínez y Claudia Ángeles

Por estar siempre a mi dado, y por todo el esfuerzo que han realizado para darme lo menor de si.

A mis hermanos Noemí y Josué

Por compartir conmigo todos los momentos de su vida, por su cariño, su lealtad y sobre todo por brindarme siempre su apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena Páez

Por la enorme contribución y tiempo dedicado en la realización de este trabajo, Gracias.

A la Dra. Lourdes Pacheco

Por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado, por su enseñanza y contribución para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Javier Castro

Por las contribuciones hechas al trabajo y el apoyo brindado, gracias.

A los integrantes del jurado

Por las aportaciones al trabajo y el tiempo dedicado al mismo, gracias.

A mis compañeros del laboratorio de Química Analítica

Por todos los momentos compartidos, la agradable estancia y el apoyo brindado durante todo el tiempo de trabajo.

A mis padres y hermanos

Por su sabios consejos, el amor y apoyo otorgado durante toda la carrera y siempre, mil gracias.

A la familia Ángeles Martínez

Gracias por todo el apoyo que me han brindado siempre, por estar a mi lado en todos los momentos de mi vida y por hacer de éstos los más maravillosos.

A la familia Armenta Barrera

Por la hospitalidad brindada a lo largo de mi carrera y por hacerme sentir parte de su familia, gracias.

“Los **amigos** son ángeles que nos llevan en sus brazos cuando nuestras alas no recuerdan como volar”, gracias a todos mis amigos por su sincera amistad, por estar siempre a mi lado y por el apoyo brindado en todo momento.

ÍNDICE

	Página
<i>Índice de figuras, tablas y espectros</i>	<i>i</i>
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
1.1 Generalidades sobre las zanahorias	5
1.1.1 Origen	6
1.1.2 Diversidad y tipos	6
1.1.3 Composición química y propiedades de la zanahoria	8
1.2 Técnicas de evaluación de la actividad antimicrobiana.	11
1.2.1 Métodos de difusión	11
1.2.1.1 Técnica de difusión en disco	12
1.2.1.2. Técnica de difusión en pozo	12
1.2.2 Técnica de inoculación directa	12
1.2.3 Técnica del <i>bioscreen</i>	12
1.3 Estudios preliminares acerca de la actividad antimicrobiana de la Zanahoria	13
II. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos específicos	17
III. METODOLOGÍA	18
3.1 Materiales y reactivos	19
3.2 Obtención del jugo de zanahoria y su almacenamiento	19
3.3 Extracción de componentes antimicrobianos	20
3.4 Evaluación antimicrobiana	21
3.4.1 Microorganismos de prueba	21
3.4.2 Medios de cultivo	22
3.4.3 Preparación del inóculo	22
3.4.4 Técnicas para la evaluación antimicrobiana	23
3.4.4.1 Técnica de difusión en disco	23

3.4.4.2 Técnica de difusión en pozo	23
3.4.4.3 Técnica de inoculación directa	24
3.4.4.4 Técnica del <i>bioscreen</i>	25
3.5 Extracción de los compuestos presentes en los extractos activos	26
3.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones colectadas	26
3.7 Caracterización de los compuestos con actividad antimicrobiana	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 Extracción de componentes antimicrobianos	29
4.2 Evaluación antimicrobiana de los extractos obtenidos	29
4.2.1 Técnica de difusión en disco	29
4.2.2 Técnica de difusión en pozo	29
4.2.3 Técnica de inoculación directa	30
4.3 Separación de los compuestos presentes en los extractos primarios	
Activos	32
4.4 Evaluación antimicrobiana de cada una de las fracciones obtenidas	32
4.5 Caracterización de los compuestos con actividad antimicrobiana	36
4.5.1 Espectroscopía de infrarrojo	36
4.5.1.1 Fracción 7 del jugo 1 (J1-7)	36
4.5.1.2 Fracción 2 del jugo 2 (J2-2)	36
4.5.1.3 Fracción 3 del jugo 2 (J2-3)	37
4.5.1.4 Fracción 6 del jugo 2 (J2-6)	37
4.5.1.5 Fracción 8 del jugo 2 (J2-8)	37
4.5.1.6 Fracción 9 del jugo 2 (J2-9)	37
4.5.1.7 Fracción 11 del jugo 2 (J2-11)	38
4.5.2 Espectrometría de masas	38
4.5.2.1 Fracción 7 del jugo 1	38
4.5.2.2 Fracción 2 del jugo 2	38
4.5.2.3 Fracción 3 del jugo 2	38
4.5.2.4 Fracción 6 del jugo 2	39
4.5.2.5 Fracción 8 del jugo 2	39
4.5.2.6 Fracción 9 del jugo 2	39
4.5.2.7 Fracción 11 del jugo 2	39

4.5.3 Identificación de los compuestos con actividad antimicrobiana	39
4.5.3.1 Metil éster del ácido pentadecanóico	39
4.5.3.2 Ácido hexadecanóico	42
V. CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	48
ANEXOS	52
ANEXO 1. Características generales de las bacterias a estudiar	53
ANEXO 2. Espectros de IR y MS para los extractos secundarios con actividad antimicrobiana del jugo de zanahoria	58

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Principales colores de la zanahoria.	5
Figura 2. Estructura de los carotenos más abundantes en la zanahoria.	8
Figura 3. Principales poliacetilenos de la zanahoria.	10
Figura 4. Estructura de la cumarina 6-metoximeleina, fitoalexina presente en la zanahoria.	10
Figura 5. Estructuras de compuestos aislados a partir del extracto hexánico de semillas de zanahoria.	15
Figura 6. Esquema de la metodología seguida para el desarrollo de este trabajo.	19
Figura 7. Preparación del inóculo para la prueba antimicrobiana.	22
Figura 8. Metodología de las técnicas de difusión en disco y pozo.	24
Figura 9. Metodología empleada en la inoculación directa.	25
Figura 10. Cinética del crecimiento microbiano de las fracciones del J2 activas contra <i>Listeria monocytogenes</i> .	34
Figura 11. Cinética del crecimiento microbiano de las fracciones del J1 y J2 activas contra <i>Vibrio cholerae</i> .	34
Figura 12. Estructura del metil éster del ácido pentadecanóico.	39
Figura 13. Espectro IR reportado para el metil éster del ácido pentadecanóico.	40
Figura 14. Espectro de IR en película de CsI para la fracción 7 del jugo 1 (J1-7)	40
Figura 15. Espectro de masas reportado para el metil éster del ácido pentadecanóico.	41
Figura 16. Espectro de masas correspondiente a la fracción 7 del jugo 1.	41

Figura 17. Estructura del ácido hexadecanóico.	42
Figura 18. Espectro IR reportado para el ácido hexadecanóico.	42
Figura 19. Espectro de IR en película de CsI para la fracción 11 del jugo 2 (J2-11).	43
Figura 20. Espectro de masas reportado para el ácido hexadecanóico.	43
Figura 21. Espectro de masas para la fracción 11 del jugo 2 (J2-11).	44
Figura 22. <i>Listeria monocytogenes</i> .	53
Figura 23. <i>Vibrio cholerae</i> .	54
Figura 24. <i>Salmonella typhimurium</i> .	55
Figura 25. <i>Staphylococcus aureus</i> .	56
Figura 26. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	57

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación de las zanahorias.	7
Tabla 2. Propiedades de la zanahoria de acuerdo a su pigmentación.	11
Tabla 3. Disolventes utilizados para la obtención de los extractos.	21
Tabla 4. Microorganismos empleados en este trabajo para evaluar la actividad antimicrobiana.	21
Tabla 5. Disolventes utilizados para la cromatografía en columna.	27
Tabla 6. Resultados de la evaluación antimicrobiana (Técnica de difusión en pozo) de los extractos de jugo fresco.	30
Tabla 7. Resultados de la evaluación antimicrobiana (Técnica de difusión en pozo) de los extractos de jugo almacenado en refrigeración.	30
Tabla 8. Resultados de la evaluación antimicrobiana (Técnica de inoculación directa) de los extractos de jugo fresco.	31
Tabla 9. Resultados de la evaluación antimicrobiana (Técnica de inoculación directa) de los extractos de jugo almacenado en refrigeración.	31
Tabla 10. Resultados de la evaluación antimicrobiana de las fracciones obtenidas del jugo 1.	33
Tabla 11. Resultados de la evaluación antimicrobiana de las fracciones obtenidas del jugo 2.	33
Tabla 12. Fracciones activas del J1 contra <i>Vibrio cholerea</i> .	35
Tabla 13. Fracciones activas del J2 contra <i>Vibrio cholerae</i> .	35
Tabla 14. Fracciones activas del J2 contra <i>Listeria monocytogenes</i> .	35

Índice de Cromatogramas y Espectros

	Página
Espectro 1. Espectro de IR en película de Csl para la fracción 2 del jugo 2 (J2-2).	58
Espectro 2. Espectro de IR en película de Csl para la fracción 3 del jugo 2 (J2-3).	58
Espectro 3. Espectro de IR en película de Csl para la fracción 6 del jugo 2 (J2-6).	59
Espectro 4. Espectro de IR en película de Csl para la fracción 8 del jugo 2 (J2-8).	59
Espectro 5. Espectro de IR en película de Csl para la fracción 9 del jugo 2 (J2-9).	60
Cromatograma 1. Cromatograma de la fracción 7 del jugo 1, obtenido por GC-MS.	60
Espectro 6. Espectro de masas para la fracción 2 del jugo 2 (J2-2).	61
Espectro 7. Espectro de masas para la fracción 3 del jugo 2 (J2-3).	61
Espectro 8. Espectro de masas para la fracción 6 del jugo 2 (J2-6).	62
Espectro 9. Espectro de masas para la fracción 8 del jugo 2 (J2-8).	62
Espectro 10. Espectro de masas para la fracción 9 del jugo 2 (J2-9).	63

INTRODUCCIÓN

Introducción

El uso de sustancias naturales con fines terapéuticos es tan antiguo como el hombre; las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos, por lo que se profundizó en el conocimiento de las especies vegetales con propiedades medicinales para ampliar el uso de los productos que de éstas se extraen. Desde entonces los extractos de plantas y productos derivados de éstos se han utilizado para atender diversas enfermedades y aunque durante el transcurso del tiempo su uso ha disminuido por la llegada de los antibióticos derivados de microorganismos, en años recientes ha resurgido un gran interés por la búsqueda de agentes antimicrobianos en fuentes naturales, es decir, que sean posibles de encontrar en alimentos tanto de origen animal como vegetal.

En los vegetales las sustancias con efecto antimicrobiano pueden localizarse en diferentes partes, incluidas hojas, tallos, semillas, frutos y raíces; algunas de estas sustancias son constitutivas de los fluidos o tejidos, mientras que otras se generan en respuesta a infecciones y ciertas condiciones de estrés provocadas por diversos factores. Estas sustancias antimicrobianas pueden tener un efecto variado sobre los microorganismos; algunas muestran un amplio espectro de inhibición mientras que otras solo afectan a ciertos grupos. Actualmente, diversos estudios han demostrado que las verduras como la col, los rábanos, la coliflor, espinacas o col de Bruselas, generan sustancias antimicrobianas; principalmente derivados del ácido hidroxicinámico. En las frutas, los ácidos presentes en el mesocarpio funcionan como un mecanismo protector contra la eventual invasión microbiana a las semillas. También es muy común que entre las plantas de la familia *Umbelliferae* como el perejil, apio, zanahorias y *Rutaceae*, como la toronja, limas y naranjas, se lleve a cabo la producción de fitoalexinas. Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos presentes en un amplio grupo de especies vegetales y cuya producción se incrementa cuando estos vegetales entran en una condición de estrés por efecto de factores ambientales (cambios en la temperatura o exposición a iones metálicos) o microbianos (infección por bacterias u hongos).

Entre otros alimentos que han demostrado tener actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos se encuentran el clavo, ajo, orégano y en estudios recientes se ha observado que la zanahoria puede generar sustancias que afectan la viabilidad o

desarrollo de microorganismos. En la actualidad la demanda del público por consumir alimentos no procesados o mínimamente procesados va en aumento, y los extractos de especias como el ajo o verduras como la zanahoria pueden ser una alternativa de antimicrobianos naturales con aplicación en alimentos.

En este trabajo se realizaron estudios para aislar, purificar e identificar los compuestos con propiedades antimicrobianas presentes en el jugo de zanahoria fresco y almacenado en refrigeración. Los resultados muestran que en la fracción activa se encuentran compuestos como el ácido hexadecanóico y metil éster del ácido pentadecanóico.

I. ANTECEDENTES

I. Antecedentes

1.1 Generalidades sobre las zanahorias

La zanahoria (*Daucus carota*) es una planta que pertenece a la familia *Umbelliferae*, su raíz es usada como alimento y está considerada como uno de los recursos terapéuticos más valiosos para tratar ciertos padecimientos (colesterol, degeneración macular, desórdenes digestivos, anemia, etc) siendo la más mineralizante y vitaminizante de todas las raíces [1,2]. Su color suele ser anaranjado, aunque existen variedades de color blanco, rojo o amarillo, incluso algunas de origen asiático tienen la peridermis (cáscara) de color morado (Figura 1).



Figura 1. Principales colores de la zanahoria.

Aunque existe variedad en el color de la raíz, las especies de zanahoria mayormente cultivadas en la actualidad tienen la peridermis de color naranja y la intensidad de éste se debe al alto contenido de carotenoides. La presencia de este pigmento color naranja hizo que las zanahorias fueran apreciadas como un producto de gran valor nutricional ya que en 1919 se descubrió que los carotenoides son un aporte de provitamina A que se degrada a vitamina A en el organismo. Dicha apreciación se ha visto aumentada a partir de la década de los 70', ya que diversos estudios han demostrado que los alimentos ricos en

pigmentos como el caroteno tienen la capacidad de eliminar las toxinas del organismo, disolver los cálculos biliares, prevenir ciertas enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y el envejecimiento celular debido a sus propiedades antioxidantes [2]. En el caso de la zanahoria el contenido de carotenoides es entre 10 hasta 1000 veces más alto que en la mayoría de las hortalizas.

1.1.1 Origen







La zanahoria tiene su origen en la zona este del Mediterráneo y el Sudoeste de Asia; algunos autores especifican a Afganistán como el centro de origen exacto debido a la mayor diversidad de formas silvestres que se encuentran en ese país, y el resto de las áreas de la zona señalada serían centros secundarios de diversidad y domesticación.

Aunque la especie inicialmente de raíz amarilla o púrpura ya había sido usada por los antiguos griegos y romanos con fines medicinales, las primeras evidencias de su cultivo en Asia Menor son del siglo X, y sólo entre los siglos XIV y XVII se hace popular en Europa y Asia, siendo Holanda el primer país en que se registra el cultivo de zanahorias anaranjadas. A pesar de su relativamente reciente introducción al cultivo, la zanahoria es hoy en día una especie cultivada en todo el mundo; siendo China, Estados Unidos, Rusia, Polonia y el Reino Unido los principales productores [2].

1.1.2 Diversidad y tipos

Existe una multitud de variedades de zanahoria que pueden clasificarse de diversas maneras ya sea atendiendo a su color, origen, forma, etc. Sin embargo, el criterio más usual para agrupar los distintos cultivares de zanahorias es con base en el tamaño de la raíz (tabla 1) y de acuerdo a esta clasificación existen variedades cortas, las cuales no superan los 10 cm de longitud y son casi esféricas, largas, cuya longitud puede superar los 20 cm y semi-largas, siendo éstas últimas las de consumo más habitual [1, 3, 4].

Tabla 1. Clasificación de las zanahorias.

TIPO	CARACTERÍSTICAS
<p><i>Chantenay</i></p> 	<p>Raíz de tamaño medio con un peso cercano a 150 g, de un largo variable entre 12 y 17 cm, forma cilíndrica cónica y color naranja.</p>
<p><i>Flakee</i></p> 	<p>Raíz de gran tamaño con un peso superior a 250 g y de un largo mayor a 25 cm, forma levemente cónica y color naranja suave.</p>
<p><i>Imperator</i></p> 	<p>Raíz delgada con un peso cercano a 150 g, de un largo superior a 20 cm, color naranja intenso y un acentuado sabor dulce.</p>
<p><i>Ladyfinger</i></p> 	<p>Raíz pequeña con un peso de pocos gramos y un largo inferior a 10 cm, tiene forma cilíndrica con punta redondeada y un color naranja intenso</p>
<p><i>Nante</i></p> 	<p>Raíz de tamaño medio con un peso cercano a 150 g, un largo variable entre 15 a 20 cm y un grosor de 3 cm, tiene forma cilíndrica y color naranja intenso.</p>
<p><i>Redonda</i></p> 	<p>Raíz de forma esférica y pequeña.</p>

1.1.3 Composición química y propiedades de la zanahoria.

La zanahoria está constituida por grandes cantidades de agua, carbohidratos (principalmente sucrosa, glucosa y fructosa) y fibra. También contiene una gran variedad de compuestos que representan, desde el punto de vista nutricional, el aspecto más destacable de este alimento. Dentro de los compuestos con un alto valor nutricional presentes en la zanahoria destacan las vitaminas y los minerales. En cuanto al aporte vitamínico, la raíz contiene gran cantidad de carotenoides con actividad provitamínica A, es decir, que se transforman en vitamina A dentro del organismo, esta vitamina es necesaria para el buen funcionamiento de la retina y especialmente para la visión nocturna, el buen estado de la piel y mucosas. El compuesto más abundante que presenta dicha actividad es el β -caroteno (Figura 2) al que algunos estudios le han atribuido un papel preventivo frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y envejecimiento celular, dada su capacidad antioxidante [5]. Le sigue el α -caroteno (Figura 2), cuyos niveles séricos se han relacionado inversamente con la presencia de enfermedad coronaria y formación de placa arterial, además también contiene cantidades traza de criptoxantina.

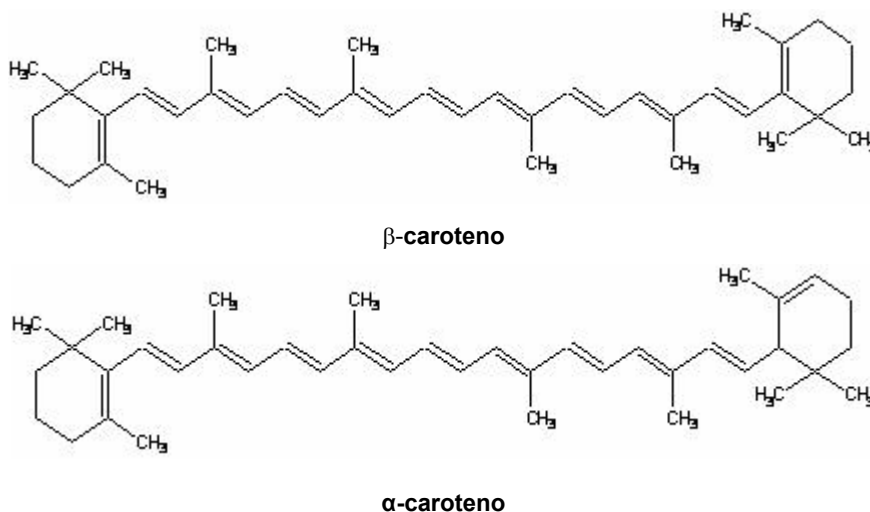


Figura 2. Estructura de los carotenos más abundantes en la zanahoria.

Otros carotenoides sin actividad provitamínica A están presentes en la zanahoria; entre estos encontramos a la luteína y estudios recientes han relacionado su baja ingesta con bajos niveles en sangre lo que ocasiona un mayor

riesgo de infarto de miocardio, así como un riesgo más elevado de infarto cerebral. Otras vitaminas presentes en la zanahoria son el ácido fólico, vitamina C y pequeñas cantidades de niacina, piridoxina, tiamina y riboflavina. También posee una gran variedad de minerales y oligoelementos como el hierro, fósforo, magnesio, zinc, selenio, sodio y potasio. Contiene además ácidos cafeico y ferúlico fundamentalmente, compuestos que han demostrado tener una importante acción antioxidante, así como cantidades menores de ácido clorogénico y p-cumárico. También aporta ciertas cantidades de fitoesteroles, siendo el mayoritario el β -sitosterol, seguido del estigmasterol y campesterol, que tienen la capacidad de bloquear la absorción del colesterol, facilitando su excreción, y disminuyendo, por tanto sus niveles en sangre [5].

Además de los compuestos con aporte nutricional, la zanahoria contiene sustancias bioactivas que son indispensables a largo plazo para nuestra salud, intervienen ejerciendo un efecto protector del sistema circulatorio, reductor de la presión sanguínea, regulador de la glucemia y la colesterolemia, reductor del riesgo de cáncer y mejorador de la respuesta defensiva inmunitaria de nuestro cuerpo. Las fitoalexinas (poliacetilenos y coumarinas), además de los carotenoides están en el grupo de los compuestos bioactivos y tienen un papel significativo dentro de las propiedades de la zanahoria que promueven la salud. Los poliacetilenos del tipo falcarinol (falcarinol, falcarindiol, y falcarindiol-3-acetato) (Figura 3) son un grupo de compuestos biológicamente activos debido a que presentan una actividad biológica considerable para un amplio rango de microorganismos [6].

El falcarinol y falcarindiol han sido investigados como sustancias importantes que oponen resistencia a las enfermedades de las plantas. En las zanahorias, estos compuestos restringen el desarrollo de lesiones causadas por hongos durante el proceso de almacenamiento y en estudios recientes se ha observado que el falcarinol tiene un importante efecto en la prevención del cáncer [7,8].

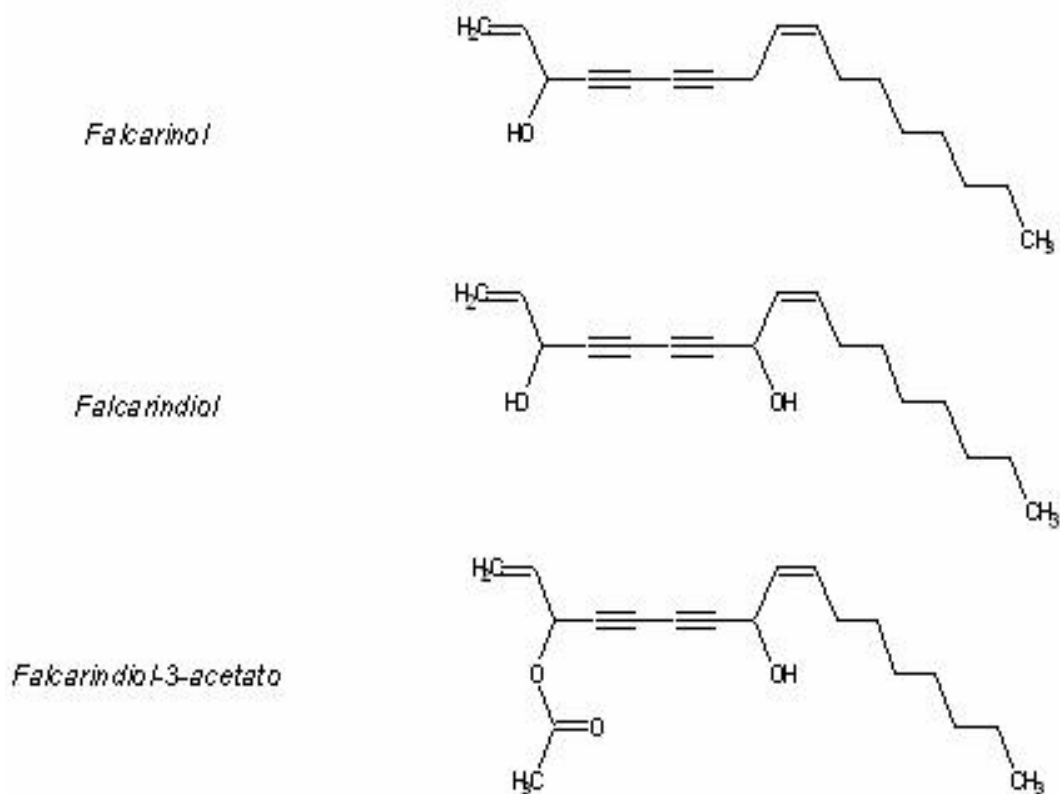


Figura 3. Principales poliacetilenos de la zanahoria

Una de las más importantes fitoalexinas en la zanahoria es la cumarina 6-metoximeleina (Figura 4), la cual se acumula en respuesta a infecciones por hongos, enzimas pectinolíticas, exposición a etileno y radiación UV. Esta fitoalexina es biológicamente activa contra un amplio espectro de microorganismos incluyendo bacterias. El aspecto más destacable de esta fitoalexina es que recientemente se le ha atribuido una actividad anticarcinogénica así como una acción preventiva en la coagulación de la sangre [9, 10].

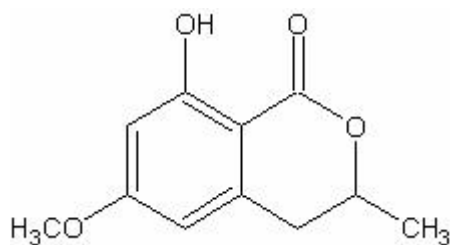






Figura 4. Estructura de la cumarina 6-metoximeleina, fitoalexina presente en la zanahoria

Otro aspecto destacable de las zanahorias se encuentra en la variedad de colores, ya que cada pigmento le otorga una propiedad diferente (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades de la zanahoria de acuerdo a su pigmentación.

Color de la zanahoria	Propiedades
<p>Naranjas</p> 	<p>Estas zanahorias deben su color al α y β-caroteno, cuya característica principal es que son precursores de la vitamina A que es esencial para la visión nocturna.</p>
<p>Amarillas</p> 	<p>Contienen xantofilas, un pigmento que ayuda a los ojos contra la degeneración macular, y en la prevención del cáncer de pulmón y otros tipos de cáncer.</p>
<p>Rojas</p> 	<p>Contienen licopeno, pigmento que ayuda a prevenir las enfermedades del corazón y algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de próstata.</p>
<p>Púrpuras</p> 	<p>El pigmento de estas zanahorias son las antocianinas, las cuales previenen el envejecimiento de las células debido a su poder antioxidante.</p>

1.2 Técnicas de evaluación de la actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana de los extractos de plantas puede ser detectada por la observación del efecto sobre el crecimiento de varios microorganismos después del contacto con ellas.

1.2.1 Métodos de difusión.

El método más comúnmente utilizado para determinar la actividad antimicrobiana es el método de difusión en agar; en ésta técnica, un reservorio o pozo que contiene el extracto se pone en contacto con un medio inoculado con el microorganismo de prueba y después de incubar se observa un halo de inhibición

alrededor del reservorio que indica la actividad antimicrobiana del extracto. Diferentes tipos de reservorios pueden ser empleados incluyendo discos de papel filtro, cilindros de porcelana o acero inoxidable colocados en la superficie o pozos hechos en el medio de cultivo sólido [11].

1.2.1.1 Técnica de difusión en disco.

Método basado en el trabajo de Bauer-Kirby; que consiste en depositar discos de papel filtro impregnados con el antibiótico en la superficie del agar previamente inoculado con el microorganismo de prueba, y después de incubar se observa la presencia de un halo de inhibición alrededor del disco de papel filtro.

1.2.1.2. Técnica de difusión en pozo

Consiste en hacer pozos en el medio de cultivo sólido previamente inoculado con el microorganismo y colocar en ellos el antibiótico. Este método de difusión es adecuado para ensayos con suspensiones acuosas de extractos, por lo que resulta menos probable que la presencia de partículas suspendidas en la muestra interfieran en la difusión de las sustancias antimicrobianas dentro del agar.

1.2.2 Técnica de Inoculación directa.

En esta técnica el extracto se pone en contacto directo con el microorganismo de prueba, después de 24 h se le agrega un medio de cultivo y se incuba, transcurrido el tiempo de incubación se observa si hay desarrollo o inhibición del microorganismo bajo estudio.

1.2.3 Técnica del *bioscreen*.

Consiste en seguir la cinética del crecimiento microbiano en un medio selectivo (caldo soya tripticaseina) que contiene los extractos que mostraron inhibición. Las curvas de crecimiento se obtienen mediante un lector de microplacas (*bioscreen*) que registra las variaciones de la densidad óptica (absorbancia) a través del tiempo, y donde la densidad óptica del medio es proporcional al desarrollo de los microorganismos [12].

1.3 Estudios preliminares acerca de la actividad antimicrobiana de la zanahoria.

Los compuestos con actividad antimicrobiana existen de manera natural por lo que podemos encontrarlos en el medio ambiente. Desde la antigüedad las plantas y vegetales han sido objeto de estudio en la búsqueda de agentes antimicrobianos, y aunque su uso se ha visto disminuido por la aparición de los antibióticos derivados de microorganismos, siguen representando una alternativa en el uso de éstos como antimicrobianos de origen natural. Dentro de la gran variedad de plantas y vegetales que han sido estudiados por sus propiedades antimicrobianas se encuentran: el clavo, ajo, orégano y recientes investigaciones han demostrado que la zanahoria es capaz de inhibir el desarrollo de algunos microorganismos de importancia sanitaria; específicamente se ha observado un efecto antimicrobiano sobre el desarrollo de *Listeria monocytogenes*.

La investigación realizada por Beuchat y Brackett sobre la sobrevivencia de *Listeria* inoculada en zanahoria demostró que ésta es capaz de inhibir el desarrollo del microorganismo. Las zanahorias enteras, rebanadas, cocidas y en jugo fueron inoculadas con el microorganismo y transcurrido el periodo de incubación los resultados obtenidos mostraron que en las zanahorias rebanadas y en el jugo había muy pocas células de *Listeria* en comparación con las zanahorias enteras y cocidas. La presencia de pocas células de *Listeria* sugiere que se generan naturalmente constituyentes o fitoalexinas en fluidos celulares y/o vasculares; que son producidos o liberados como resultado de la ruptura de las células de la zanahoria y que tienen un efecto tóxico para los microorganismos [13].

En la zanahoria las fitoalexinas que se han identificado son la 6-metoximeleina, eugenina, miristicina y el falcarindiol. De éstas la 6-metoximeleina es a la que se le atribuye la mayor actividad antimicrobiana ya que inhibe el crecimiento de bacterias y hongos [14].

En otra investigación realizada respecto a las propiedades antimicrobianas de la zanahoria contra *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida lambica* y *Escherichia coli*, se propuso a los ácidos grasos saturados (ácido dodecanóico) y a los metil ésteres de ácidos grasos saturados (dodecanóico y pentadecanóico) como los posibles responsables de dicha actividad [15].

Una investigación realizada sobre los compuestos presentes en las semillas de zanahoria [16] reportó que los compuestos aislados a partir del extracto hexánico fueron: 2,4,5-tri-metoxibenzaldehido, ácido oleico, trans-asarona y geraniol (figura 5). Con base en el hecho de que las plantas tienen sus propios mecanismos de defensa para protegerse de las plagas y que varios de sus productos secundarios han sido asociados a dicha actividad; cada uno de los compuestos aislados se sometió a ensayos contra levaduras, nemátodos e insectos. Los resultados de estos ensayos mostraron que sólo trans-asarona fue activo en el ensayo nematicida contra *C. elegans* y *P. redivivus*, en el ensayo insecticida contra *H. zea*, *H. virescens* y *M. sexta*, además de inhibir también el desarrollo de las levaduras *C. albicans*, *C. kruseii* y *C. parapsilasis*.

La actividad mosquiticida y nematicida de trans-asarona en conjunción con otras actividades como controlador de varias plagas sugiere que este compuesto tiene el potencial para ser desarrollado como un producto natural controlador de plagas y que podría sustituir a los agentes sintéticos del mercado [16].

Hasta el momento la zanahoria ha sido reconocida como una raíz rica en vitaminas, minerales y otros compuestos con propiedades benéficas para nuestra salud; pero recientes investigaciones relacionadas con sus propiedades antimicrobianas hacen que esta raíz se convierta en una fuente de compuestos antimicrobianos naturales que podrían contribuir a garantizar la inocuidad y mejorar la calidad de alimentos mínimamente procesados. Por esta razón, en este trabajo se realizaron estudios para aislar, purificar e identificar los compuestos con

propiedades antimicrobianas presentes en el jugo de zanahoria fresco y almacenado en refrigeración.

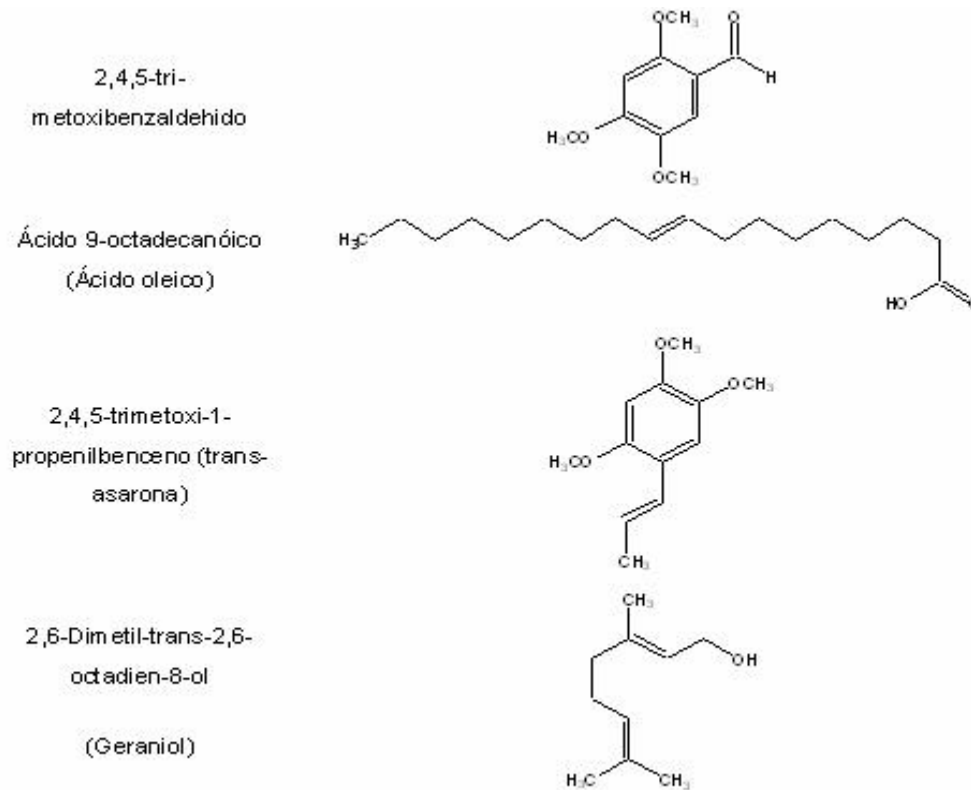


Figura 5. Estructuras de compuestos aislados a partir del extracto hexánico de semillas de zanahoria.

II. OBJETIVOS

II. Objetivos

2.1 Objetivo general

Aislar, evaluar y caracterizar algunos de los compuestos con actividad antimicrobiana presentes en el jugo de zanahoria.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antimicrobiana del jugo fresco y almacenado en refrigeración.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de los jugos de zanahoria.
- Separar los compuestos presentes en los extractos activos mediante el empleo de técnicas cromatográficas convencionales.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas a partir de los extractos crudos.
- Determinar la estructura de los compuestos presentes en las fracciones activas mediante el empleo de diversos métodos espectroscópicos.

III. METODOLOGÍA

III. Metodología experimental

La metodología que se empleó en el desarrollo del presente proyecto se muestra en la Figura 6, e involucra la obtención del jugo de zanahoria, el almacenamiento en refrigeración, la obtención de los extractos con diferentes solventes, la evaluación antimicrobiana de cada uno de los extractos, el fraccionamiento de los extractos activos, la evaluación antimicrobiana de cada una de las fracciones obtenidas y la identificación de los compuestos que mostraron dicha actividad.

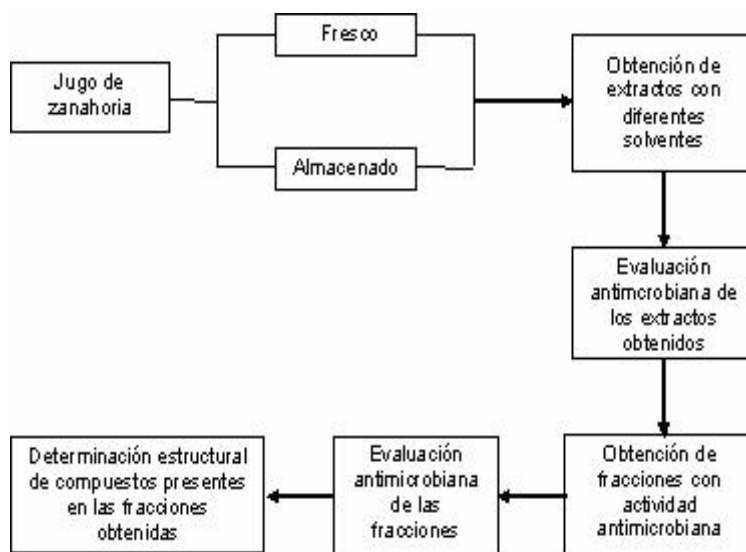


Figura 6. Esquema de la metodología seguida para el desarrollo de este trabajo.

3.1 Materiales y reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico, y se emplearon tal y como se proporcionaron por el proveedor. Todas las soluciones se prepararon utilizando agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega/\text{cm}^{-1}$) obtenida en un desionizador marca Millipore, modelo Academic.

3.2 Obtención del jugo de zanahoria y su almacenamiento.

Un lote de 2 kg de zanahoria tipo chantenay fue adquirido en el supermercado, se sometió a un proceso de lavado con agua y jabón y se obtuvo su jugo utilizando

un extractor. El jugo se guardó en frascos estériles y se etiquetaron como jugo (1) y jugo (2) donde:

- (1) Corresponde al jugo fresco utilizado inmediatamente para las diversas pruebas.
- (2) Corresponde al jugo puesto inmediatamente en refrigeración (7°C) durante un periodo de ocho días, al término del cual se utilizó para las diversas pruebas.

La opción de almacenar el jugo de zanahoria y el tiempo de almacenamiento (TA) del mismo, se realizó considerando que estudios previos han demostrado que el TA de los vegetales tiene influencia significativa sobre la concentración y/o producción de algunos compuestos que presentan actividad antimicrobiana [6]. Con este fin se realizó un estudio previo en el que se evaluó la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* y *Vibrio cholerae*, del jugo extraído (fresco y refrigerado) de la zanahoria (jugo sin fraccionar). Se encontró que la actividad antimicrobiana del jugo refrigerado (almacenado) fue mayor que la del jugo fresco, no habiendo diferencias significativas entre el jugo almacenado a los 8 y 20 días de refrigeración, optándose en este estudio, por trabajar a los 8 días de almacenamiento.

3.3 Extracción de componentes antimicrobianos

Con la finalidad de realizar el estudio de la extracción por solventes de los componentes antimicrobianos, se hicieron estudios previos por cromatografía en capa fina para elegir los disolventes adecuados que permitieran fraccionar los componentes del jugo de zanahoria. Para el análisis cromatográfico cualitativo en capa fina, se emplearon placas de aluminio recubiertas con sílica gel (Merck). Como reveladores se utilizó yodo elemental, lámpara de luz ultravioleta y ácido sulfúrico. Fueron utilizados disolventes con diferente constante dieléctrica y, con base en la migración o separación del mayor número de compuestos presentes en el jugo de zanahoria, se eligieron los disolventes que se muestran en la tabla 3 para la obtención de extractos.

Posteriormente, se realizaron 7 extracciones sucesivas de 5 mL de jugo con 5 mL de cada solvente y se concentraron en un rotavapor (quedando aproximadamente 2 mL del extracto en solución acuosa, excepto el extracto con hexano) para evitar la presencia del solvente en las pruebas antimicrobianas (los extractos se mantuvieron en congelación hasta la evaluación antimicrobiana). Algunos estudios se realizaron agregando 3 mL de una solución de Tween 20 al 1% y en otros los extractos se evaluaron dejándolos en solución acuosa.

Tabla 3. Disolventes utilizados para la obtención de los extractos.

Disolventes	Proporción	Polaridad
Etanol	100%	24.6
Metanol	100%	32.7
Acetona	100%	20.7
Hexano	100%	1.9
Acetona:Etanol	50:50	22.6
Metanol: Agua	50:50	56.4

3.4 Evaluación antimicrobiana

3.4.1 Microorganismos de prueba

Para la evaluación antimicrobiana fueron elegidos diferentes microorganismos considerando su importancia sanitaria y los estudios anteriores reportados al respecto [13, 15]. Los microorganismos estudiados se muestran en la tabla 4. Las cepas fueron obtenidas en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y se mantuvieron en refrigeración en tubos con agar inclinado de soya y tripticaseína.

Tabla 4. Microorganismos empleados en este trabajo para evaluar la actividad antimicrobiana.

<i>Bacterias Gram negativas</i>	<i>Bacterias Gram positivas</i>
<i>Vibrio cholere</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	

3.4.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estos medios fueron: Agar de Soya y Trypticaseina (TSA) y caldo soya tripticaseina.

3.4.3 Preparación del inóculo

La metodología empleada se muestra en la figura 7.

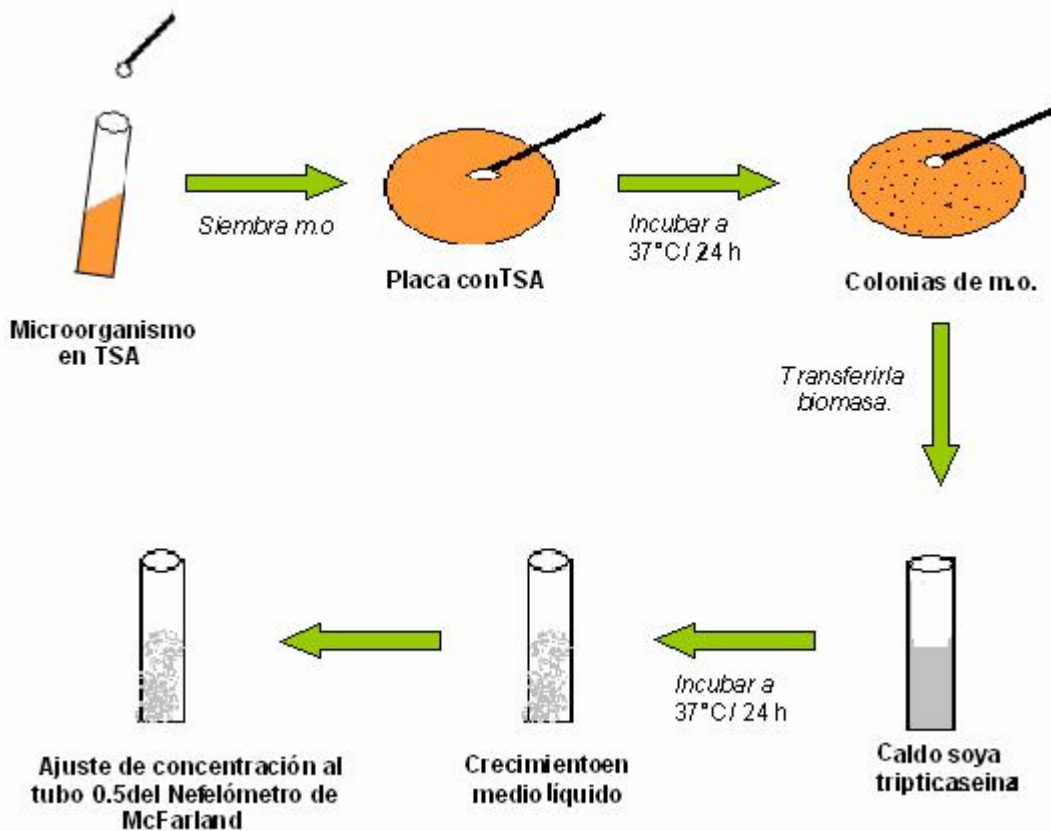


Figura 7. Preparación del inóculo para la prueba antimicrobiana.

A partir de un cultivo puro de cada microorganismo, en un tubo inclinado conteniendo TSA, se sembraron las cepas de prueba por estría cruzada en placas de TSA y se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se eligieron colonias del mismo tipo morfológico y con un asa bacteriológica se transfirió la biomasa a

un tubo que contenía caldo soya tripticaseina y nuevamente se incubó a 37°C durante 24 h. Al observarse el crecimiento en medio líquido de las cepas de prueba, se procedió a realizar el ajuste de su concentración con el fin de estandarizar el inóculo de cada ensayo. Para ello, el cultivo se diluyó y se ajustó al tubo número 0.5 del Nefelómetro de McFarland, que equivale a tener una concentración de 1×10^8 células/mL. El Nefelómetro de McFarland es un estándar de turbidez que permite estimar la concentración de bacterias en una suspensión.

3.4.4 Técnicas para la evaluación antimicrobiana

3.4.4.1 Técnica de difusión en disco

Una vez ajustada la suspensión celular (1×10^8 células/mL) se realizaron diluciones hasta obtener una concentración de 1×10^3 células/mL. Posteriormente, 100 μ l de la dilución se distribuyeron uniformemente con una varilla de vidrio estéril en forma de “L” sobre placas que contenían TSA y rifampicina (antibiótico activo frente a un gran número de bacterias, y al que son resistentes las cepas bajo estudio). Finalmente, se dejaron reposar a temperatura ambiente para favorecer la adsorción del inóculo sobre la superficie del agar.

Sobre las placas de TSA inoculadas con la bacteria se colocaron discos de papel filtro (0.5 cm de diámetro) que sirvieron como soporte de los extractos. En cada uno de estos discos se colocaron 20 μ L del extracto concentrado de etanol, metanol, acetona, hexano, mezclas de acetona:etanol (1:1) y metanol:agua (1:1) respectivamente. Posteriormente las placas se dejaron reposar y se incubaron a 37°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la lectura de las placas; el extracto se consideró activo cuando se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco, en el caso contrario el extracto se consideró inactivo.

3.4.4.2 Técnica de difusión en pozo

A las placas de TSA inoculadas con cada una de las cepas se les realizaron seis perforaciones con un diámetro de 0.5 cm. En cada uno de los pozos se colocó 100 μ L de cada uno de los extractos y las placas se dejaron reposar durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron a 37°C por 24 h. Transcurrido

el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura de las mismas; el extracto se consideró activo cuando se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del pozo; en el caso contrario el extracto se consideró inactivo.

En la Figura 8 se muestra de manera resumida la metodología empleada en las técnicas de difusión en disco y pozo.

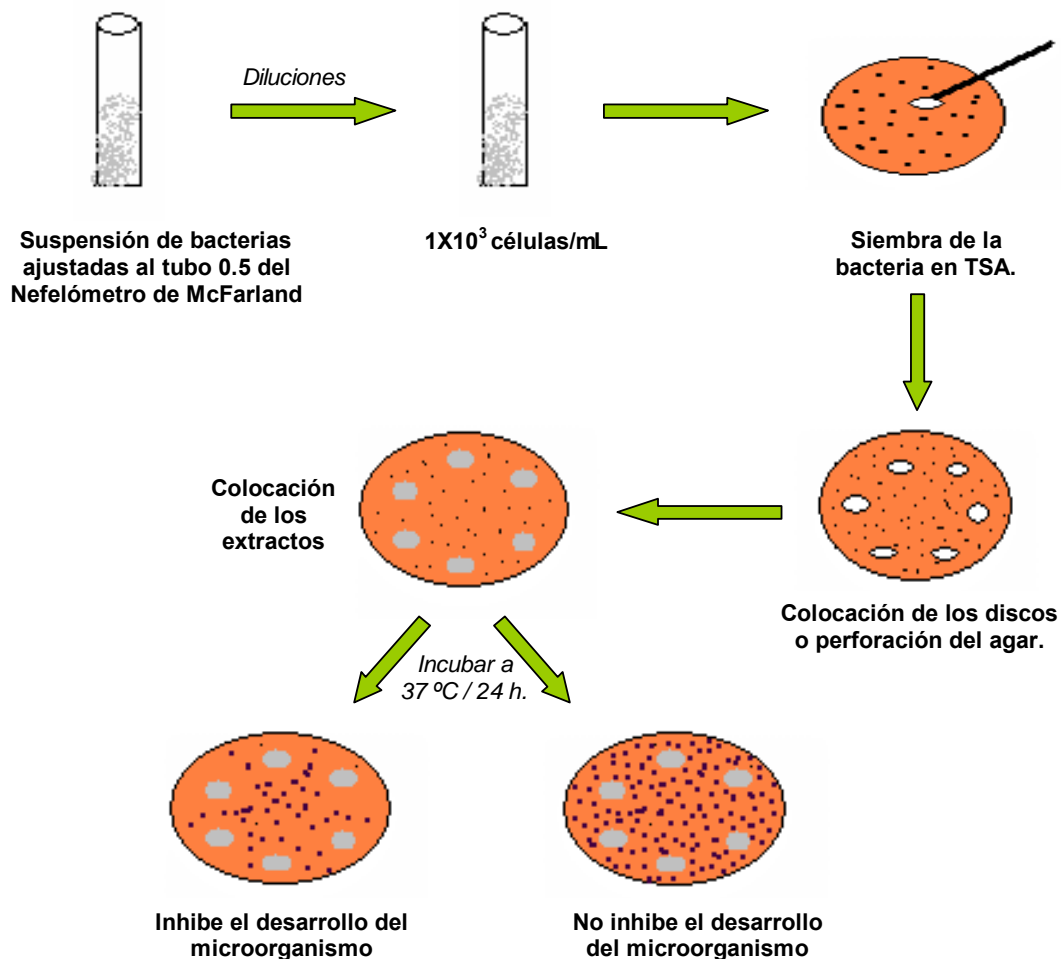


Figura 8. Metodología de las técnicas de difusión en disco y pozo.

3.4.4.3 Técnica de Inoculación directa.

Esta técnica consiste en poner a los extractos en contacto directo con las bacterias bajo estudio. Para ello, en un tubo de ensayo previamente esterilizado

se colocó 1 mL del extracto más 100 μL de la dilución de la bacteria (1×10^4 células/mL), se agitó vigorosamente y se dejó en refrigeración durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de refrigeración el contenido del tubo se coloca en una caja Petri y se le agrega TSA con rifampicina. Posteriormente, la caja se incubó durante 24 h a 37°C ; transcurrido este tiempo de incubación se procede a la lectura de las placas; el extracto se consideró activo cuando no hubo desarrollo del microorganismo, en caso contrario, el extracto se consideró inactivo. La metodología empleada en esta técnica se muestra en la figura 9.

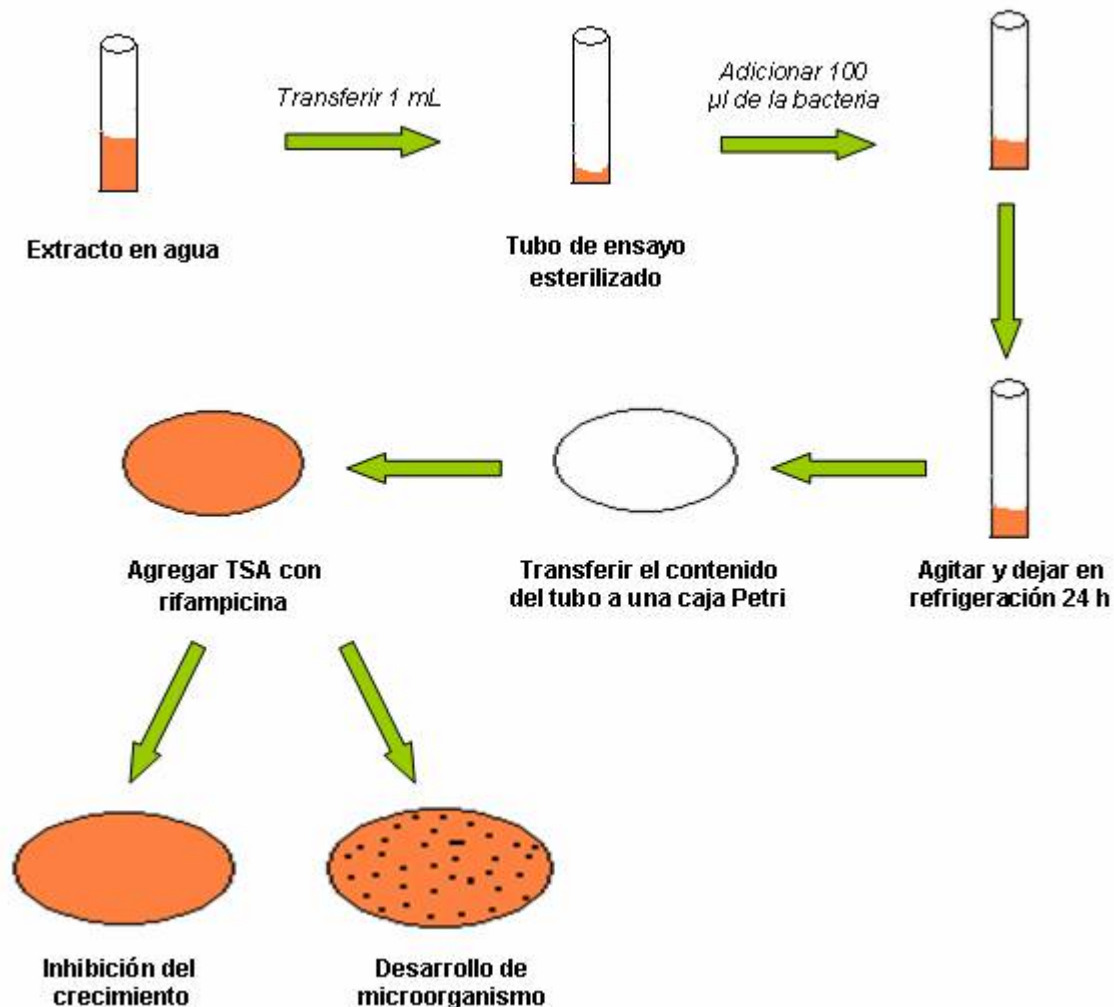


Figura 9. Metodología empleada en la inoculación directa.

3.4.4.4 Técnica del bioscreen

Los extractos que mostraron actividad antimicrobiana mediante la técnica de inoculación directa se examinaron también utilizando el método del *bioscreen* para

determinar su efecto en la cinética del crecimiento microbiano. Para realizar la medición de la actividad antimicrobiana mediante esta técnica, los extractos se diluyeron en 0.5 mL agua y en 0.5 mL de solución salina isotónica (0.85% NaCl). 100 μ L de esa solución se colocaron en los pocillos de la microplaca y se les agregó 300 μ L de caldo soya tripticaseína con rifampicina (500 μ L de rifampicina por cada 100 mL de caldo) más 20 μ L de la bacteria; con una concentración de 1×10^4 células/mL en el caso de *Listeria* y de 1×10^3 células/mL en el caso de *Vibrio*. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 600nm a intervalos de 20 minutos durante 24 h y a una temperatura de 37°C. El control que se utilizó contenía 20 μ L de la bacteria y el medio de cultivo (300 μ L de caldo soya tripticaseína + rifampicina).

3.5 Extracción de los compuestos presentes en los extractos activos.

Posterior a las pruebas antimicrobianas cualitativas de los extractos de los jugos, se procedió a realizar la separación del extracto de acetona por medio de una extracción sólido-líquido. La separación de este extracto se realizó empleando una columna cromatográfica de vidrio empacada con fase estacionaria C18 (Alltech, 1 g de fase estacionaria). El extracto de acetona se evaporó hasta sequedad y se le agregó 1 mL de hexano; posteriormente 0.5 mL de esa solución se eluyeron a través de la columna utilizando 1 mL de las fases móviles de la tabla 5, en ese orden y de forma consecutiva. Las fracciones colectadas fueron sometidas a evaluación antimicrobiana mediante la técnica de inoculación directa y el método del *bioscreen*

3.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones colectadas.

Las fracciones colectadas se concentraron, se solubilizaron en una solución salina isotónica (0.85% NaCl) y fueron sometidos a evaluación antimicrobiana mediante la técnica de inoculación directa y el método del *bioscreen* contra las bacterias

Listeria monocytogenes, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimirium* y *Vibrio cholerae*.

Tabla 5. Disolventes utilizados para la cromatografía en columna.

Fracciones	Eluyente	Proporción	Polaridad
1	Hexano	100%	1.90
2	Hexano:ACOEt	90:10	2.31
3	Hexano:ACOEt	80:20	2.72
4	Hexano:ACOEt	70:30	3.13
5	Hexano:ACOEt	60:40	3.54
6	Hexano:ACOEt	50:50	3.95
7	ACOEt	100%	6.00
8	ACOEt:EtOH	70:30	11.58
9	ACOEt:EtOH	40:60	17.16
10	ACOEt:EtOH	10:90	22.74
11	EtOH	100%	24.6
12	EtOH:MeOH	70:30	27.03
13	EtOH:MeOH	40:60	29.46
14	MeOH	100%	32.70

3.7 Caracterización de los compuestos con actividad antimicrobiana.

La caracterización de los compuestos presentes en las fracciones activas se llevó a cabo mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS) e Infrarrojo (FT-IR). Los espectros de masas se determinaron en un equipo Hewlett Packard 5989A, acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II. La columna utilizada fue especial para ácidos grasos (Columna capilar de sílica fundida Marca Hewlett Packard, Modelo Ultra 2, crosslinked 5% fenil-metil siloxano, D.I. 20 mm, L. 25 m), utilizando helio como gas portador, un impacto electrónico (IE) de 70eV y una rampa de temperatura de 40 a 260°C (10°C/min).

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro FT-IR Perkin-Elmer 200, en película de CsI; para este análisis las fracciones se solubilizaron en cloroformo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. Resultados y Discusión

4.1 Extracción de componentes antimicrobianos

La cromatografía en capa fina del jugo de zanahoria reveló que todos los solventes etanol, metanol, acetona, hexano y mezclas de acetona:etanol (1:1) y metanol:agua (1:1), mostraron buena separación de los compuestos presentes en el jugo 1 y 2, por lo que se procedió a realizar la extracción líquido-líquido con cada uno de ellos y posteriormente someter a evaluación antimicrobiana cada uno de los extractos.

4.2 Evaluación antimicrobiana de los extractos obtenidos

4.2.1 Técnica de difusión en disco.

Primeramente, sobre los discos de papel filtro se agregaron los extractos disueltos en una solución de Tween 20 al 1%. Sin embargo, transcurridas las 24 h de incubación no se observó halo de inhibición ya que los extractos no inhibieron el crecimiento microbiano. Por lo que, para eliminar la posible interferencia de la solución de Tween 20, se procedió a realizar los mismos experimentos pero utilizando los extractos concentrados del jugo de zanahoria en solución acuosa. Transcurrido el tiempo de incubación nuevamente ninguno de los extractos presento inhibición. La conclusión de estos estudios es que quizá las partículas suspendidas en los extractos se queden impregnados sobre el disco de papel filtro y por lo tanto no difunden hacia el agar.

4.2.2 Técnica de difusión en pozo.

Dado que la técnica de difusión en discos no resultó útil se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana utilizando la técnica de difusión en pozo; ésta técnica es adecuada para ensayos con suspensiones acuosas de extractos y resulta menos probable que la presencia de partículas suspendidas en la muestra interfieran en

la difusión de las sustancias antimicrobianas dentro del agar. Los resultados de esta prueba se muestran en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Resultados de la evaluación antimicrobiana (Técnica de difusión en pozo) de los extractos de jugo fresco.

Microorganismos	Extractos Jugo 1					
	Hexano	EtOH	Acetona	MeOH	EtOH:Acetona	MeOH:H ₂ O
<i>Listeria monocytogenes</i>			A			
<i>Vibrio cholerae</i>						

A= Activo
I= Inactivo

Tabla 7. Resultados de la evaluación antimicrobiana (Técnica de difusión en pozo) de los extractos de jugo almacenado en refrigeración.

Microorganismos	Extractos Jugo 2					
	Hexano	EtOH	Acetona	MeOH	EtOH:Acetona	MeOH:H ₂ O
<i>Listeria monocytogenes</i>						
<i>Vibrio cholerae</i>						

A= Activo
I= Inactivo

Como se puede observar en las Tablas 6 y 7, el extracto primario de acetona del jugo 1 fue el único que mostró actividad contra *Listeria monocytogenes* y no se observó ningún otro efecto inhibitorio con otros extractos de los jugos de zanahoria. Estos resultados aunque un poco más confiables comparados con los obtenidos por los experimentos de difusión en discos, tampoco fueron contundentes, por lo que se optó utilizar otra técnica de evaluación antimicrobiana: la inoculación directa.

4.2.3 Técnica de inoculación directa.

Debido a que en este estudio las técnicas de difusión en disco y en pozo no permitieron observar adecuadamente la inhibición antimicrobiana a pesar de ser muy común su empleo en microbiología por su sencillez y rapidez de análisis, se

procedió a utilizar la técnica de inoculación directa en la cual las bacterias se ponen en contacto directo con el extracto y se evita la presencia de posibles interferentes (papel filtro), por lo tanto, aunque esta técnica es más larga y laboriosa los resultados se consideran confiables. Los resultados de este ensayo se muestran en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Resultados de la evaluación antimicrobiana (Técnica de inoculación directa) de los extractos de jugo fresco.

Microorganismos	Extractos Jugo 1					
	Hexano	EtOH	Acetona	MeOH	EtOH:Acetona	MeOH:H ₂ O
<i>Listeria monocytogenes</i>	I	A	A	I	A	I
<i>Vibrio cholerae</i>	I	I	A	I	I	I

A= Activo

I= Inactivo

Tabla 9. Resultados de la evaluación antimicrobiana (Técnica de Inoculación directa) de los extractos de jugo almacenado en refrigeración.

Microorganismos	Extractos Jugo 2					
	Hexano	EtOH	Acetona	MeOH	EtOH:Acetona	MeOH:H ₂ O
<i>Listeria monocytogenes</i>	I	I	A	I	I	I
<i>Vibrio Cholerae</i>	I	I	A	I	I	I

A= Activo

I= Inactivo

Los resultados presentados en las Tablas 8 y 9 muestran que la fracción de acetona del jugo 1(J1) y jugo 2 (J2) inhiben completamente el crecimiento de ambas bacterias (*Listeria* y *Vibrio*), por lo que se pensó que los compuestos responsables de dicha actividad tienen una polaridad semejante a la de la acetona.

4.3 Separación de los compuestos presentes en los extractos primarios activos.

Los resultados anteriores mostraron que los compuestos antimicrobianos del jugo 1 y 2 se encuentran en el extracto obtenido empleando acetona como extractante, por lo que se procedió a separar cada uno de los compuestos presentes en este extracto utilizando la cromatografía en columna y con diversos sistemas de elución.

La elección de los solventes utilizados en la cromatografía en columna se hizo con base en los resultados de la cromatografía en capa fina de dicho extracto. Estos resultados mostraron que todos los solventes utilizados (Tabla 5) mostraban separación de componentes por lo que se procedió a utilizarlos para obtener distintas fracciones. De esta forma, se colectaron 14 fracciones para el jugo 1 y 14 fracciones para el jugo 2, que posteriormente fueron sometidas a evaluación antimicrobiana mediante la técnica de inoculación directa y el método del *bioscreen*.

4.4 Evaluación antimicrobiana de cada una de las fracciones obtenidas.

Cuando el extracto de acetona se pasó a través de la columna se obtuvieron 14 fracciones, tanto para J1 como para J2, cada uno correspondiente al uso de un disolvente (Tabla 5). Estas fracciones fueron concentradas y se solubilizaron en una solución salina isotónica (0.85% NaCl) para evaluar su actividad antimicrobiana mediante la técnica de inoculación directa y el método del *bioscreen*. En este estudio además de *Listeria* y *Vibrio* también se procedió a evaluar la actividad de estas fracciones contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*. Los resultados de dicha evaluación mediante la técnica de inoculación directa se muestran en las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Resultados de la evaluación antimicrobiana de las fracciones obtenidas del jugo 1.

Microorganismos	Fracciones jugo 1														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
<i>Listeria</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
<i>Vibrio Cholerae</i>	I	I	I	I	I	I	A	I	I	I	I	I	I	I	
<i>Staphylococcus</i>	I	I	A	A	I	I	A	A	I	I	I	I	I	I	
<i>Salmonella</i>	I	I	A	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
<i>Pseudomona</i>	I	I	I	I	I	I	I	A	I	I	I	I	I	I	

A= Activo

I= Inactivo

En los resultados de la tabla 10 se puede observar que las fracciones 7 y 8 fueron activas contra tres de las bacterias estudiadas.

Tabla 11. Resultados de la evaluación antimicrobiana de las fracciones obtenidas del jugo 2.

Microorganismos	Fracciones jugo 2														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
<i>Listeria</i>	I	A	I	I	I	I	I	A	I	I	I	I	I	I	
<i>Vibrio Cholerae</i>	I	I	A	I	I	A	I	A	A	I	A	I	I	I	
<i>Staphylococcus</i>	I	I	I	I	I	I	I	A	A	I	I	I	I	I	
<i>Salmonella</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
<i>Pseudomona</i>	I	I	I	I	I	I	I	A	I	I	I	I	I	I	

A= Activo

I= Inactivo

Los resultados de las tablas 10 y 11 muestran que la fracción 8 del jugo 2 fue activa contra un mayor número de bacterias que la correspondiente del jugo 1, por lo que de acuerdo con estos resultados en la fracción 8 se encuentran mayoritariamente los compuestos que inhiben el desarrollo de los microorganismos en estudio. También se pudo observar que el jugo almacenado en refrigeración presenta mayor actividad antimicrobiana en comparación con el jugo fresco.

Por otro lado, la evaluación antimicrobiana mediante el método del bioscreen mostró que la fracción 7 del J1 y las fracciones 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y

11 del J2 inhibieron el desarrollo de *Vibrio cholerae* y que las fracciones 2 y 8 del J2 fueron activas contra *Listeria monocytogenes*. Los comportamientos típicos de estas fracciones en la técnica de *bioscreen* se muestran en las Figuras 10 y 11.

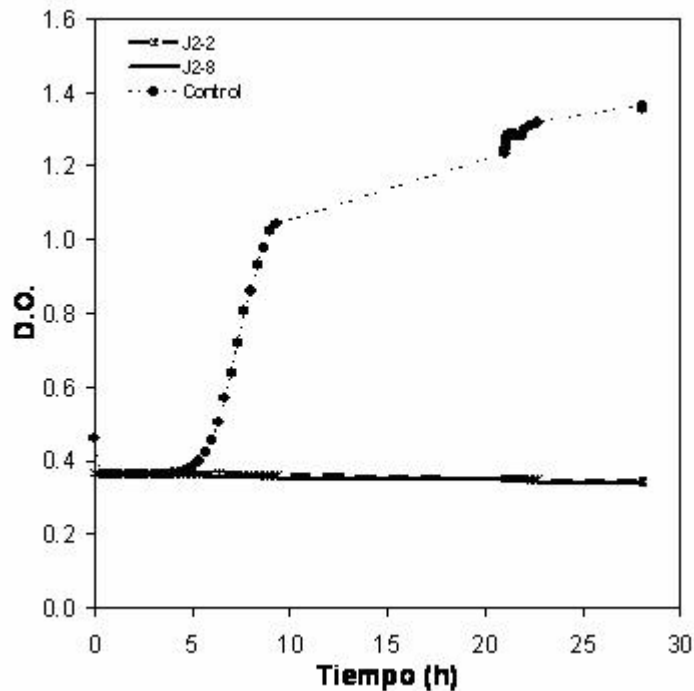


Figura 10. Cinética del crecimiento microbiano de las fracciones del J2 activas contra *Listeria monocytogenes*.

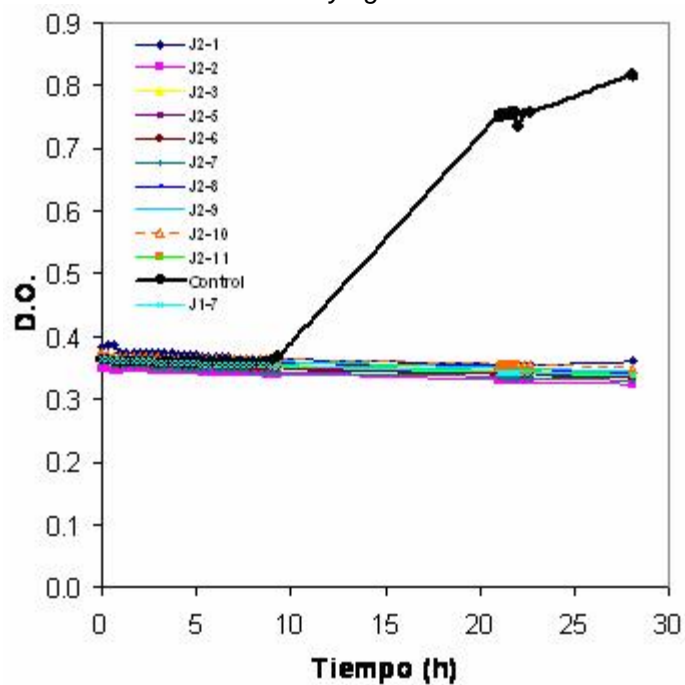


Figura 11. Cinética del crecimiento microbiano de las fracciones del J1 y J2 activas contra *Vibrio cholerae*.

Las figuras 10 y 11 muestran que las fracciones ensayadas son activas contra las bacterias bajo estudio debido a que su densidad óptica es mucho menor que la del control (blanco-medio de cultivo más la bacteria), es decir, durante el transcurso del tiempo la densidad óptica del control aumenta progresivamente indicando el crecimiento del microorganismo, mientras que la densidad óptica de las fracciones ensayadas permanece constante lo cual indica que no hay crecimiento del microorganismo.

En las tablas 12, 13 y 14 se muestran las fracciones que fueron activas contra las bacterias bajo estudio, considerando los resultados obtenidos tanto en la técnica de inoculación directa como en el método del *bioscreen*.

Tabla 12. Fracciones activas del J1 contra *Vibrio cholerae*.

Fracción	Inoculación directa	<i>Bioscreen</i>
7	A	A

Tabla 13. Fracciones activas del J2 contra *Vibrio cholerae*.

Fracción	Inoculación directa	<i>Bioscreen</i>
1	I	A
2	I	A
3	A	A
5	I	A
6	A	A
7	I	A
8	A	A
9	A	A
10	I	A
11	A	A

Tabla 14. Fracciones activas del J2 contra *Listeria monocytogenes*.

Fracción	Inoculación directa	<i>Bioscreen</i>
2	A	A
8	A	A

Los resultados que se reportan en las tablas 12, 13 y 14 muestran, tanto en la prueba de inoculación directa como la de *bioscreen*, que la fracción 7 del jugo 1 y las fracciones 3, 6, 8, 9, y 11 del jugo 2 inhiben el desarrollo de *Vibrio cholerae*; mientras que las fracciones 2 y 8 del jugo 2 son activas contra la bacteria *Listeria monocytogenes*. Estas fracciones cuya actividad fue corroborada por ambas pruebas antimicrobianas, se analizaron con la finalidad de caracterizar los compuestos activos que las constituían.

4.5 Caracterización de los compuestos con actividad antimicrobiana.

Las fracciones que mostraron actividad antimicrobiana tanto en la técnica de inoculación directa como en el método del bioscreen fueron sometidas a análisis mediante GC-MS e IR con el fin de realizar la determinación estructural de los compuestos presentes en dicha fracción, y por lo tanto responsables de dicha actividad.

4.5.1 Espectroscopía de infrarrojo

4.5.1.1 Fracción 7 del jugo 1 (J1-7)

En el espectro de infrarrojo para esta fracción se observan bandas de absorción a 2922.07cm^{-1} y 2852.33cm^{-1} para el alargamiento C-H y a 1466.48cm^{-1} , y 1378.44cm^{-1} para la flexión del enlace C-H. Otra banda a 720.51cm^{-1} que representa la oscilación $(\text{CH}_2)_n$ cuando $n \geq 3$ y una banda en 1739cm^{-1} característica del alargamiento C=O. Otro aspecto importante del espectro es que presenta una banda a 1071.81cm^{-1} correspondiente al alargamiento C-O de un éster (Figura 14).

4.5.1.2 Fracción 2 del jugo 2 (J2-2)

El análisis de los datos para este espectro, muestra la presencia de bandas de absorción a $(2926.87\text{cm}^{-1}, 2855.06\text{cm}^{-1})$ y $(1463.87\text{cm}^{-1}, 1377.20\text{cm}^{-1})$ para el alargamiento y flexión C-H. A 722.49cm^{-1} correspondiente a la oscilación $(\text{CH}_2)_n$ cuando $n \geq 3$. Otras bandas presentes son las correspondientes a las

representativas del alargamiento C=O a 1746.28cm^{-1} y dos bandas correspondientes al alargamiento C-O a 1164.98 cm^{-1} para C-C(=O)-O y a 1098.94 cm^{-1} para O-C-C. (Espectro 1, Anexo 2).

4.5.1.3 Fracción 3 del jugo 2 (J2-3)

En este espectro de IR se observa la presencia de bandas de absorción a (2925.73cm^{-1} , 2854.59cm^{-1}) y (1464.53cm^{-1} , 1377.41cm^{-1}) que representan las vibraciones de alargamiento y flexión para el enlace C-H respectivamente. Asimismo, se muestra una banda a 722.68cm^{-1} para la oscilación $(\text{CH}_2)_n$ cuando $n \geq 3$, otra banda característica del alargamiento C=O a 1745.74cm^{-1} y dos bandas a 1164.16cm^{-1} para C-C(=O)-O y a 1099.55cm^{-1} para O-C-C correspondientes al alargamiento C-O. (Espectro 2, Anexo 2).

4.5.1.4 Fracción 6 del jugo 2 (J2-6)

Las bandas de absorción características de este espectro se observan a 2920.70cm^{-1} y 2850.65cm^{-1} para el alargamiento C-H y a 1465.95cm^{-1} y 1378.27cm^{-1} para la vibración de flexión en el enlace C-H. Otra banda a 720.96cm^{-1} que representa la oscilación $(\text{CH}_2)_n$ cuando $n \geq 3$. Otros datos importantes son la banda de absorción a 1732.83cm^{-1} característica del alargamiento C=O y bandas a 1160.89cm^{-1} para (C-C(=O)-O) y 1027.12cm^{-1} para O-C-C correspondientes al alargamiento C-O. (Espectro 3, Anexo 2).

4.5.1.5 Fracción 8 del jugo 2 (J2-8)

Los datos de este espectro muestran bandas de absorción a 2922.99cm^{-1} y 2852.70cm^{-1} correspondientes al alargamiento del enlace C-H, y a (1463.54cm^{-1} y 1376.20cm^{-1}) para la flexión C-H. La banda que caracteriza al enlace C=O se observa a 1739.74cm^{-1} y otras dos bandas que caracterizan al alargamiento C-O de los esteres se observan a 1167.02cm^{-1} para (C-C(=O)-O) y a 1069.82 cm^{-1} para (O-C-C). (Espectro 4, Anexo 2).

4.5.1.6 Fracción 9 del jugo 2 (J2-9)

En este espectro se observan bandas a 2922.14cm^{-1} y 2853.05cm^{-1} que corresponden al alargamiento C-H y a 1462.91cm^{-1} y 1379.89cm^{-1} características

de la flexión del enlace C-H. Otra banda a 723.50cm^{-1} representa la oscilación $(\text{CH}_2)_n$ cuando $n \geq 3$. A 1744.19cm^{-1} se observa la banda del alargamiento C=O y a 1166.67cm^{-1} y 1065.02cm^{-1} se muestran las bandas correspondientes al alargamiento del enlace C-O; para C-C(=O)-O y O-C-C respectivamente. (Espectro 5, Anexo 2).

4.5.1.7 Fracción 11 del jugo 2 (J2-11)

Para este espectro se observan bandas a 2921.61cm^{-1} y 2851.09cm^{-1} que representan la vibración de alargamiento C-H y a 1462.92cm^{-1} y 1377.41cm^{-1} para la flexión del enlace C-H. Otra banda de poca intensidad se observa a 1733.05cm^{-1} y corresponde al alargamiento C=O. (Figura 19).

4.5.2 Espectrometría de masas.

Del pico con mayor abundancia de los cromatogramas de gases correspondiente para cada una de las fracciones activas, se obtuvieron los espectros de masas respectivos. Un cromatograma típico se muestra en el Anexo 2.

4.5.2.1 Fracción 7 del jugo 1

MS (IE, 70ev) m/z, 256(46), 239(20), 213(10), 199(8), 185(10), 171(10), 157(16), 143(10), 129(24), 115(16), 102(88), 97(32), 83(36), 71(56), 60(100). (Figura 16) (Cromatograma 1, Anexo 2).

4.5.2.2 Fracción 2 del jugo 2

MS (IE, 70ev) m/z, 256(20), 227(4), 213(12), 199(6), 185(12), 171(14), 157(19), 143(10), 129(42), 115(20), 97(24), 87(30), 73(100), 60(90), 55(72). (Espectro 6, Anexo 2).

4.5.2.3 Fracción 3 del jugo 2

MS (IE, 70ev) m/z, 256(20), 227(4), 213(12), 199(6), 185(12), 171(14), 157(16), 143(10), 129(38), 115(18), 97(22), 87(30), 73(100), 60(96). (Espectro 7, Anexo 2)

4.5.2.4 Fracción 6 del jugo 2

MS (IE, 70ev) m/z, 256(22), 213(16), 185(16), 157(20), 143(16), 129(44), 111(18), 97(24), 83(32), 73(100), 57(88), 55(79). (Espectro 8, Anexo 2).

4.5.2.5 Fracción 8 del jugo 2

MS (IE, 70ev) m/z, 256(22), 213(16), 185(14), 171(14), 157(20), 129(32), 115(20), 97(26), 85(40), 73(80), 57(100). (Espectro 9, Anexo 2).

4.5.2.6 Fracción 9 del jugo 2

MS (IE, 70ev) m/z, 256(22), 213(20), 199(10), 185(14), 171(16), 157(20), 143(14), 129(40), 115(20), 97(28), 85(32), 73(100), 60(90). (Espectro 10, Anexo 2).

4.5.2.7 Fracción 11 del jugo 2

MS (IE, 70ev) m/z, 256(20), 213(18), 185(18), 171(20), 157(18), 143(16), 129(32), 115(20), 97(28), 85(36), 73(100), 60(90), 57(100). (Figura 21).

4.5.3 Identificación de los compuestos con actividad antimicrobiana

4.5.3.1 Metil éster del ácido pentadecanóico

De acuerdo con la información obtenida y la encontrada en la bibliografía así como las bandas de absorción en el IR, se dedujo que en la fracción 7 del jugo 1 y en las fracciones 2, 3, 6, 8 y 9 del jugo 2, está presente un éster de ácido graso. La masa molecular del espectro de masas permitió identificarlo como el metil éster del ácido pentadecanóico (Figura 12).



Figura 12. Estructura del metil éster del ácido pentadecanoico

Así, en las Figuras 13 y 14 se muestran respectivamente los espectros de Infrarrojo reportado y experimental para la fracción 7 del jugo 1 del metil éster del ácido pentadecanóico. Puede observarse que en ambos están presentes las bandas de absorción características de los ésteres de ácidos grasos,

principalmente las que corresponden al alargamiento C-O en la región de ($1000 - 1300\text{cm}^{-1}$), éstas vibraciones de alargamiento C-O consisten en dos vibraciones asimétricas acopladas: C-C(=O)-O en la región de ($1210 - 1163\text{cm}^{-1}$) y O-C-C en la región de ($1064 - 1031\text{cm}^{-1}$) Los espectros correspondientes a las fracciones 2, 3, 6, 8 y 9 que fueron comparadas con el espectro de IR reportado del metil éster del ácido pentadecanóico se muestran en el anexo 2.

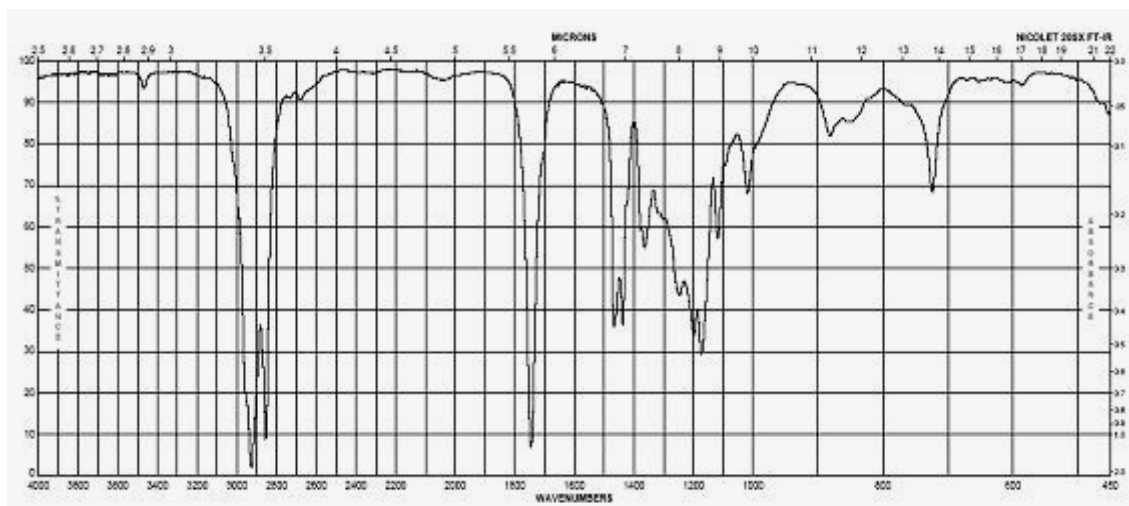


Figura 13. Espectro IR reportado para el metil éster del ácido pentadecanóico. Datos obtenidos en <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P6250>.

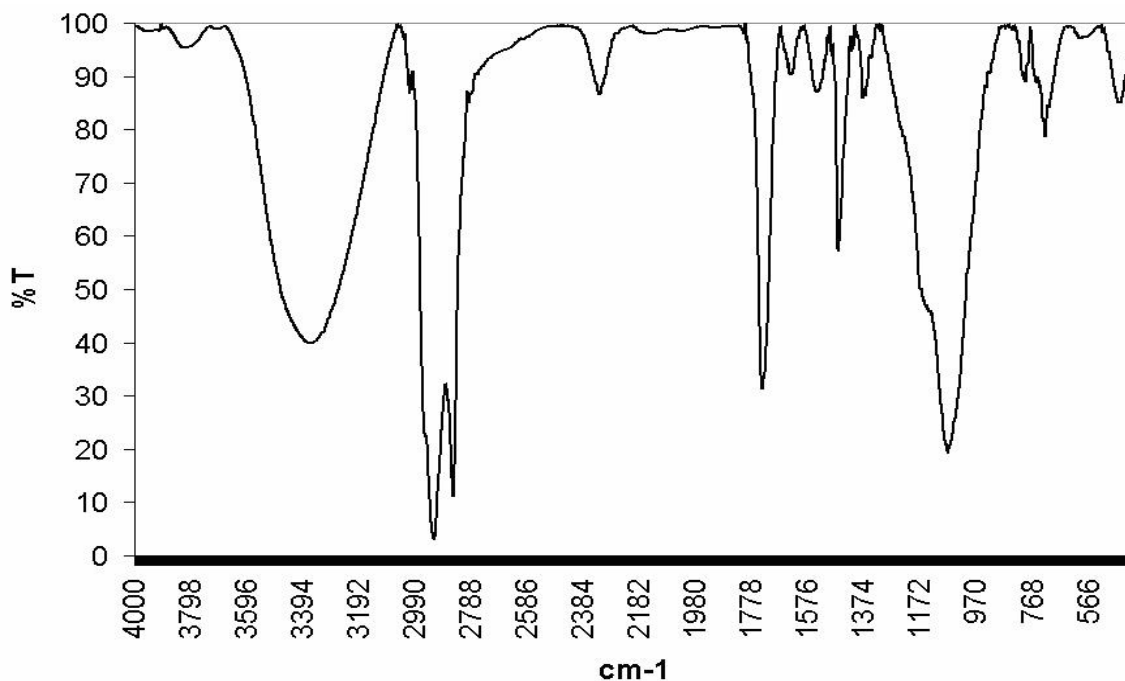


Figura 14. Espectro de IR en película de CsI para la fracción 7 del jugo 1 (J1-7)

Por otro lado, en la Figura 15 se muestra el espectro de masas reportado en la literatura para el metil éster del ácido pentadecanóico, mientras que en la Figura 16, se muestra el espectro de masas experimental correspondiente a la fracción 7 del Jugo 1. Puede observarse que ambos espectros coinciden en un M^+ de relación m/z 256. Los espectros de masas para las fracciones 2, 3, 6, 8 y 9 que fueron comparadas con el espectro del metil éster del ácido pentadecanóico se pueden observar en el anexo 2.

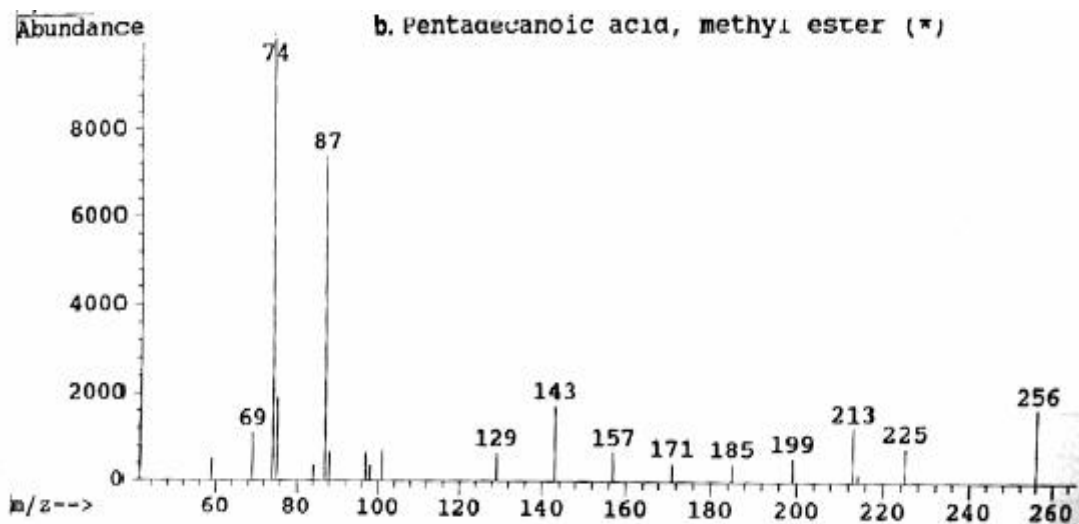


Figura 15. Espectro de masas reportado para el metil éster del ácido pentadecanóico (Datos obtenidos en Wiley library).

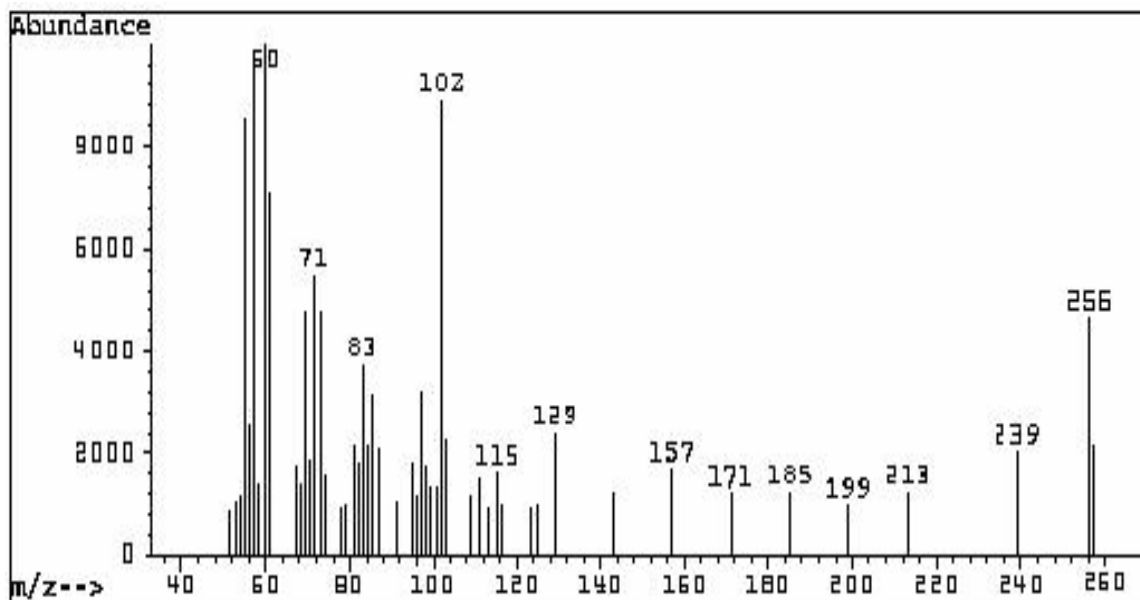


Figura 16. Espectro de masas correspondiente a la fracción 7 del jugo 1.

4.5.3.2 Ácido hexadecanóico

Después de realizar el análisis de la información espectral de las fracciones obtenidas, pudo observarse que la fracción 11 del jugo 2 presenta datos de IR diferentes a las fracciones mencionadas en el apartado anterior, y que por lo tanto hay en ella un compuesto diferente. Al comparar los datos obtenidos con los reportados en la literatura se propuso que la estructura del compuesto corresponde al ácido hexadecanóico (Figura 17). También en este caso, el patrón de fragmentación así como el peso molecular del compuesto analizado corresponde a lo reportado en la bibliografía para el ácido hexadecanóico.



Figura 17. Estructura del ácido hexadecanóico

El espectro de infrarrojo reportado en la literatura para el ácido hexadecanóico se muestra en la figura 18 y el espectro de IR experimental para la fracción 11 del jugo 2 se muestra en la figura 19.

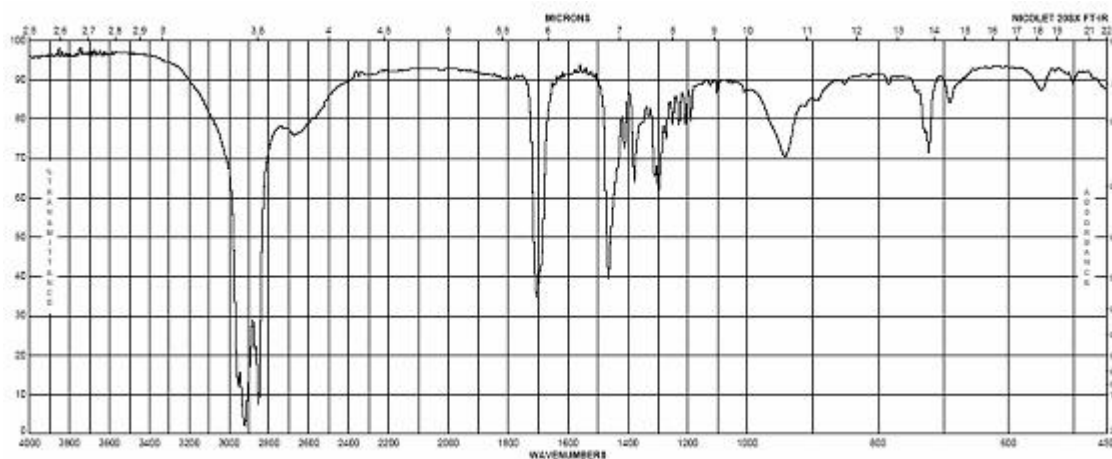


Figura 18. Espectro IR reportado para el ácido hexadecanóico. Datos obtenidos en:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P5585>.

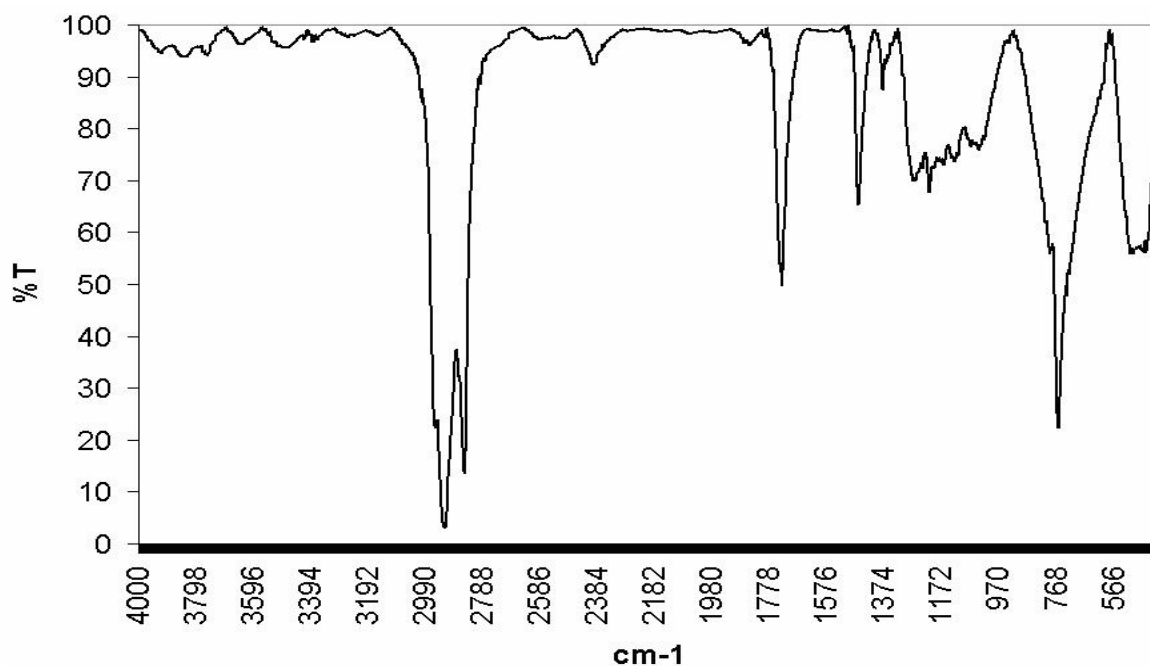


Figura 19. Espectro de IR en película de Csl para la fracción 11 del jugo 2 (J2-11)

En la Figura 20 se muestra el espectro de masas del ácido hexadecanoico reportado en la literatura y en la Figura 21 el espectro de masas experimental correspondiente a la fracción 11 del jugo 2. Ambos espectros coinciden en presentar un ion molecular (M^+) en 256.

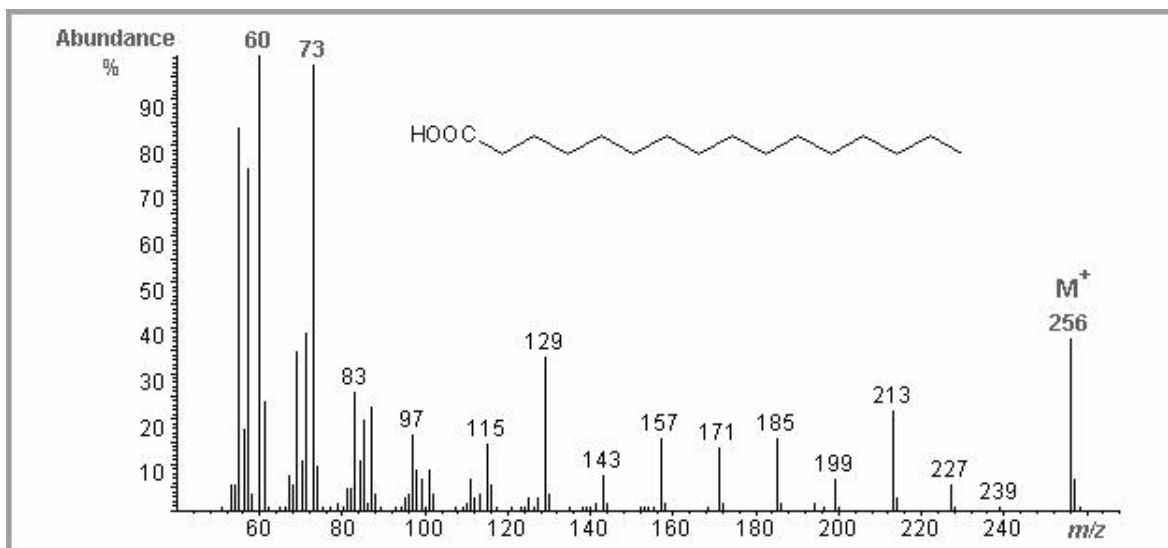


Figura 20. Espectro de masas reportado para el ácido hexadecanoico. Datos obtenidos en:

<http://www.lipidlibrary.co.uk/ms/ms21/#top>.

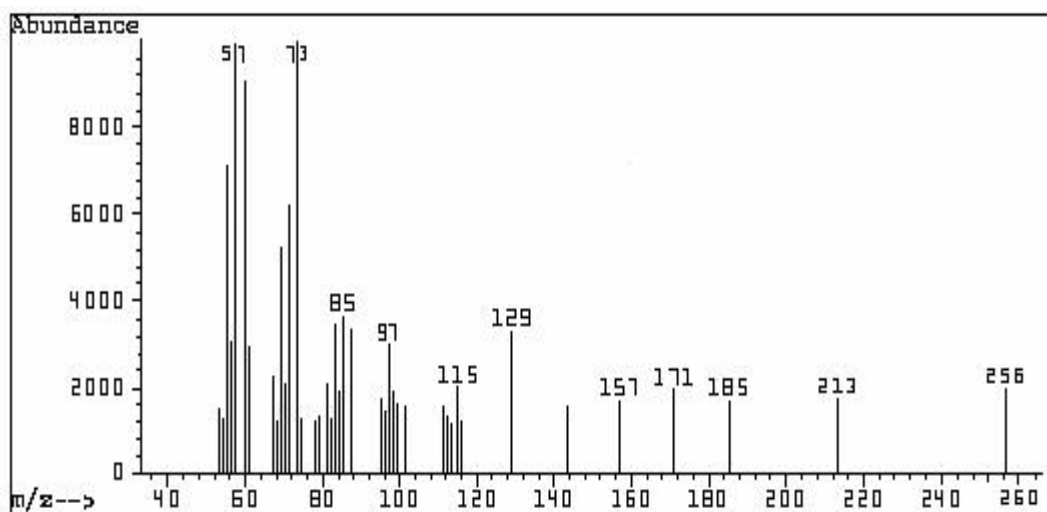


Figura 21. Espectro de masas para la fracción 11 del jugo 2 (J2-11).

Cabe mencionar que la interpretación de los espectros de infrarrojo causó cierta confusión debido a que, aunque existen bandas características del ácido hexadecanóico y del metil éster del ácido pentadecanóico, también están presentes otras bandas que pueden ser debidas a la presencia agua y de otros compuestos que no fueron posibles de identificar debido a su menor concentración. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente; el ión molecular observado en los espectros de masas concuerda con el peso molecular de los compuestos propuestos.

V. CONCLUSIONES

V. Conclusiones

1.- Los resultados de la cromatografía en capa fina del jugo de zanahoria mostraron que los solventes: etanol, metanol, acetona, hexano y mezclas de acetona:etanol (1:1) y metanol:agua (1:1) separaban igual número de componentes presentes en el jugo de zanahoria.

2. En la evaluación antimicrobiana las técnicas que resultaron ser más adecuadas para evaluar cada uno de los extractos y fracciones obtenidas fue la de inoculación directa y el método del *bioscreen*; ya que en la primera el extracto se pone en contacto directo con el microorganismo de prueba y se eliminan posibles interferencias como el papel filtro en el caso de la técnica de difusión en disco.

3. Se observó que en los jugos frescos y almacenados existen sustancias antimicrobianas que son extraídas principalmente con acetona y que únicamente mediante la técnica de inoculación directa y el *bioscreen* ha sido posible demostrar su actividad, esto también puede ser debido a la baja concentración de estos componentes antimicrobianos en los jugos.

4. La evaluación antimicrobiana de las fracciones obtenidas a partir del extracto de acetona permitió observar que el jugo 1 es activo contra *Vibrio cholerae*, y que el jugo 2 inhibe el desarrollo tanto de *Vibrio cholerae* como de *Listeria monocytogenes* presentando un amplio espectro de inhibición ya que inhibe el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

5. En la caracterización de los compuestos presentes en el extracto activo del jugo 1 se propuso al metil éster del ácido pentadecanóico como el posible responsable de dicha actividad, mientras que para el jugo 2 se propuso al ácido hexadecanóico y al metil éster del ácido pentadecanóico como los responsables de la actividad antimicrobiana.

6. También se pudo observar que el jugo almacenado en refrigeración mostró mayor inhibición que el jugo fresco, es decir; que el jugo refrigerado fue activo contra *Listeria* y *Vibrio*; mientras que el jugo fresco sólo inhibió el desarrollo de *Vibrio*. Esto confirma que el almacenamiento del jugo influye significativamente en la concentración y/o producción de compuestos con actividad antimicrobiana.

REFERENCIAS

Referencias

- [1] El cultivo de la zanahoria, origen, morfología y taxonomía. Disponible en <http://www.infoagro.com/hortalizas/zanahoria.htm#1.%ORIGEN>, Julio 2006.
- [2] Zanahoria, Composición y usos. Disponible en http://www.uc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p100.html, Julio 2006.
- [3] World Carrot Museum, Varieties. Disponible en <http://www.carrotmuseum.co.uk/today.html#varieties>, Julio 2006.
- [4] La zanahoria, Tipos de zanahoria. Disponible en <http://www.horfres.com/zanahoria.htm>, Julio 2006.
- [5] Zanahoria (Daucus carota L.). Disponible en http://www.alcentral.com.ar/fh_zanahoria.html, Julio 2006.
- [6] U. Kidmose, S. L. Hansen, L. P. Christensen, M. Edelenbos, E. Larsen, and R. Norbaek, Effects of Genotype, Root Size, Storage, and Processing on Bioactive Compounds in Organically Grown Carrots (*Daucus carota L.*), *Sensory and Nutritive Qualities of Food*, **2004**, 69, 388-394.
- [7] M. K. Larsen, L.P. Christensen, W. Vach, J.R. Hottinga, K. Brandt, Inhibitory Effects of Feeding with Carrots or (-)-Falcarinol on Development of Azoxymethane-Induced Preneoplastic Lesions in the Rat Colon, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 1823-1827.
- [8] M. Baranska, H. Schulz, R. Baranski, T. Nothnagel, L.P. Chirstensen, In Situ Simultaneous Analysis of Poliacetylenes, Carotenoids and Polysaccharides in Carrot Roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 6565-6571.

- [9] S.T. Talcott, L.R. Howard, Determination and Distribution of 6-Methoximellein in Fresh and Processes Carrot Puree by a Rapid Spectrophotometric Assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 3237-3242.
- [10] A. Czepa, T. Hofman, Structural and Sensory Characterization of Compounds contributing to the Bitter Off-Taste of carrots (*Daucus carota L.*) and carrot Puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 3865-3873.
- [11] Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap11.htm>, Julio 2006.
- [12] Bioscreen C Microbiology Plate Reader. <http://www.mtxlsi.com/bioscreenc.htm>, Julio 2006.
- [13] L.R. Beuchat, R.E. Brackett, Inhibitory Effects of Raw Carrots on *Listeria Monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1990**, 1734-1742.
- [14] S.G.Yates, and R.E. England. Isolation and analysis of carrot constituents: Myristicin, falcarinol, and falcarindiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1982**, 30, 317-320.
- [15] Babic I, Nguyen-the C, Amiot MJ, Antimicrobial Activity of Shredded Carrot extracts on Food-borne Bacteria and Yeast., *Applied Bacteriology*, **1994**, 76(2), 165-141.
- [16] R. A. Momin and M. G. Nair, Pest-Managing Efficacy of trans-Asarone Isolated from *Daucus carota L.* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 4475-4478.

[17] ICMSF, Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos. Ed. Acribia, Zaragoza (España), **1996**.

[18] "Especificidad y Sensibilidad de la PCR para Detectar Salmonella spp. en Cultivos Puros y en Alimentos". Disponible en <http://www.unavarra.es/genmic/publicaciones/tfc/Nekane%20Razquin.htm>, Julio 2006.

[19] *Vibrio Cholerae*. Disponible es http://es.wikipedia.org/wiki/Vibrio_cholerae, Julio 2006.

[20] *Staphylococcus aureus*. Disponible en http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus, Julio 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

Características generales de las bacterias a estudiar.

A.1.1 *Listeria monocytogenes*

La descripción de esta bacteria se remonta a más de 60 años; cuando Murray aisló una bacteria corta, Gram positiva, de forma bacilar que causaba enfermedad en los conejos (Figura 22). En ese entonces se denominó como *Bacterium monocytogenes* porque infectaba a los monocitos (leucocitos de la sangre). Las primeras descripciones de organismos que se parecían a *Listeria monocytogenes* que causaban infección en las personas y en los animales; se remontan a finales del siglo XIX. Pirie (1930) aisló un organismo parecido en el hígado de gerbos enfermos y lo denominó *Listeria hepatolytica* en honor al Dr. Joseph Lister. A pesar que la denominación de *Listeria* había sido adoptada anteriormente para un grupo de mohos productores de mucilago; finalmente fue acordada la denominación de *Listeria monocytogenes*. Las especies incluidas en este género son la *L. innocua* y *L. murria* consideradas apatógenas, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, y *L. welshimer* que rara vez causan infección humana y *L. monocytogenes* la especie de consideración más importante.

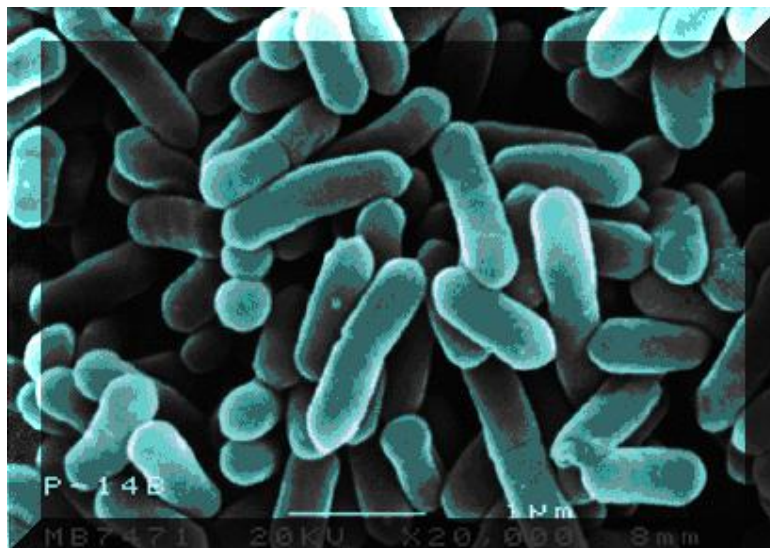


Figura 22. *Listeria monocytogenes*

Esta es un patógeno oportunista, capaz de sobrevivir y de multiplicarse fuera de hospedadores animales y en medios nutritivos muy simples; ha sido aislada en una gran diversidad de habitats, entre los que se incluyen el suelo, las aguas residuales, carnes crudas, heces y en los ambientes donde se elaboran alimentos. Su importancia radica en la relación que existe con diversos casos aislados y brotes de listeriosis, ocurridos a nivel mundial por el consumo de alimentos que permiten el crecimiento de la bacteria, como los productos lácteos y carnes crudas [17].

A.1.2 *Vibrio cholerae*

Desde tiempos antiguos, el cólera ha sido un azote de la humanidad y todavía es una enfermedad de importancia universal. La bacteria causante de esto es un bacilo anaerobio, Gram negativo, que presenta forma de coma y es extremadamente móvil debido a su único flagelo polar, mide entre 0.2 y 0.4 μm por 1.5 a 2.4 μm (Figura 23).

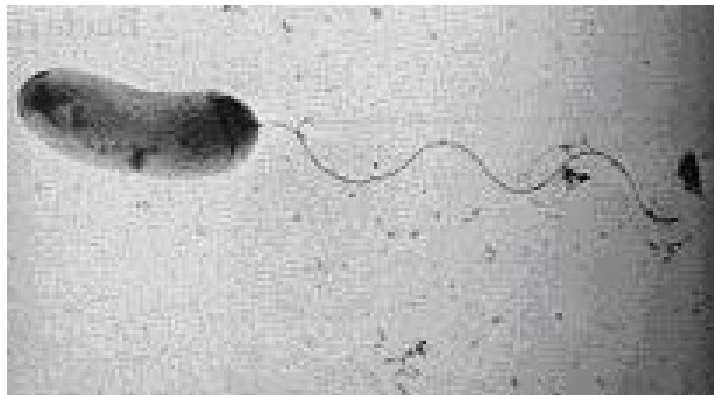


Figura 23. *Vibrio Cholerae*

Esta bacteria pertenece al genero *Vibrio*; que comprende varias especies de importancia médica, relacionadas muchas de ellas con enfermedad gastrointestinal y en particular con enfermedades transmitidas por alimentos de origen marino. La *vibrio cholerae* merece especial atención ya que es responsable

del cólera epidémico, enfermedad infecciosa con un cuadro clínico caracterizado al inicio por una diarrea ligera, malestar abdominal y anorexia, pero rápidamente progresa a una diarrea intensa con las clásicas heces de agua de arroz y una pérdida rápida de líquidos y sales del organismo (especialmente potasio), que originan deshidratación grave, hipertensión y desequilibrio salino. Dicha bacteria ingresa al organismo con el agua o los alimentos contaminados. [19, 17].

A.1.3 *Salmonella typhimurium*

Budd (1874) fue quien dedujo que la fiebre tifoidea era transmitida por el agua y los alimentos. *Salmonella typhi*, el agente etiológico de la enfermedad, fue descrito por Eberth y aislado en 1884 por Gaffka. *Salmonella* es un género de la familia Enterobacteriaceae. Las representantes de la familia se caracterizan como bacterias Gram-negativas, anaerobias facultativas, de forma bacilar cuyo tamaño oscila entre 1 y 3 μm de longitud y entre 0.5 y 0.7 μm de diámetro. Generalmente poseen flagelos peritricos que les confieren movilidad. (Figura 24).



Figura 24. *Salmonella typhimurium*

Las especies del género *Salmonella* son una de las patógenas más importantes que pueden provocar enfermedades en el hombre por ingestión de alimentos

contaminados. Son causantes de la salmonelosis humana y aproximadamente la tercera parte de los alimentos implicados en los brotes de salmonelosis son carnes, productos cárnicos y productos derivados de las aves (huevos y ovoproductos) [17,18].

A.1.4 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es la especie tipo del género *Staphylococcus*, se presenta en forma de cocos Gram positivos que crecen agrupados en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), es aerobio y anaerobio facultativo (Figura 25) [17, 20].

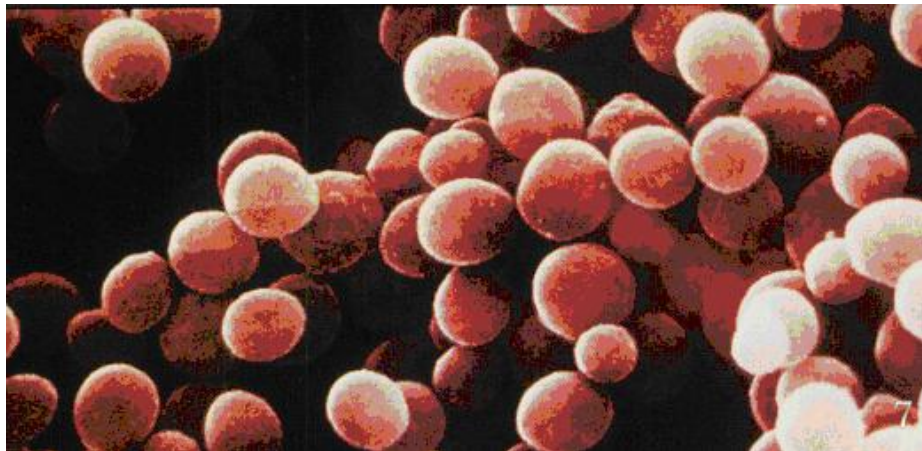


Figura 25. *Staphylococcus aureus*

El estafilococo áureo causa lesiones de piel superficiales tales como ebulliciones y orzuelos; infecciones más serias tales como pulmonía y meningitis e infecciones de las vías urinarias.

A.1.5 *Pseudomona aeruginosa*

La *P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, que en medios de cultivo produce colonias de color azul-verdoso debido a la producción de pigmentos (Figura 26).

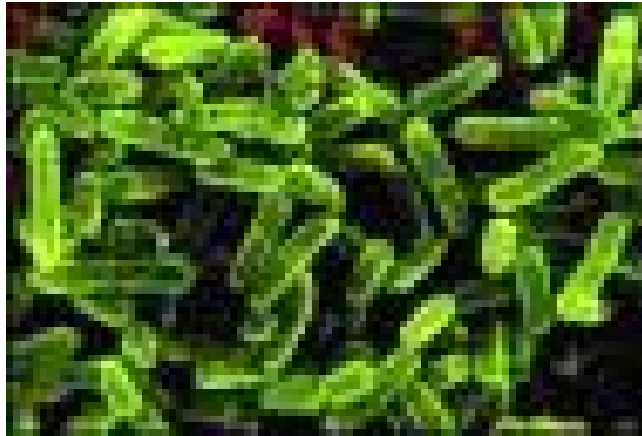


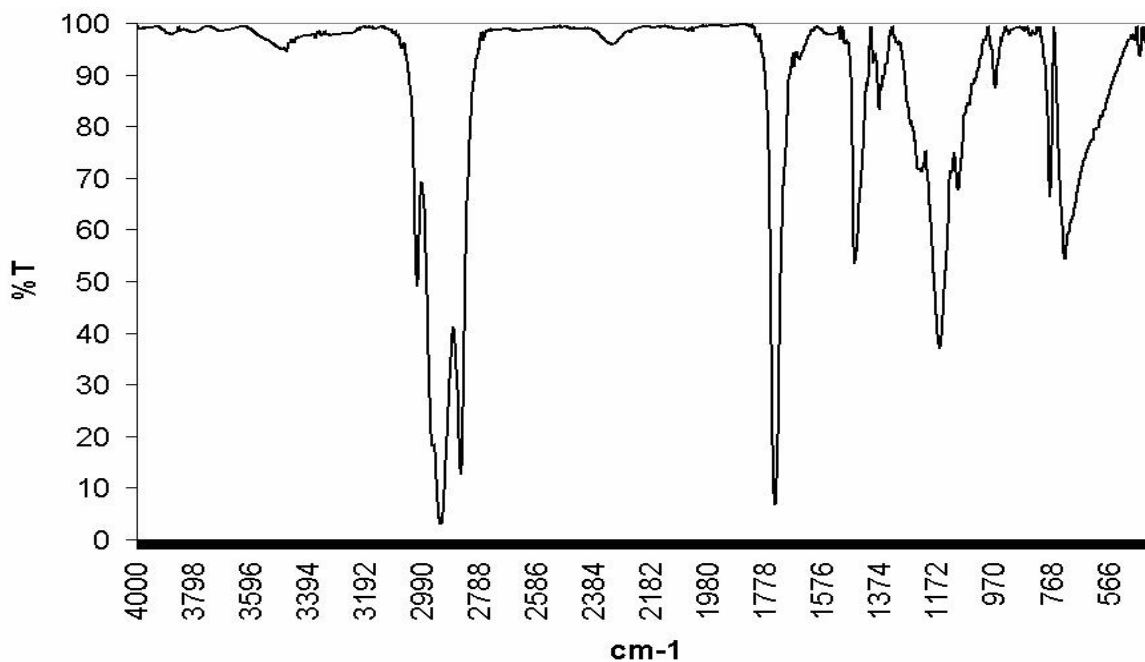
Figura 26. *Pseudomonas aeruginosa*.

Se encuentra ampliamente difundida en la naturaleza en íntima asociación con medios húmedos. La *P. aeruginosa* afecta con frecuencia las estructuras cutáneas produciendo diversos cuadros clínicos como foliculitis, infecciones ungueales (donde las uñas adquieren un color verdoso característico), otitis externa, infección del pliegue interdigital e infección de las heridas quirúrgicas [18].

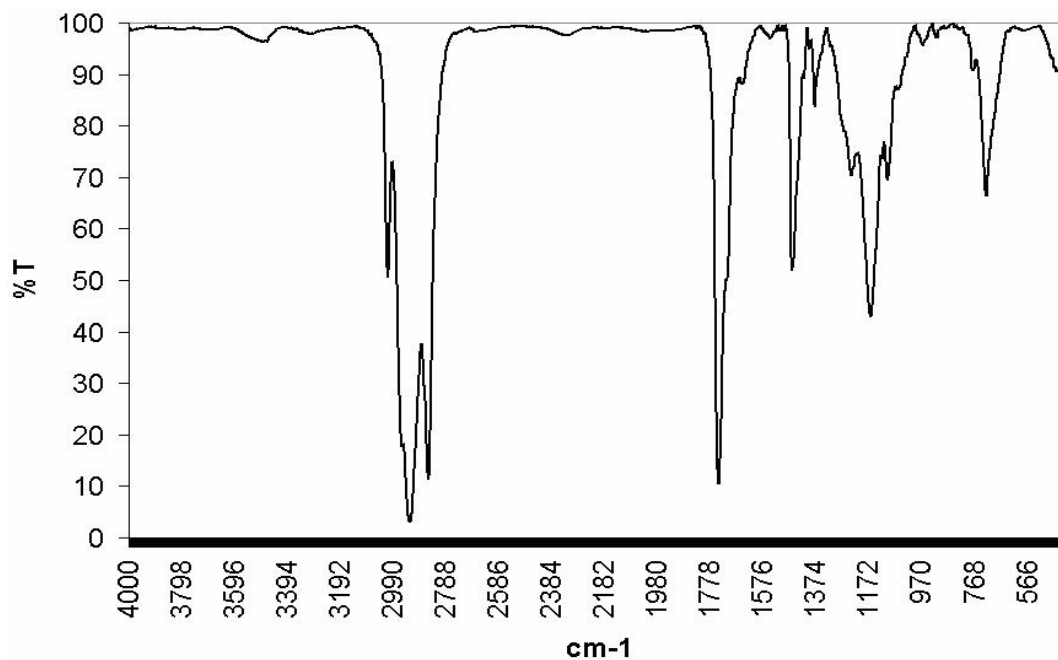
ANEXO 2

Espectros de IR y MS para los extractos secundarios con actividad antimicrobiana del jugo de zanahoria

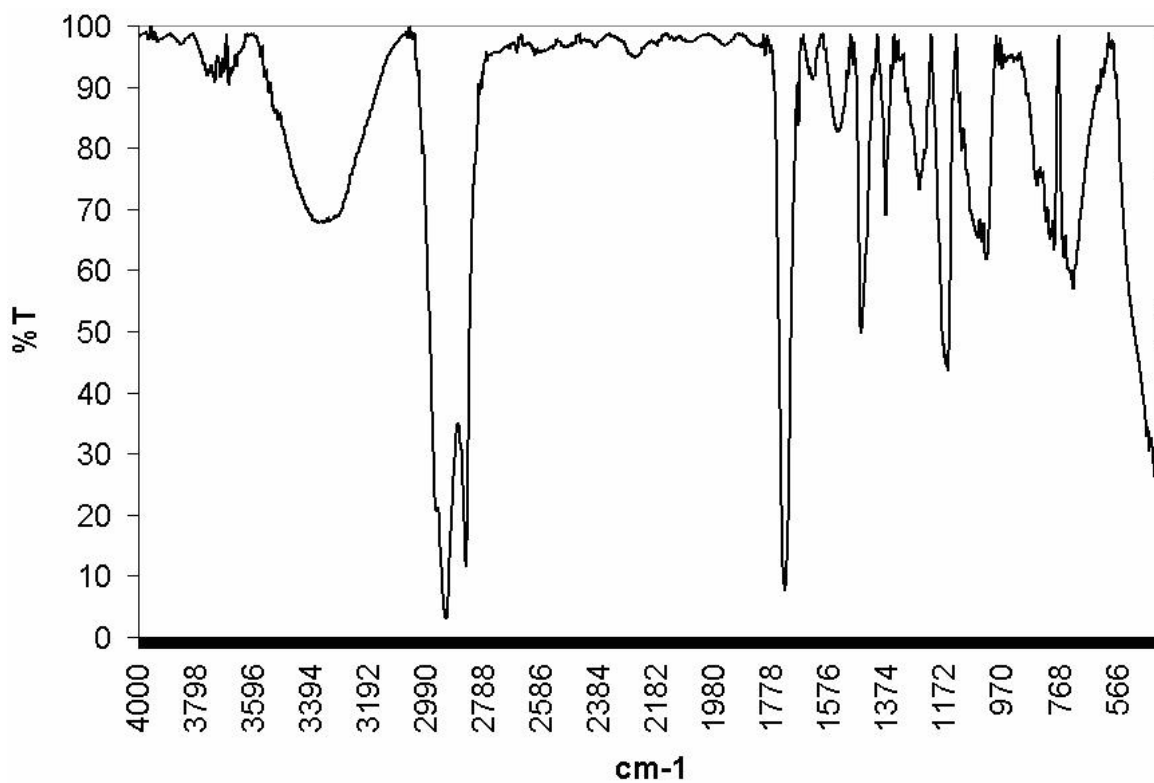
A.2.1 Espectros de IR



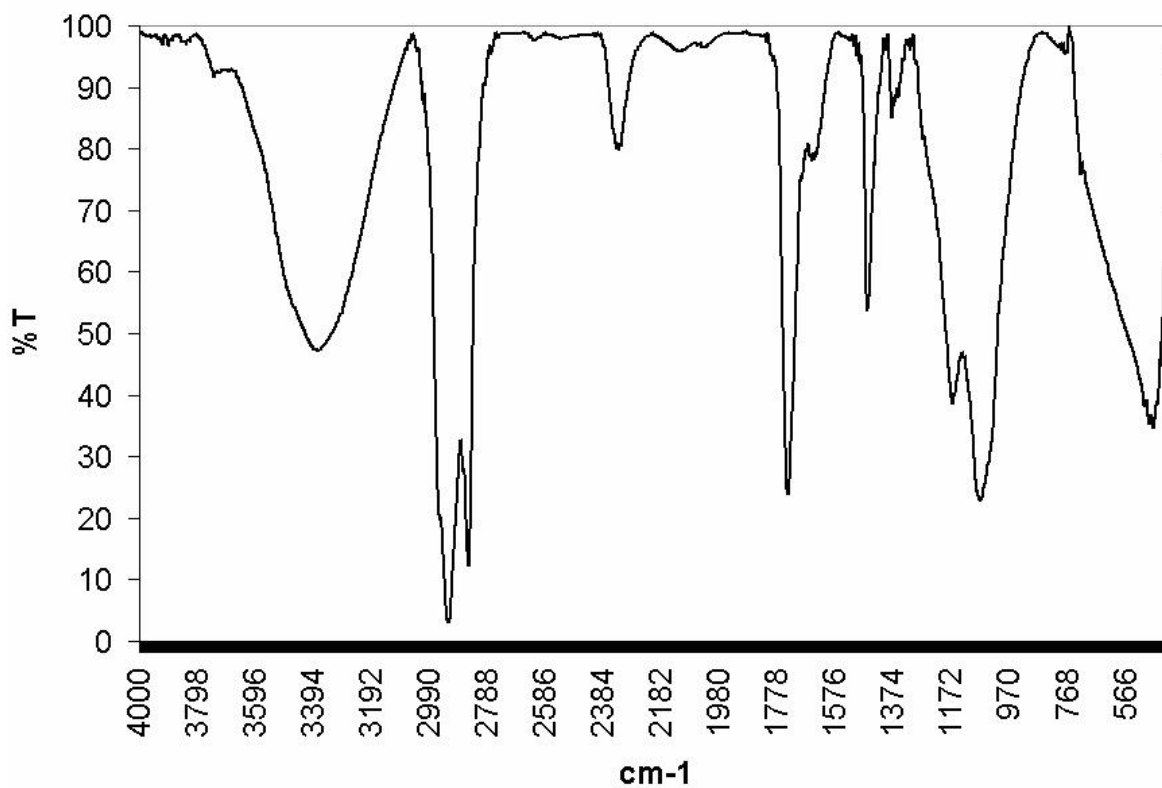
Espectro 1. Espectro de IR en película de Csl para la fracción 2 del jugo 2 (J2-2)



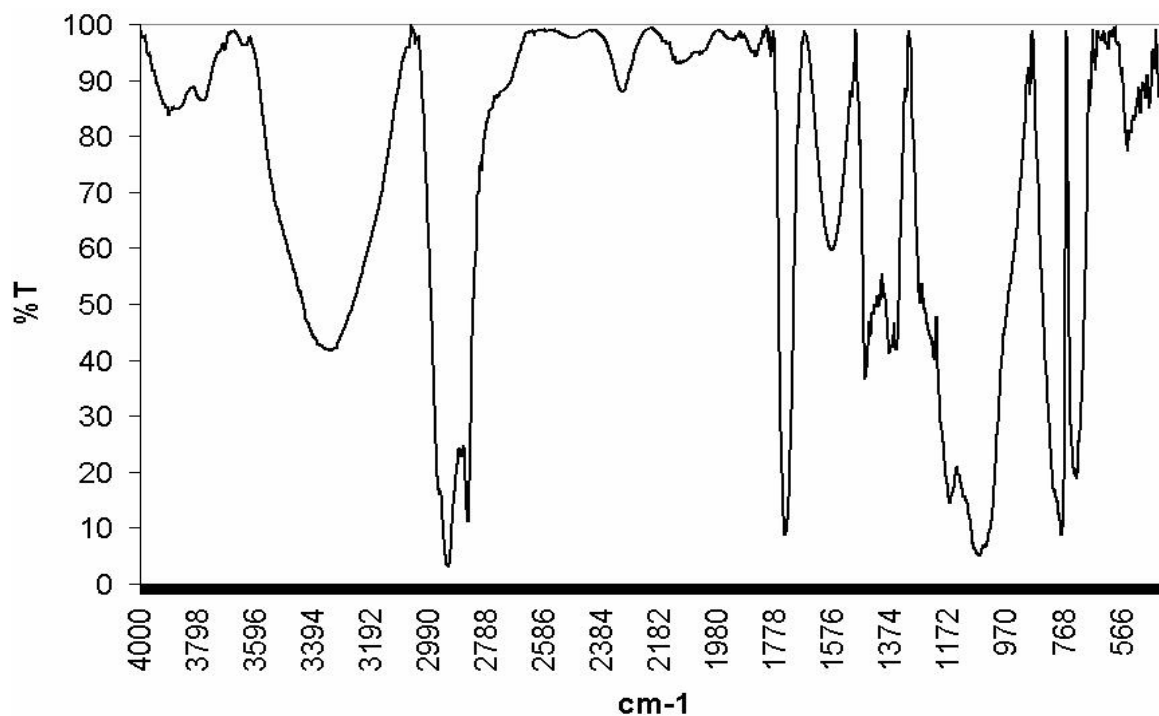
Espectro 2. Espectro de IR en película de Csl para la fracción 3 del jugo 2 (J2-3)



Espectro 3. Espectro de IR en película de CsI para el extracto 6 del jugo 2 (J2-6)

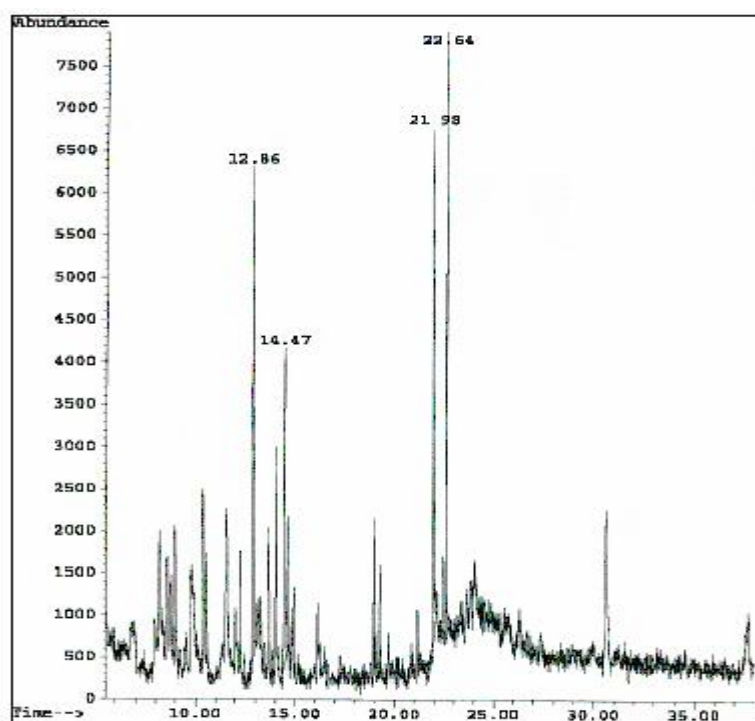


Espectro 4. Espectro de IR en película de CsI para la fracción 8 del jugo 2 (J2-8)



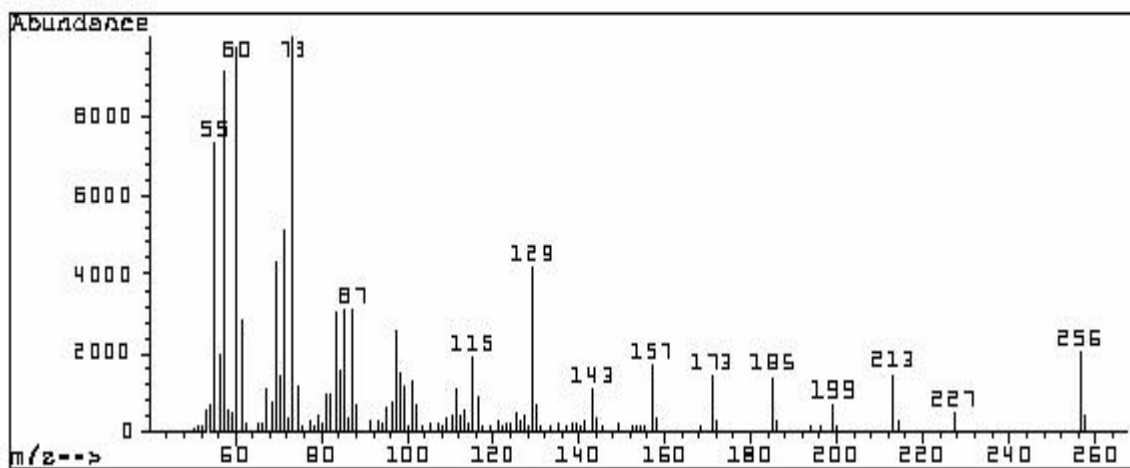
Espectro 5. Espectro de IR en película de CsI para la fracción 9 del jugo 2 (J2-9)

A.2.2 Cromatograma

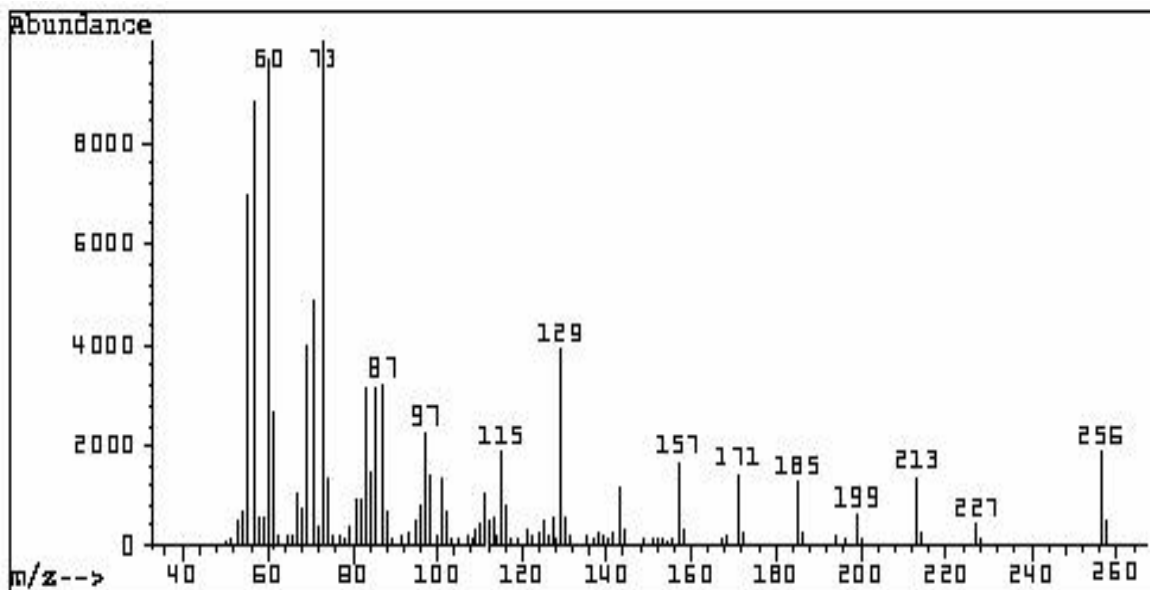


Cromatograma 1. Cromatograma de la fracción 7 del jugo 1, obtenido en un GC-MS. Condiciones descritas en el apartado 3.7.

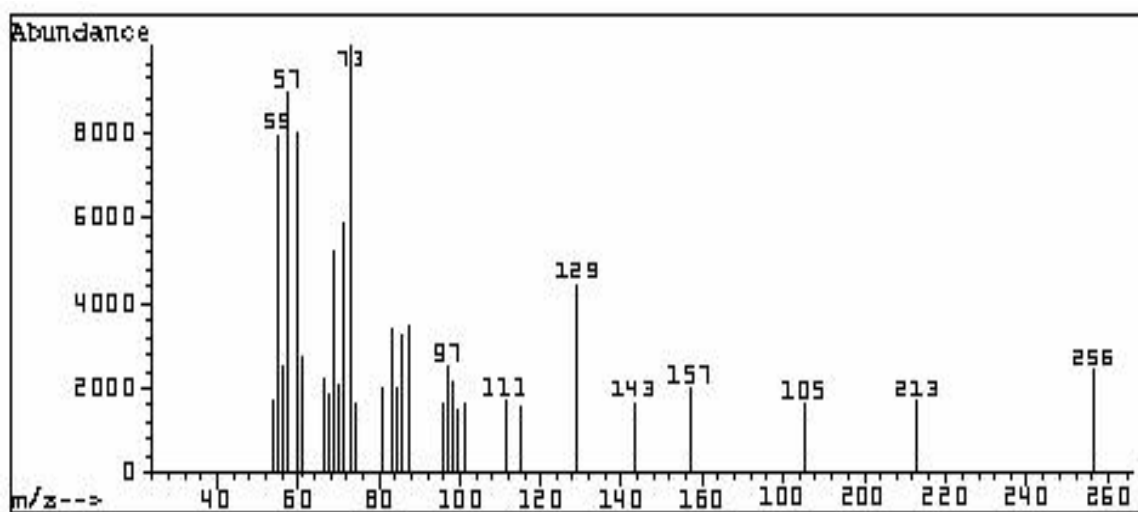
A.2.3 Espectros de Masas



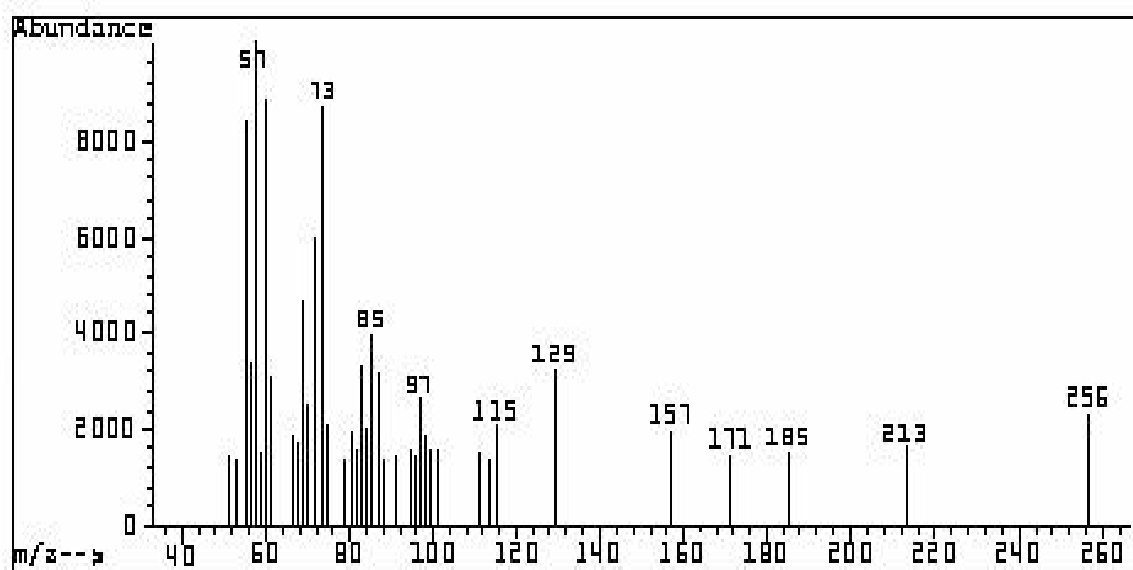
Espectro 6. Espectro de masas para la fracción 2 del jugo 2 (J2-2)



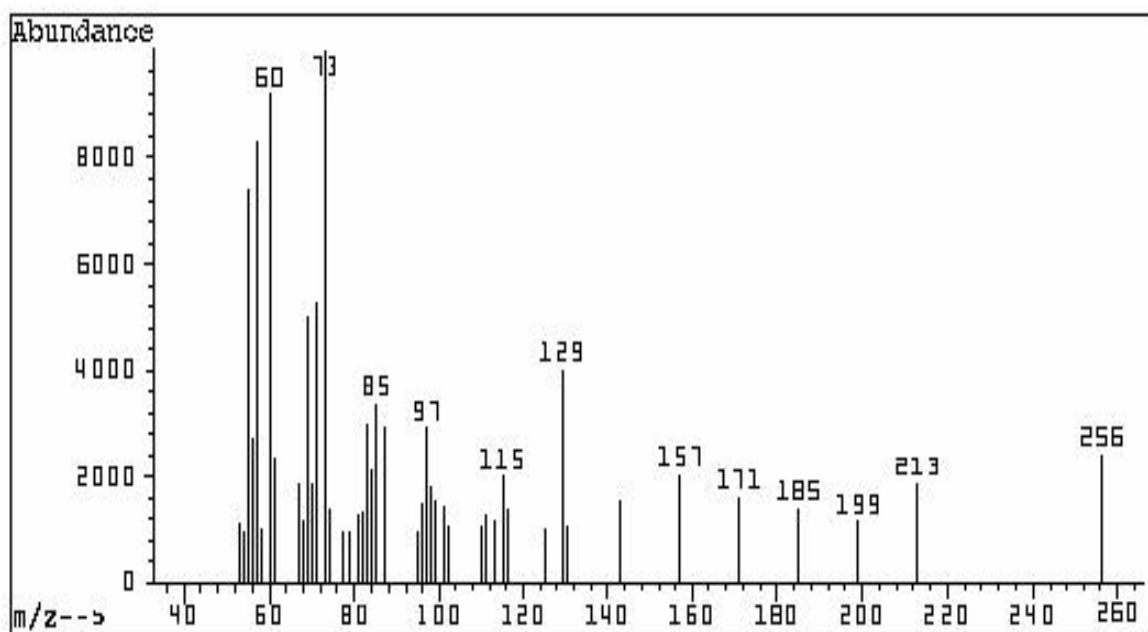
Espectro 7. Espectro de masas para la fracción 3 del jugo 2 (J2-3)



Espectro 8. Espectro de masas para la fracción 6 del jugo 2 (J2-6)



Espectro 9. Espectro de masas para la fracción 8 del jugo 2 (J2-8)



Espectro 10. Espectro de masas para la fracción 9 del jugo 2 (J2-9).