



---

---

**Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**

**Instituto de Ciencias Agropecuarias**

**Maestría en Ciencia de los Alimentos**

**“Efecto antimicrobiano de extractos de plantas en medios de cultivo de laboratorio y jamón cocido de cerdo”**

**Tesis**

**Que para obtener el grado de  
Maestro en ciencia de los alimentos**

**Presenta:**

**L. B. Humberto Cortes López**

**Director:**

**Dr. Javier Castro Rosas**

**Tulancingo de Bravo, Hidalgo, 2014.**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN 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 titulada: **"Efecto antimicrobiano de extractos de plantas en medios de cultivo de laboratorio y jamón cocido de cerdo"**, que desarrolla el L.B. Humberto Cortes López.

**Asistentes:**

- Dr. Javier Castro Rosas
- Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
- Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
- Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval

**A. Revisión de Trabajo de Tesis**

**Observaciones:**

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando al L.B. Humberto Cortes 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.  
El 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 el 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 21 de Octubre del 2014.

- Dr. Javier Castro Rosas
- Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
- Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
- Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval





El presente trabajo, forma parte del proyecto “Desarrollo de desinfectantes y conservadores orgánicos para alimentos a partir de plantas” apoyado por el FOMIX-HIDALGO, 2009; clave de proyecto 96887, por lo que el nombre de dos plantas de estudio, así como parte de la información referente a ellas quedará restringida en este trabajo.



## *Agradecimientos*

A mi asesor el Dr. Javier Castro Rosas, por ser un buen guía durante el desarrollo de este gran proyecto de investigación.

A un buen amigo el Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa por sus grandes aportaciones a este trabajo.

Al Dr. José Roberto Villagómez Ibarra, por las grandes enseñanzas y valiosa colaboración en esta investigación.

Al Dr. Otilo Arturo Acevedo Sandoval por el apoyo brindado en ICAp y su colaboración en este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, por compartir sus experiencias y conocimientos durante estos dos últimos años.

A mis amigos de la maestría por el gran apoyo durante este proceso de aprendizaje.

A mi Familia y en particular a mi madre por las palabras de aliento y el apoyo brindado durante toda mi vida.

A todas las personas que de forma directa o indirectamente colaboraron para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradezco al CONACYT por el apoyo brindado para la realización de este proyecto de investigación.

## Índice

I. Introducción .....	1
II. Marco teórico .....	3
2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	3
2.1.1 Microorganismos patógenos en alimentos .....	4
2.2 Carne y productos cárnicos procesados .....	5
2.2.1 Productos curados .....	6
2.2.1.1 Productos curados y madurados .....	7
2.2.1.2 Productos cárnicos curados troceados .....	7
2.2.1.3 Productos cárnicos curados emulsionados y cocidos .....	8
2.2.1.4 Productos curados y cocidos.....	8
2.3 Jamón cocido .....	9
2.3.1 Aditivos en jamón .....	10
2.4 Patógenos en productos cárnicos.....	14
2.4.1 <i>Salmonella</i> .....	15
2.4.2 <i>S. aureus</i> .....	16
2.4.3 <i>L. monocytogenes</i> .....	17
2.4.4 <i>E. coli</i> .....	18
2.4.5 <i>B. cereus</i> .....	20
2.4.6 <i>Clostridium botulinum</i> .....	21
2.4.7 <i>C. jejuni</i> .....	22
2.4.8 <i>Shigella</i> .....	22
2.5 Adición de antimicrobianos a productos cárnicos .....	23
2.6 Antimicrobianos naturales de origen vegetal .....	25
2.6.1 Aceites esenciales .....	28
2.7 Extracción de metabolitos secundarios de origen vegetal .....	31
2.7.1 Cromatografía.....	31
2.7.1.1 Cromatografía en capa fina .....	33

2.7.1.2 Cromatografía en columna.....	34
2.8 Métodos de determinación estructural.....	35
2.8.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	35
2.8.2 Espectroscopia infrarroja (IR).....	37
2.9 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	38
III. Objetivos .....	40
3.1 Objetivo general.....	40
3.2 Objetivos específicos .....	40
IV. Materiales y métodos .....	41
4.1 Metodología general .....	41
4.2 Materiales.....	42
4.2.1 Material biológico (plantas) .....	42
4.2.2 Material biológico (Cepas bacterianas).....	42
4.2.3 Medios de cultivo .....	43
4.2.4 Reactivos y disolventes.....	43
4.2.5 Equipo .....	45
4.3 Métodos.....	45
4.3.1 Obtención de Extractos .....	45
4.3.2 Efecto antimicrobiano por técnica de difusión en placa con discos .....	46
4.3.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	47
4.3.4 Separación de los extractos en fracciones por cromatografía en columna .....	49
4.3.5 Aislamiento y purificación de compuestos antimicrobianos .....	52
4.3.6 Determinación estructural .....	52
4.3.6.1 Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	52
4.3.6.2 Espectroscopia de infrarrojo (IR) .....	53
4.3.6.3 Calorimetría diferencial de barrido.....	53
4.3.7 Estudios en jamón cocido de cerdo.....	54
4.3.7.1 Ingredientes y aditivos en la elaboración del jamón .....	54

4.3.7.2	Equipo utilizado en la elaboración de jamón .....	54
4.3.7.3	Procedimiento en la elaboración de jamón .....	54
4.3.7.4	Evaluación del efecto antimicrobiano en jamón .....	57
4.3.7.4.1	Preparación del inóculo .....	57
4.3.7.4.2	Preparación del material de ensayo (jamón).....	57
V	Resultados y Discusión .....	59
5.1	Efecto Antimicrobiano de las plantas utilizadas en la medicina tradicional de Hidalgo .....	59
5.2	Efecto antimicrobiano de extractos flores, hojas y tallos obtenidos con diferentes disolventes a partir de las plantas con efecto antimicrobiano.....	66
5.4	Separación en fracciones de la planta B por cromatografía líquida (Extracto metanólico) .....	71
5.4.1	Segunda cromatografía de la planta B (extracto metanólico).....	74
5.4.2	Separación de extractos acetónicos de la planta de estudio B por cromatografía líquida.....	77
5.5	Identificación de compuestos activos por RMN .....	80
5.5.1	Espectro del extracto metanólico de la planta B en estudio .....	80
5.5.1.1	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de la colección VI del extracto metanólico de la planta B.....	81
5.5.1.2	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de la colección VI del extracto metanólico de la planta B.....	81
5.5.1.3	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de las colección VIII del extracto metanólico de la planta B.....	85
5.5.1.4	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de la colección XIII del extracto metanólico de la planta B.....	85
5.5.1.5	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de la colección XVIII del extracto metanólico de la planta B.....	85
5.5.1.6	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de la colección VII (recromatografía) del extracto metanólico de la planta B.....	90
5.5.1.7	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de la colección VIII (recromatografía) del extracto metanólico de la planta B .....	90
5.5.1.8	Espectros de RMN de <sup>1</sup> H de la colección XIV y XV de la recromatografía del extracto metanólico de la planta B .....	90
5.5.2	Compuesto aislado del extracto metanólico de la planta B en estudio .....	95
5.5.2.1	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto 1.....	95

5.5.2.2 IR del Compuesto 1 .....	99
5.5.2.3 Punto de fusión por calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	99
5.5.2.4 Espectros de RMN de <sup>1</sup> H a 400 MHz del compuesto 1 (Tratamiento térmico).....	101
5.5.3 Espectro de RMN del extracto Acetónico de la planta B en estudio.....	103
5.5.3.1 Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de la colección VI (compuesto 2) .....	103
5.5.3.2 IR del Compuesto 2 .....	107
5.5.3.3 Punto de fusión por calorimetría diferencial de barrido .....	107
5.5.3. 4 Espectros de RMN de <sup>1</sup> H de la colección V y VII de la recromatografía del extracto acetónico de la planta B.....	107
5.6 Comportamiento de bacterias patógenas en jamón adicionado con extractos, colecciones cromatográficas y compuestos puros aislados de la planta B.....	110
VI. Conclusiones.....	122
VII. Referencias.....	123

## Índice de tablas

<b>Tabla 1. Especificaciones técnicas de Jamón .....</b>	<b>10</b>
<b>Tabla 2. Límites establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002 para productos cárnicos. ....</b>	<b>15</b>
<b>Tabla 3. Algunas plantas con actividad antimicrobiana .....</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 4. Antimicrobianos contenidos en especias.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 5. Eluyentes empleados en cromatografía en capa fina .....</b>	<b>34</b>
<b>Tabla 6. Núcleos de importancia biológica que dan señales de RMN .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 7. Características de absorción en el infrarrojo de algunos grupos funcionales .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 8. Plantas medicinales utilizadas en las pruebas antimicrobianas.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 9. Mezclas de disolventes utilizadas en cromatografía en columna.....</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 10. Aditivos empleados para la elaboración de jamón (Rendimiento 50%)....</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 11. Plantas medicinales con efecto antibacterial<sup>1</sup> .....</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 12. Efecto antimicrobiano de los extractos de flores, hojas y tallos obtenidos con diferentes disolventes<sup>1</sup>.....</b>	<b>68</b>
<b>Tabla 13. Efecto antimicrobiano de los extractos de la planta B .....</b>	<b>70</b>
<b>Tabla 14. Fracciones obtenidas en primera cromatografía de la planta de estudio B .....</b>	<b>71</b>
<b>Tabla 15. Algunas características de las colecciones obtenidas por cromatografía en placa fina de la planta de estudio B .....</b>	<b>72</b>
<b>Tabla 16. Promedio de los halos de Inhibición (mm) de las colecciones cromatográficas de la planta de estudio B .....</b>	<b>74</b>
<b>Tabla 17. Fracciones obtenidas en la segunda cromatografía de la planta de estudio B.....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla 18. Algunas características de las colecciones obtenidas en la segunda cromatografía en placa fina de la planta de estudio B.....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla 19. Fracciones obtenidas del extracto acetónico de la planta de estudio B ...</b>	<b>77</b>
<b>Tabla 20. Algunas características de las colecciones obtenidas del extracto acetónico de la planta de estudio B .....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 21. Promedio de los halos de Inhibición (mm) de las colecciones cromatográficas de la planta de estudio B (extracto acetónico).....</b>	<b>79</b>
<b>Tabla 22. Señales de RMN <sup>1</sup>H a 400 MHz del compuesto 1 .....</b>	<b>98</b>

<b>Tabla 23. Datos de las señales de RMN <sup>1</sup>H del compuesto 2.....</b>	<b>106</b>
<b>Tabla 24. Promedio de los halos de Inhibición (mm) de los extractos, colecciones cromatográficas y compuestos puros con y sin tratamiento térmico. ....</b>	<b>110</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de la metodología general .....	41
Figura 2. Técnica de difusión en placa con discos .....	48
Figura 3 Colocación de muestras en placa de sílica gel.....	51
Figura 4. Proceso de elaboración de jamón .....	56
Figura 5. Evaluación de efecto antimicrobiano en jamón.....	58
Figura 6. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{DMSO-d}_6$ del extracto metanólico de la Planta B .....	82
Figura 7. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{DMSO-d}_6$ de la colección VI del extracto metanólico de la planta B .....	83
Figura 8. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a 400 MHz en $\text{DMSO-d}_6$ de la colección VI del extracto metanólico de la planta B .....	84
Figura 9. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{DMSO-d}_6$ de la colección VIII del extracto metanólico de la planta B .....	87
Figura 10. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{DMSO-d}_6$ de la colección XIII del extracto metanólico de la planta B .....	88
Figura 11. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{DMSO-d}_6$ de la colección XVIII del extracto metanólico de la planta B .....	89
Figura 12. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{DMSO-d}_6$ de la colección VII (recromatografía) extracto metanólico de la planta B .....	92
Figura 13. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{DMSO-d}_6$ de la colección VIII (recromatografía) extracto metanólico de la planta B .....	93
Figura 14. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{DMSO-d}_6$ de la colección XIV y XV (recromatografía) extracto metanólico de la planta B .....	94
Figura 15. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{CDCl}_3$ del compuesto 1 (extracto metanólico) de la planta B.....	97
Figura 16. Espectro de referencia de RMN de $^1\text{H}$ en $\text{CDCl}_3$ del compuesto 1 .....	98
Figura 17. Espectro de IR del compuesto 1 .....	100
Figura 18. Espectro de referencia de IR del compuesto 1 .....	100
Figura 19. Espectros comparativos de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{CDCl}_3$ del Compuesto 1 normal y con tratamiento térmico a una y dos horas.....	102
Figura 20. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{Acetona-d}_6$ del extracto acetónico la planta de estudio B.....	104

Figura 21. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en Acetona- $\text{d}_6$ de la colección VI (compuesto 2) obtenido del extracto de Acetona de la planta B.....	105
Figura 22. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ en Acetona- $\text{d}_6$ del compuesto 2 .....	106
Figura 23. Espectro de IR del compuesto 2 .....	108
Figura 24. Espectro de referencia de IR del compuesto 2 .....	108
Figura 25. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en Acetona - $\text{d}_6$ de la colección V y VII del extracto acetónico de la planta B .....	109
Figura 26. Comportamiento de <i>S. aureus</i> en jamón adicionado con el extracto MeOH de la planta de estudio B.....	112
Figura 27. Comportamiento de <i>S. aureus</i> en jamón adicionado con la colección del extracto MeOH de la planta de estudio B.....	113
Figura 28. Comportamiento de <i>S. aureus</i> en jamón adicionado con el compuesto 1 de la planta de estudio B.....	113
Figura 29. Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> en jamón adicionado con el extracto MeOH de la planta de estudio B.....	114
Figura 30. Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> en jamón adicionado con la fracción del extracto MeOH de la planta de estudio B.....	114
Figura 31. Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> en jamón adicionado con el compuesto 1 de la planta de estudio B.....	115
Figura 32. Comportamiento de <i>S. aureus</i> en jamón adicionado con el extracto de acetona de la planta de estudio B. ....	115
Figura 33. Comportamiento de <i>S. aureus</i> en jamón adicionado con la colección del extracto acetona de la planta de estudio B.....	116
Figura 34. Comportamiento de <i>S. aureus</i> en jamón adicionado con el compuesto 2 de la planta de estudio B.....	117
Figura 35. Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> en jamón adicionado con el extracto de acetona de la planta de estudio B. ....	117
Figura 36. Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> en jamón adicionado con la colección del extracto de acetona de la planta de estudio B.....	118
Figura 37. Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> en jamón adicionado con el compuesto 2 de la planta de estudio B.....	118

## Resumen

Se evaluó el efecto antimicrobiano de treinta y un especies de plantas, utilizadas en la herbolaria, contra bacterias patógenas tanto en medios de cultivo como en jamón cocido de cerdo. Para las pruebas de actividad antimicrobiana se utilizaron las cepas de *Salmonella* Typhimurium, *S. Choleraesuis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157: H7 y *Vibrio cholerae* O1, mediante la técnica de difusión en disco. Posteriormente se realizó cromatografía líquida de la planta denominada como B, que fue la que presentó mayor efecto antimicrobiano y se elucidaron dos moléculas de compuestos termoestables mediante RMN. Finalmente se agregaron extractos, colecciones y compuestos aislados de la planta B (tanto de extractos acetónicos como metanólicos) a jamón cocido, para evaluar su actividad antimicrobiana frente a *S. Typhimurium* y *S. aureus*, mediante la técnica de conteo en placa. Solo *G. inuloides*, *R. chalepensis*, *D. stramonium* y las plantas A y B exhibieron efecto antimicrobiano. Las plantas A y B mostraron efecto antimicrobiano contra todos los microorganismos ensayados. Los extractos de acetona y metanol de la planta B mostraron el mayor efecto inhibitorio contra los microorganismos de estudio. El tratamiento térmico (esterilización; 121 °C por 15 min) de los extractos de acetona y metanol incrementó su efecto inhibitorio. Del extracto metanólico se aisló e identificó el compuesto denominado como “uno” el cual es un éster y cuya actividad antimicrobiana se presenta solo cuando recibe tratamiento térmico. Mientras que del extracto de acetona se aisló el compuesto denominado como “dos” (el cual también resultó ser éster pero distinto al del compuesto 1). Este compuesto 2 presentó efecto antimicrobiano contra los microorganismos de estudio; dicho efecto antimicrobiano también se incrementó cuando los extractos fueron esterilizados por calor húmedo. Finalmente, la incorporación de extractos, fracciones o compuestos puros aislados de la planta B no afectaron significativamente el comportamiento de *S. Typhimurium* y *S. aureus* en jamón cocido de cerdo.

## I. Introducción

El jamón, un producto cárnico cocido curado, es uno de los alimentos de origen animal más consumidos en México. Este tipo de productos a pesar de que son sometidos a procesos térmicos y de curación no son productos estériles. El jamón es un medio apropiado para el desarrollo de bacterias patógenas, puesto que posee una gran cantidad de agua, minerales, compuestos nitrogenados, carbohidratos susceptibles a fermentación y un pH favorable para el desarrollo microbiano.

Dos problemas relacionados con la inocuidad están relacionados con los embutidos: los nitritos que contiene el producto y microorganismos patógenos esporulados que sobreviven al tratamiento térmico o que llegan al producto después del tratamiento térmico.

Cabe señalar que los nitritos son adicionados a los embutidos por dos razones: para proporcionar coloración al producto y para inhibir el desarrollo de *Clostridium botulinum*. No obstante, es sabido que los nitritos pueden formar nitrosaminas las cuales se han identificado como precursoras de cáncer.

En consecuencia, los problemas relacionados con la inocuidad de los embutidos demandan la necesidad de establecer medidas de control opcionales para este tipo de alimentos. Una de las opciones es el uso de antimicrobianos obtenidos de plantas.

Actualmente existe un gran interés en todo el mundo por aislar e identificar compuestos con actividad antimicrobiana a partir de plantas. Estos compuestos podrían aplicarse a diferentes productos, como los embutidos, contribuyendo al control de la inocuidad microbiana de los alimentos y disminuyendo el riesgo que significa el uso de antimicrobianos químicos, como los nitritos.

Las plantas usadas en la medicina tradicional representan una potencial fuente de antimicrobianos. Además de que, la gran mayoría de tales plantas no han sido evaluadas para comprobar su efecto antimicrobiano. En este trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano en medios de cultivo de laboratorio (estudios *in vitro*) de los

extractos de 31 especies de plantas utilizadas en la herbolaria tradicional del estado de Hidalgo contra bacterias patógenas transmitidas por alimentos, así como el efecto antimicrobiano de compuestos obtenidos de una planta directamente en jamón cocido de cerdo (estudios *in vivo*).

## II. Marco teórico

### 2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) han sido definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como: “cualquier enfermedad de carácter infeccioso o tóxico causada por el consumo de alimentos o agua contaminada” (Adams y Moss, 2005).

Por su parte Autio *et al.* (1999) mencionan que la incidencia de este tipo de enfermedades se relaciona directamente con la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y que su contaminación ocurre probablemente durante su elaboración, ya que los patógenos se encuentran en materias primas y algunos de ellos están presentes en los entornos de fabricación (Fonnesbech *et al.*, 2001), lo cual representa una amenaza mayor a la salud cuando se consumen alimentos contaminados con microorganismos patógenos (Bibek, 2005; Adams y Moss, 2005).

Actualmente las enfermedades transmitidas por los alimentos son tal vez el problema de salud más abundante en el mundo. Prueba de ello es que las ETAs de origen microbiano se han convertido en la preocupación de la seguridad alimentaria para la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los organismos nacionales de salud pública en distintos países (Flint *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que el problema de las ETAs, se presenta en países desarrollados como en aquellos que son considerados como subdesarrollados. Enfermedades que se han agudizado en las últimas décadas por diversos factores, tales como: el incremento poblacional, el urbanismo creciente en países desarrollados, la pobreza, el incremento en el comercio internacional de alimentos, además de la aparición de patógenos resistentes a los antibióticos (Pérez *et al.*, 2004).

Dicho problema no se limita simplemente en la salud y bienestar físico de las personas, sino también representa un impacto socioeconómico negativo para los individuos, las familias, las comunidades, las empresas y los países. Ya que, si una persona llega a enfermar, esta representa un peligro como vector de contaminación, además de que presenta una baja en el rendimiento de sus actividades laborales,

ausencia en el trabajo o estudio, lo cual frena la generación de riqueza, incurre en gastos medicinales, con un impacto negativo que afecta sensiblemente la economía nacional (Kopper *et al.*, 2009).

A pesar de las actividades de investigación y vigilancia, no hay una cifra exacta del número de enfermedades transmitidas por los alimentos que ocurren en un determinado periodo de tiempo en una región en particular, como México, por ejemplo; esto porque no todas las incidencias de ETAs son reportadas a las autoridades de salud (López-Palacios y Valdez-Martínez, 2000). No obstante, el número anual de enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos de Norteamérica se estima en 76,000,000 y 5,000 fallecimientos (Jay *et al.*, 2005). Mientras que para México, el número de casos se ha estimado que asciende a los 200 millones de casos anuales (Fernández-Escartín, 2000).

### **2.1.1 Microorganismos patógenos en alimentos**

Los agentes patógenos que son transmitidos por los alimentos y que son de interés sanitario, incluyen parásitos multicelulares, protozoarios, hongos, virus y bacterias (Fernández-Escartín, 2000).

La mayoría de las enfermedades gastrointestinales, son causadas por el consumo de alimentos contaminados con o sin la presencia de microorganismos. De acuerdo con Prescott (2002), los microorganismos que contaminan el alimento y el agua, pueden causar gastroenteritis aguda o inflamación del estómago y el revestimiento intestinal. La gastroenteritis se puede producir de dos maneras. Una forma es cuando los microorganismos colonizan primero el tracto digestivo y se multiplican en su interior, para después invadir los tejidos del huésped o segregar toxinas. Mientras que otra posibilidad es la intoxicación alimentaria, donde el patógeno secreta una exotoxina que contamina el alimento y posteriormente es ingerida, por lo que no es necesaria la presencia de bacterias dentro del individuo para causar enfermedad.

Si bien, es difícil identificar el alimento responsable de la gastroenteritis, existen datos epidemiológicos que nos indican que los alimentos implicados con este tipo

de enfermedades son de origen animal, ya que de forma general, los incidentes que se registran con mayor frecuencia están relacionados con alimentos a base de carne y productos lácteos.

## **2.2 Carne y productos cárnicos procesados**

La industria de la carne asienta sus raíces desde tiempos prehistóricos, prueba de ello lo ratifican los hallazgos de huesos de bóvido y cerdo en los asentamientos de poblaciones de la edad de bronce, lo cual indica que estas especies eran domesticadas y servían como recurso alimentario. Otro ejemplo es el de los aborígenes de América los cuales desecaban carne; las técnicas de salazón y ahumado eran conocidas antes del tiempo de Homero (año 1000 a. C.); la elaboración y especiado de algunos tipos de embutidos eran comunes en Europa y algunas zonas mediterráneas mucho antes de los tiempos de los cesares (Price y Schweigert, 1994).

La carne es un medio útil y eficiente de proteína, que proviene de músculos esqueléticos de diversos animales que se caracteriza por su estructura fibrosa y su textura suave (Gálvez-Mariscal *et al.*, 2006). Lawrie (1998), define a la carne como el alimento procedente de la musculatura de los animales, aunque éste término se amplía para abarcar además de la musculatura, órganos tales como hígado, riñón, cerebro, ojos y otros tejidos comestibles.

Desde el punto de vista nutricional la carne aporta a la dieta humana un gran porcentaje de proteínas, grasas y minerales. Los valores medios para la composición bruta y el contenido energético de la fracción comestible de la carne fresca son: proteína 17%; grasa 20%; humedad 62%; cenizas 1%; y calorías 250/100 g, esto en carnes con recubrimiento graso con 1 cm de espesor. Mientras que para los músculos magros que son más uniformes en composición: proteína 20%; grasa 9%; humedad 70%; cenizas 1%; y calorías 160/100 g (Schweigert, 1994).

Además se ha reportado que la carne aporta aminoácidos esenciales para el cuerpo, especialmente durante el desarrollo del humano. De igual forma, se ha

demostrado que el consumo de proteína de buena calidad está relacionado con el correcto funcionamiento del sistema inmunológico, por lo que a mayor calidad de proteína, mejores serán las defensas del cuerpo humano. La carne también aporta minerales tales como el hierro, zinc y fósforo, además de todas las vitaminas del complejo B, encontrándose en mayor proporción la timina, riboflavina, niacina, piridoxina y cobalamina (Velasco, 1996).

En el caso de las carnes curadas y procesadas, son también ricas en proteína y otros nutrientes pero varían en su composición dependiendo de la naturaleza de la carne, los ingredientes y del método de preparación (Schweigert, 1994). En consecuencia el proceso de transformación de la carne y las condiciones de producto acabado deben mantener condiciones que impidan el crecimiento de microorganismos patógenos y que retrasen el desarrollo de los deterioradores.

Una vez que la carne se procesa, se permite disponer de una diversidad de productos formulados y por tanto una mayor vida de anaquel comparada con la carne que no es procesada. Los tratamientos pueden consistir en cocción, fermentación, ahumado, desecación y curación. Además de que la tecnología actual permite obtener productos de extensión mediante la adición de proteínas, féculas, texturizantes y saborizantes (Fernández-Escartín, 2000).

### **2.2.1 Productos curados**

A lo largo de la historia el curado ha sido utilizado por diversas culturas con la finalidad de preservar por mayor tiempo a los alimentos. Una forma simple de definir al curado de la carne de acuerdo con Townsend y Olson (1994), es como un proceso en el cual se lleva a cabo la adición de sal, azúcar y nitritos y/o nitratos a la carne. Para Prändl (1994), por curado también se entiende la adición de productos curantes (nitritos y nitratos) a la carne, esto con la finalidad de prolongar su capacidad de conservación, así como para conferir sabores y aromas característicos, además de un color típico de los productos curados.

Dentro de los productos cárnicos curados podemos encontrar aquellos que son crudos y por otra parte a los cocidos.

Los productos cárnicos curados crudos son por lo general o bien curados (en seco), es decir, frotados con una mezcla de sal común, sustancias curantes, azúcar y en ocasiones condimentos, o bien se someten a un proceso combinado de secado y curado húmedo, para posteriormente ser ahumados y desecados.

Mientras que los productos cárnicos curados cocidos, son curados exclusivamente en húmedo, es decir se tratan con una solución salina con sustancias curantes para posteriormente tratarlos térmicamente (Fisher, 1994).

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-122-SSA1-1994, los productos cárnicos curados y cocidos, “son aquellos que se elaboran con carne de animales de las especies declaradas aptas para consumo humano por la autoridad sanitaria, sometidos a la acción de los agentes de curación en seco o húmedo y a cocción hasta una temperatura de 68 °C en su centro térmico”. Dentro de los cuales se pueden mencionar a jamones del tipo horneado, ahumado, tipo americano, tipo Virginia, tipo holandés y tipo York; además de productos sujetos al mismo proceso como lomos, tocinos, chuletas, entrecot y espaldilla.

Dentro de los productos cárnicos curados que se consumen en México se encuentran los productos curados y madurados, productos cárnicos troceados, emulsiones cárnicas y productos cocido-curados (Herendia y Garnica, 1994).

#### **2.2.1.1 Productos curados y madurados**

Este tipo de productos cárnicos son elaborados a partir de cortes definidos de especies aptas para consumo humano, los cuales se someten a curación, deshidratación, pueden ser o no ahumados, y madurados por determinado tiempo para asegurar su calidad sanitaria. Encontrando productos como jamón crudo, jamón tipo westfalia y jamón serrano tipo español (Herendia y Garnica, 1994).

#### **2.2.1.2 Productos cárnicos curados troceados**

Este tipo de productos son elaborados mediante el cortado o picado de carne hasta lograr trozos, no menores a 2 mm a los que comúnmente se incorporan aditivos,

especias y sales curantes. Los productos que se encuentran dentro de esta categoría son el salami, el queso de puerco, salchichones, butifarras, sobreasadas, fiambres y chorizo (Herendia y Garnica, 1994).

Este tipo de productos pueden consumirse en fresco o después de secado (baja  $a_w$ ). Un claro ejemplo de este tipo de productos son los chorizos que en México su consumo es fresco principalmente, ya que no tienen un proceso de maduración y fermentación.

### **2.2.1.3 Productos cárnicos curados emulsionados y cocidos**

Estos productos se elaboran con carne de una o más especies, viseras y otros subproductos comestibles, los cuales pueden o no ser ahumados. Dentro de estos productos podemos encontrar salchichas, pasteles mortadelas, salchichones, bolognas y pates (Herendia y Garnica, 1994).

Este tipo de productos se caracterizan por tener una fase dispersa (en este caso grasa) y una fase continua (conformada por agua, proteínas, y otros compuestos) por lo que es necesario aplicar un emulsificante (proteínas solubles en agua como sarcoplásmicas y miofibrilares) para estabilizar el sistema. El cocimiento de este tipo de productos se aplica con la finalidad de que las proteínas coagulen y se forme una masa constante como ocurre con las salchichas Viena y pastel de pollo (González-Tenorio y Soto-Simental, 2007).

### **2.2.1.4 Productos curados y cocidos**

Este tipo de productos se elaboran con los cortes definidos y específicos de especies animales como: suina, bovina, ovina y aves de corral autorizadas, los cuales se someten a proceso de curación y cocción ya sea húmeda o seca, con la finalidad de alcanzar una temperatura interna de 68 °C. Los productos genéricos son jamón cocido, curado cocido y ahumado, curado horneado, jamón tipo holandés, tipo york, tipo americano, tipo virginia, además de lomos, espaldilla, tocino, chuletas y entrecot (Herendia y Garnica, 1994).

Productos como el jamón deben de tener como características principales la capacidad de retener agua y el ligado de los músculos. Los elementos musculares que dan estas características son las proteínas miofibrilares, ya que al ser extraídas y solubilizadas forman el exudado. Este exudado permite que las proteínas retengan agua a través de la formación de redes. Para solubilizar este tipo de proteínas es necesario someter a un proceso mecánico (tumbleado o malaxado) o químico. Posterior a estos procesos en los cuales se combinan aditivos e ingredientes así como la sal cura, se procede a la maduración de la pasta a bajas temperaturas (menor a 8 °C) durante un periodo de 12 h, para posteriormente embutir y cocer el producto hasta alcanzar una temperatura interna mínima de 68 °C, para finalmente enfriar y refrigerar a 4 °C, con la finalidad de evitar el desarrollo de patógenos y deterioradores (González-Tenorio y Soto-Simental, 2007).

### **2.3 Jamón cocido**

El jamón actualmente se consume en cantidades considerables a nivel mundial en comidas frías y sándwiches principalmente (Varnam y Sutherland, 1998). En la cocina mexicana, es común encontrarlo en alimentos como quesadillas (tortilla mexicana con queso y muchas veces jamón), los sándwiches y en combinación con huevo (en omelet). Un plato típico mexicano con jamón es el “niño envuelto”, lo cual son rollos de pan, mayonesa, jamón y queso amarillo. Además, el jamón es un ingrediente importante en platos preparados, sobre todo en ensaladas y pizzas, además de ser consumido como bocadillo.

De acuerdo con la Norma oficial Mexicana el Nom-158-SCFI-2003. Se denomina jamón, al producto alimenticio, elaborado exclusivamente con la carne de las piernas traseras del cerdo (*Sus scrofa domesticus*), los cuales son declarados aptos para el consumo humano por la autoridad responsable.

De forma general, el jamón se fabrica actualmente con porciones de pierna de cerdo con el mínimo grasa, las cuales se masajean, posteriormente se inyectan con una solución de sales de curación o se sumergen en ella, almacenando a bajas temperaturas. Posteriormente se colocan en un empaque con cierre hermético para

ser cocidos en un molde metálico a temperaturas que van desde los 75 °C a los 80 °C. Después del proceso de cocción se enfrían con chorro de agua fría y se refrigera (Fernández-Escartín, 2000).

De acuerdo con la Norma oficial Mexicana el Nom-158-SCFI-2003 existen diversos grados de calidad para el jamón y su comercialización (Tabla 1).

**Tabla 1. Especificaciones técnicas de Jamón**

Clasificación comercial	% PLG* Mínimo	% Grasa Máximo	% Humedad Máximo	% Proteína adicionada	%Carragenina Máximo	% Fécula Máximo
Extrafino	18	6	75	0	1,5	0
Fino	16	6	76	2	1,5	0
Preferente	14	8	76	2	1,5	5
Comercial	12	10	76	2	1,5	10
Económico	10	10	76	2	1,5	10

\* Proteína total libre de grasa, incluyendo en su caso la proteína adicionada.

### 2.3.1 Aditivos en jamón

Dentro de los principales aditivos (sustancias que se adicionan intencionalmente con fines tecnológicos y organolépticos) utilizados en jamón se encuentran:

#### **Colorantes**

Este tipo de sustancias tienen como finalidad añadir o devolver el color a un alimento e incluyen componentes naturales de sustancias alimenticias y otras fuentes naturales que no son consumidos normalmente como alimentos por sí mismos y no son habitualmente utilizados como ingredientes característicos en alimentación (Madrid y Madrid, 2000).

El carmín de cochinilla, colorante que se caracteriza por ser estable a la luz, a la temperatura y pero no a la variación pH, ya que en condiciones alcalinas ofrece tonos Rojo-azulados, mientras que en pH ácido predomina la tonalidad roja (Cubero *et al.*, 2002). Es el más utilizado ya que el color rosado que da al jamón es bastante natural.

El extracto de bija o annato que contiene sal sódica de la norbixina (carotenoide), presenta tonalidades que van desde el naranja-amarillo hasta el naranja-rojo intenso. Este colorante ha sido empleado para productos cárnicos por su afinidad por las proteínas (Cubero *et al.*, 2002), sin embargo para jamón cocido presenta coloración amarillenta y es poco estable a la luz (Anónimo, 2004).

La hemoglobina estabilizada, esterilizada y deshidratada se ha utilizado de igual forma en este producto, sin embargo es poco estable a la luz y al oxígeno por lo que tiende a dar un color marrón (Anónimo, 2004).

El nitrito es un conservador que da a la carne curada su sabor y color característicos. El nitrito no actúa sobre la carne como tal, sino que la principal responsable de los efectos producidos es la molécula de óxido nitroso. Así el óxido nitroso el cual es sumamente reactivo y reacciona parcialmente con la mioglobina formando nitrosomioglobina pigmento responsable de la coloración del jamón cocido (Lien y Velazco, 2001)

El color normal de carnes curadas, depende principalmente de tres factores que son: la concentración de pigmentos en los tejidos, el grado de conversión del pigmento nitrosilado y el estado de las proteínas de la carne. El color rosa característico del jamón cocido y de las salchichas tipo Frankfurt, se debe principalmente a que la concentración de pigmentos es mucho menor y las proteínas están desnaturalizadas por tanto son más opacas (Jay y Fox, 1994).

En el tejido cárnico existe una amplia variedad de compuestos endógenos capaces de reducir el nitrito tales como las cisteína, el nicotín adenín dinucleótido reducido, los citocromos y las quinonas. Sustancias reductoras que exceden por mucho a los pigmentos hemo y a los nitritos añadidos, por lo que son suficientes para producir el color de la carne curada. Sin embargo puede ocurrir la pérdida de estas sustancias, por lo que es necesario añadir vitamina C para acelerar el desarrollo del color curado (Jay y Fox, 1994).

El nitrato es un aditivo que como tal no tiene acción nitrificante sobre la carne, si no que sus efectos son principalmente por su transformación a nitritos por la acción de

lactobacterias y enterobacterias las cuales producen la enzima nitrato reductasa la cual es responsable de dicha transformación. Así el nitrito que se forma a partir de nitrato, permite una cierta regeneración del color, por lo que en la práctica habitual de la fabricación de jamón cocido es posible una curación mixta empleando mezclas de nitrato y nitrito (Anónimo, 2004).

El color es una de las características más importantes de la carne, ya que es el principal atributo que se juzga por parte del consumidor al adquirir tanto carnes frescas como curadas. Sin embargo la función en el color por parte de los nitritos y nitratos no solo es cosmética. Ya que el complejo con óxido nítrico responde a condiciones estresantes de una manera similar a como la hacen los pigmentos de las carnes frescas; así, el pigmento de la carne curada se convierte en un indicador de la calidad de este tipo de productos. Un ejemplo de esto, son las carnes curadas que son expuestas al aire, particularmente bajo una luz intensa pierden el color y se tornan pardas. No se ha hallado hasta ahora un sustituto para el nitrito de las carnes curadas y los encontrados hasta ahora no cumplen con las funciones específicas de esta sal curante (Jay y Fox, 1994).

### ***Conservadores***

Este tipo de sustancias tienen como principal objetivo prolongar la vida útil de los alimentos, protegiéndoles frente al deterioro causado por microorganismos (Madrid y Madrid, 2000).

Si bien su uso se ha reducido gracias a la mejora en cuanto a tratamientos térmicos, adecuada refrigeración y condiciones de fabricación, en algunos países aún se utilizan sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio, además de soluciones de propil-parabenceno (Anónimo, 2006). Aunque los sorbatos son poco efectivos al pH del jamón cocido, inhiben el desarrollo de mohos, pero su efectividad es mucho menor contra levaduras y bacterias. Mientras que los benzoatos su única forma activa (ácido benzoico) la presentan a pH inferior a 4, son menos eficaces comparados con los sorbatos (Anónimo, 2004).

### ***Antioxidantes***

Este tipo de aditivos prolongan la vida útil de los productos alimenticios protegiéndolos frente al deterioro causado por la oxidación, tales como el enranciamiento de las grasas, cambio de color (Madrid y Madrid, 2000) sabor y aroma (Anónimo, 2006).

Actualmente se utilizan principalmente L- ascorbato de sodio y su isómero el eritorbato de sodio. El primero es un producto habitual en nuestra dieta conocido como ácido ascórbico o vitamina C, por lo que es aceptado en todas las legislaciones, mientras que el segundo no es autorizado para su uso en algunos países. Además de que el ascorbato funciona como agente reductor frente al nitrito, convirtiendo a este último en óxido nitroso facilitando la formación de la nitrosomioglobina. De igual forma contribuye a la estabilidad del producto terminado y a evita la formación de nitrosaminas cancerígenas, bloqueando la formación de agentes nitrosantes ( $N_2O_3$ ) a partir del óxido nitroso (Anónimo, 2004).

### ***Fosfatos***

En el jamón es común utilizar mezclas de tripolifosfato, pirofosfato y hexametáfosfato, estos aditivos cumplen con dos funciones principales, una es favorecer la solubilidad y extracción de proteínas miofibrilares y por otro lado aumentar la capacidad de retención de agua durante su cocción evitando la decoloración del producto (Anónimo, 2004).

### ***Estabilizantes y espesantes***

Los estabilizantes son aditivos que posibilitan el mantenimiento del estado fisicoquímico de un alimento. Dentro de estos se incluyen las sustancias que permiten el mantenimiento de una dispersión homogénea de dos o más sustancias no miscibles en un alimento y también se incluyen aquellas sustancias que estabilizan, retienen o intensifican un color. Mientras que los espesantes son aquellas sustancias que tienen como principal función aumentar la viscosidad de un alimento (Madrid y Madrid, 2000).

En jamón cocido se utilizan comúnmente carragenatos, ya que sus mezclas comerciales suelen estar constituidas por las tres fracciones lambda, capa e iota, además de porciones pequeñas de gomas y alguna sal (cloruro de potasio). Algunas mezclas pueden utilizarse como espesantes de salmuera, mientras que otras buscan el efecto de aprovechar la capacidad de retención de agua de los carragenatos (estabilizante) mediante su gelificación (Anónimo, 2004).

### **Potenciadores de sabor**

Estos aditivos potencian el sabor propio de la carne, ya que exaltan la percepción olfativa gustativa de este sabor. El más utilizado de estos aditivos es el glutamato monosódico el cual es utilizado en jamón cocido, aunque existen otros potenciadores como el inosinato sódico y el guanilato sódico que presentan una mayor potencia de sabor comparado con el glutamato, pero no se usan en jamón cocido ya que tienen un precio mayor (Anónimo, 2004). Frecuentemente se utilizan azúcares (sacarosa o glucosa) y sales para potenciar el sabor en la preparación de productos curados como el jamón (Schweigert, 1994).

## **2.4 Patógenos en productos cárnicos**

La carne es un alimento en el cual se pueden desarrollar bacterias y hongos patógenos, ya que es un medio apropiado para su crecimiento, puesto que posee una gran cantidad de agua, minerales, compuestos nitrogenados, carbohidratos susceptibles a fermentación y un pH favorable para el desarrollo de este tipo de microorganismos (Fernández-Escartín, 2000).

Los microorganismos patógenos que se transmiten comúnmente a través del consumo de alimentos de origen animal y que se detectan con mayor frecuencia son: *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sp.*, *Clostridium botulinum*, *Listeria*, *Campylobacter* y *Bacillus cereus* (Desdémona-Martínez *et al.*, 2000; López- Palacios y Valdez-Martínez, 2000).

En el caso de las carnes cocidas y curadas como el jamón, no son productos estériles pero es posible elaborarlos con un mínimo de carga microbiana una vez

que se empaacan se restringe su desarrollo mediante refrigeración (Fernández - Escartín, 2000). Además de que existen límites establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002 para productos cárnicos procesados donde se estipulan los límites permitidos de microorganismos (Tabla 2).

**Tabla 2. Límites establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002 para productos cárnicos.**

Producto	Mesófilos aerobios (UFC/g)	Coliformes fecales (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp en 25 g	<i>Trichinella spiralis</i>	Cisticercos
<b>Cocidos</b>	10,000 <sup>1</sup> 60,000 <sup>2</sup>	< 3	Ausente	N.A	N.A
<b>Crudos</b>	N.A.	N.A.	Ausente	Ausente <sup>3</sup>	N.A
<b>Curados</b>	N.A.	< 3	Ausente	N.A	N.A
<b>Marinados o en salmuera</b>	N.A.	< 3	Ausente	N.A	N.A
<b>Fritos</b>	N.A.	N.A.	N.A.	N.A	Ausente

1 = En planta

2 = En punto de venta

3 = No aplica a madurados crudos

N.A. = No aplica

A pesar de que existen este tipo de normas, cabe mencionar que es frecuente la presencia de patógenos en este tipo de productos. A continuación se describen algunas de las bacterias asociadas con enfermedades transmitidas por este tipo de alimentos.

#### **2.4.1 *Salmonella***

El género *Salmonella* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, no esporulados, los cuales miden aproximadamente de 1 a 2 µm. La mayoría de las salmonellas son móviles (excepto *S. pullorum* y *S. gallinarum*) ya que presentan flagelos peritricos (Bhunja, 2008).

Crecimiento: son mesófilas, con temperatura de crecimiento óptima entre 35 °C a 37 °C, aunque generalmente tienen un rango de crecimiento de 5 °C a 46 °C (Bibek, 2005). Son capaces de crecer a pH bajo y generalmente son sensibles a concentraciones elevadas de sal. *Salmonella* forma cadenas filamentosas cuando

crece a las temperaturas extremas de 4 °C, 8 °C o 44 °C y también cuando crece a pH de 4,4 a 9,4 (Bhunja, 2008).

Hábitat: Las salmonellas son habitantes naturales del tracto gastrointestinal del humano así como de animales domésticos y silvestres. Esta bacteria es liberada al medio ambiente cuando se expulsa por las heces fecales por lo que también han sido aislados de suelo, agua y de aguas residuales contaminadas con materia fecal (Fernández-Escartín, 2000; Bibek, 2005).

Los alimentos de origen animal se han asociado con un gran número de brotes de salmonelosis, estos incluyen carne de res, pollo, pavo, cerdo, huevos, leche y productos derivados, destacando: mayonesa casera, helados, leche en polvo, muslos de pollo, sándwiches de atún y salmón, jamón, huevas de bacalao, carne asada, además de manzana, ensalada de col, harina de pescado, mariscos, langostinos y granos de cacao (Adams y Moss, 2005).

#### **2.4.2 *S. aureus***

Son cocos Gram positivos de forma esférica a las células ovoides miden aproximadamente 1 µm de diámetro. Son inmóviles no formadores de espora, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobios facultativos. La división celular se produce en más de un plano, por lo que las células forman generalmente racimos similares al de uvas (Adams y Moss, 2005).

Crecimiento: Son microorganismos mesófilos, con un rango de temperatura de crecimiento de 7 °C a 48 °C con crecimiento bastante rápido entre 20 °C y 37 °C. Pueden crecer en  $a_w$  relativamente bajo (0,86), pH bajo (4,8) y concentraciones altas de sal y azúcar (15 %), además de poder desarrollar en presencia de NO<sub>2</sub> (Bibek, 2005).

Hábitat: frecuentemente son aisladas de piel, nariz, garganta y cabello de los seres humanos sanos, también se han detectado en materia fecal tanto de niños como de adultos. En animales, se ha detectado en piel, cloaca, faringe y ojos de aves, mientras que en bovinos se han aislado de pelo y ubres (Fernández-Escartín, 2000).

La intoxicación alimentaria estafilocócica, considera una de las enfermedades más frecuentes de transmisión alimentaria en todo el mundo, es causada por las toxinas de *S. aureus* que pueden encontrarse en alimentos como: jamón, cecina, salchichón, tocino, carne a la parrilla, ensaladas, productos de pastelería que contienen crema, salsas, quesos, carne de cerdo, carne de res, pavo, pollo, huevo, hongos enlatados, helado, salsa holandesa, arroz, leche, leche en polvo y leche con chocolate (Bibek, 2005; Adams y Moss, 2005; Prescott, 2002).

#### **2.4.3 *L. monocytogenes***

Bacilos, Gram positivos de aproximadamente 0.4 - 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.5 - 2.0  $\mu\text{m}$  de longitud, algunas veces pueden tener forma cocoide, apareciendo como células individuales o cadenas cortas. Estos microorganismos son anaerobios facultativos, no esporulados, móviles entre 20 ° a 25 °C, ya que presentan de 3 a 4 flagelos periféricos los cuales carecen de movilidad a 37 °C (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2009).

Crecimiento: *L. monocytogenes* es un psicrótrofo y crece entre 1 ° y 44 °C, con crecimiento óptimo de 35 ° a 37 °C. De 7 ° a 10 °C, se multiplica de forma relativamente rápida. Las células son relativamente resistentes a la congelación, al secado, a concentraciones salinas elevadas, pH 5,0 y por encima de este valor (Bibek, 2005).

Hábitat: es una bacteria común en el medio ambiente, su hábitat primario es la tierra y la materia vegetal, en donde persiste como un saprófito (Fernández-Escartín, 2000). Se aísla a partir de los contenidos intestinales de los animales domesticados y aves. Los seres humanos también pueden transportar los microorganismos en el intestino sin ningún síntoma (Bibek, 2005).

Considerando su amplia ubicuidad de *L. monocytogenes* la podemos encontrar en alimentos como: ensalada de col, apio, tomates, lechuga, leche cruda y pasteurizada, queso suizo, queso camembert, productos cárnicos como salchicha de cerdo, salchichas de pavo, carne de pollo, lenguas de cerdo. Cabe mencionar que este patógeno es resistente a ingredientes de curado ya que se ha encontrado

en una variedad de embutidos como el salami, carne de res, queso de puerco y jamón envasado al vacío (Adams y Moss, 2005).

#### **2.4.4 *E. coli***

*E. coli* es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria no esporulada, anaerobia facultativa, es normal habitante del tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente y aves. Debido a que normalmente está presente en un nivel muy alto en el intestino grueso, durante mucho tiempo se ha utilizado como un organismo índice para la posible contaminación fecal y la presencia de patógenos entéricos en alimentos y agua (Bibek, 2005; Adams y Moss, 2005).

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina vero o toxina semejante a la Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Prescott, 2002; Rodríguez-Ángeles, 2002).

Las cepas pertenecientes a ETEC producen dos enterotoxinas, las cuales son causantes de la típica diarrea del viajero (Madigan *et al.*, 2004). La enterotoxina LT es una proteína termolábil que se destruye a 60°C en 30 minutos, mientras que las toxinas ST (termoestable) pueden soportar 100 °C durante 15 minutos. Estas cepas se adhieren al intestino delgado y lo colonizan por medio de los antígenos fímbricos factores de colonización (CFA), los cuales son codificados por plásmidos. El síndrome se caracteriza por diarrea acuosa no sanguinolenta sin exudados inflamatorios en las deposiciones (Jay *et al.*, 2005).

Las cepas EHEC producen una verotoxina, enterotoxina similar a la producida por *Shigella dysenteriae*, la toxina Shiga. La verotoxina producida por *E. coli* O157: H7 causa diarrea hemorrágica y fallo renal (Madigan *et al.*, 2004). En los últimos 20 años, *E. coli* O157: H7 (Enterohemorrágica, EHEC) ha sido considerado como un patógeno emergente de gran impacto en la salud pública. Esta bacteria ha sido

identificada como una cepa causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) a nivel mundial, principalmente por alimentos de origen bovino (Narváez-Bravo *et al.* 2007).

Las cepas EIEC son causantes de enfermedades invasivas en el colon produciendo diarrea con sangre (Madigan *et al.*, 2004). Este patógeno generalmente no produce enterotoxinas, pero penetran y se multiplican en las células epiteliales del colon y después se propagan a la células continuas, ya que poseen plásmidos enteroinvasores (pINV). Este tipo de cepas han sido aisladas en personas que presentan diarrea del viajero y se ha comprobado que estos organismos son frecuentes en deposiciones diarreicas de infantes (Jay *et al.*, 2005).

Las cepas EPEC causante de diarreas en niños y recién nacidos, no producen enfermedades invasivas o toxinas (Madigan *et al.*, 2004). Su adherencia a la mucosa intestinal es gracias a que poseen factores de adherencia mediados por plásmidos. Los síntomas de la infección son malestar general, vómito y diarrea con deposiciones que contienen moco pero rara vez sangre (Jay *et al.*, 2005).

Las cepas EAEC presentan un tipo de adherencia única a las células HEp-2 mediante fimbrias que se producen mediante un plásmido de 60 MDa y una proteína específica de membrana externa (OMP). Este tipo de cepas no son causa principal de la diarrea de los viajeros, sin embargo, producen una diarrea persistente que dura más de 14 días principalmente en niños (Jay *et al.*, 2005).

El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos. Este tipo de cepas, no forman micro colonias cuando se adhieren a células Hep-2, ya que se caracteriza por presentar una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido (Rodríguez-Ángeles, 2002).

Crecimiento: *E. coli* es un mesófilo típico que crece de 7 °C a 46 °C con un óptimo alrededor de 37 °C, aunque se ha informado de algunas

cepas ETEC que crecen a temperaturas tan bajas como 4 °C. Puede sobrevivir en refrigeración o congelado durante largos períodos. El pH neutro es óptimo para el crecimiento, pero el crecimiento es posible a pH 4,4 bajo condiciones óptimas. Su  $a_w$  mínima, para crecimiento es 0.95 (Adams y Moss, 2005).

Este patógeno se encuentra relacionado con diversos alimentos tales como: quesos frescos, agua, ensalada de papa, sustituto del café, sushi, carne molida, leche cruda, carne de cerdo, pollo y cordero, hamburguesas, lechuga, jugo de manzana, salchichas y mayonesa (Bibek, 2005; Adams y Moss, 2005).

#### **2.4.5 *B. cereus***

*B. cereus* son bacilos Gram positivos formador de esporas, móvil, aerobio pero crece bien en anaerobiosis. Se caracteriza por causar diarrea y vómitos. La diarrea es producida principalmente por una enterotoxina producida durante su crecimiento vegetativo en el intestino delgado, mientras que la toxina emética se produce en el alimento (Zamudio-Maya, 2010).

Crecimiento: Los límites de temperatura para el desarrollo de este tipo de microorganismo están entre 10 ° y 50 °C, siendo su óptima de 30 °C. Puede crecer en rangos de pH que van desde los 4.4 a 8.8, aunque su óptimo es de 6 a 7. La mínima  $a_w$  para su desarrollo es de 0.91, teniendo un óptimo crecimiento a 0.95 (Martínez -González *et al.*, 2002).

*B. cereus* se desarrolla bien después de la cocción y durante el enfriamiento por debajo de los 48 °C. El tratamiento térmico activa la germinación de las esporas además de eliminar competencia (Zamudio-Maya, 2010).

Hábitat: Las bacterias de este género son de vida libre, ya que no tienen un huésped adaptado y sus esporas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza.

Este microorganismo se encuentra distribuido ampliamente en los alimentos, tales como: leche, carne, cereales, almidón, especias. Alimentos que especialmente han sido cocinados y procesados en los que el tratamiento antibacteriano aplicado

(cocción) deja una flora residual de esporas o bien alimentos que han estado en contacto con el polvo (Martínez-González *et al.*, 2002).

#### **2.4.6 *Clostridium botulinum***

Estos microorganismos son Gram positivos, esporulados anaerobios. Existen siete tipos antigénicos de toxina producidos por diferentes cepas de esta especie, y se identifican como serológicamente como tipos A-G. De las siete cepas mencionadas los tipos A, B y E son los más importantes para el humano. Este tipo de toxinas son proteínas termolábiles, por lo que se inactivan a una temperatura de 85 °C durante 15 min. Mientras que las esporas son termoestables a excepción del tipo E (Niven, 1994; Madigan *et al.*, 2004).

Crecimiento: para los tipos A y B la temperatura mínima de desarrollo es de 10 °C con una óptima de 35 °C y la máxima de crecimiento es de 50 °C. Para *C. botulinum* tipo E su temperatura óptima de crecimiento es de 28 ° a 30 °C, con una mínima de 3 ° y 3.3 °C para la formación de toxina. El pH mínimo para el crecimiento de este patógeno es de 4.5, la  $a_w$  que estos microorganismos requieren es de 0.94 para los tipos A y B, mientras que para el tipo E se requiere de 0.97 para su crecimiento (Fernández-Escartín, 2000).

Hábitat: Las esporas de *C. botulinum* son ampliamente distribuidas en el suelo y las aguas tanto dulces como saladas (Madigan *et al.*, 2004).

El botulismo es considerado una de las enfermedades más graves de las intoxicaciones alimentarias (Niven, 1994). Esta enfermedad se ha relacionado con el consumo de alimentos los cuales no han sido cocinados después de haber sido procesados, por ejemplo pescado fresco y ahumado empaquetados al vacío, vegetales envasados domésticamente como maíz y legumbres, así como cárnicos enlatados (Madigan *et al.*, 2004).

#### **2.4.7 *C. jejuni***

Bacilo Gram negativo, no esporulado, con forma alargada y curvada, que presenta movilidad mediante uno o dos flagelos polares (Niven, 1994). Esta bacteria es causante de infecciones intestinales en el hombre, sin embargo, puede estar presente en el tracto digestivo de los animales y no causar daño. La enfermedad causada por este patógeno se presenta como una enteritis febril similar a la causada por salmonelosis. Sin embargo es común que aparezcan complicaciones en diversos órganos, sobre todo artritis y meningitis. Mientras que en niños puede presentarse septicemia (Sinell, 1994)

Crecimiento: Requiere bajas tenciones de oxígeno para crecer (Madigan *et al.*, 2004). La atmosfera ideal para su desarrollo es de 5% de oxígeno y 10 % de CO<sub>2</sub>. Crece a temperaturas razonablemente altas, siendo su óptimo de alrededor de 42 °C (Niven, 1994).

Hábitat: este microorganismo es ubicuo en la naturaleza y es frecuentemente localizado en el intestino de los animales de sangre caliente. Es causante de abortos en ovejas, hepatitis en pollos, además de gastroenteritis e infección urinaria en el hombre (Niven, 1994).

Los vehículos responsables de la transmisión de este patógeno en el humano son principalmente el agua, la leche cruda, así como las carnes de cerdo y pollo (Niven, 1994), almejas crudas y otros bivalvos, o en aguas superficiales no sujetas a cloración (Madigan *et al.*, 2004).

#### **2.4.8 *Shigella***

Las bacterias pertenecientes a este género son bacilos Gram negativos inmóviles, aerobios facultativos. Consiste de cuatro especies, todas ellas patógenas para el humano. Se distinguen por algunas características bioquímicas y serológicas (antígenos O lipopolisacáridos): *S. dysenteriae*, subgrupo A; *S. flexneri*, subgrupo B; *S. boydii*, subgrupo C; y *S. sonnei*, subgrupo D (Fernández-Escartín, 2000).

Crecimiento: su rango de temperatura de crecimiento es de 6 ° a 46 °C, aunque su óptima es de 43 °C (Fernández-Escartín, 2000).

Hábitat: *Shigella* es generalmente considerado como organismo más bien frágil que no sobrevive fuera de su hábitat natural, que es el intestino de los seres humanos y otros primates (Adams y Moss, 2005).

Estas bacterias se han encontrado en verduras y leche cruda, de igual forma se ha reportado que sobreviven en frutas como papaya y jícama, quesos no fermentados, leche pasteurizada, huevo, almejas y ostiones (Fernández-Escartín, 2000).

## **2.5 Adición de antimicrobianos a productos cárnicos**

Para evitar el desarrollo de microorganismos patógenos en alimentos destinados al consumo humano, algunas sustancias bacteriostáticas son bien aceptadas, ya que, incrementan la presión osmótica, reducen la  $a_w$  por debajo de los mínimos de desarrollo bacteriano. Dos compuestos de uso común son la sal y el azúcar (Niven, 1994).

En los productos cárnicos, la sal es un conservante muy utilizado, siendo el componente más importante en la preservación carnes curadas. Mientras que el azúcar, los fosfatos y otros aditivos, favorecen características como el color del curado, la textura y el sabor, pero no contribuyen a la estabilidad microbiológica del producto (Niven, 1994).

Dentro de los ingredientes que inhiben el crecimiento bacteriano en carne y productos cárnicos procesados se encuentran:

**Sales** como el cloruro de sodio (NaCl) que induce plasmólisis o deshidratación celular. Dentro de las sales más comunes se encuentran los lactatos (calcio, sodio y potasio), los benzoatos (sodio y calcio), los sorbatos (potasio, sodio y calcio) y propionatos (sodio y calcio) que en solución se transforman en ácido láctico, ácido benzoico, ácido sórbico y ácido propiónico respectivamente (Rocha, 2001).

**El lactato** es una de las sustancias que se aplica en gran variedad de cárnicos con o sin nitritos. Estos compuestos actúan como bacteriostáticos, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas de la flora alterante y patógena de la carne. El mecanismo de acción sobre las bacterias es la acidificación celular, interferencia de protones a través de la membrana celular, además de reducir la actividad de agua. Dentro de las ventajas que lactato presenta es el pH neutro, por lo que ayuda a mantener a este parámetro estable y por tanto ayuda a reducir la formación de exudados. Además este compuesto presenta un suave perfil aromático, por lo que hacen al lactato un antimicrobiano adecuado para una amplia variedad de aplicaciones alimenticias (Rodríguez-Jerez, 2006).

**El peróxido de hidrógeno**, puede dañar proteínas, lípidos, DNA y membrana celular cuando se acumula dentro de una célula bacteriana. En experimentos realizados en la universidad de Nebraska se encontró que, cuando se combinaba peróxido de hidrógeno al 3% con ácido acético al 1%, se reducían a 3.79 Log<sub>10</sub> UFC para *Listeria* inocua (Pszczola, 2002).

La formulación de **lactoferrina** activada puede aumentar la inocuidad de la carne y sus productos derivados, ya que inhibe bacterias patógenas tales como *E. coli* O157:H7, *Campilobacter* y *Salmonella*. Este compuesto aprobado por el departamento de agricultura de Estados Unidos en 2002, además de inhibir patógenos, ayuda durante el proceso de la carne a dar frescura (Pszczola, 2002).

**El clorito de sodio acidificado** por ácido cítrico, es usado en productos cárnicos de todas las especies, incluso para frutas, hortalizas y productos marinos. Su mecanismo es principalmente oxidativo; ataca enlaces disulfuro (S-S) y los aminoácidos de algunas células bacterianas. Presenta un amplio espectro ya destruye bacterias, virus, hongos, levaduras y algunos protozoarios (Velazco, 2001).

En los últimos años se han utilizado agentes antimicrobianos gaseosos o vaporizados, destacando compuestos como el dióxido de cloro, ozono, óxido de etileno y peróxido de hidrógeno vaporizado o ácido acético (Pszczola, 2002).

El **nitrito** es una sustancia natural que brinda sabor, olor y color a los productos cárnicos, además de prevenir el desarrollo de *C. botulinum* y evitar la putrefacción y el deterioro en estos productos. Es una sustancia que naturalmente se encuentra en vegetales tales como cilantro, rábano y betabel, además de estar presente en suelo, agua, aire e incluso la saliva humana. Originalmente fue descubierto como una impureza en la sal que se usó por miles de años para curar las carnes (Anónimo, 1995).

## **2.6 Antimicrobianos naturales de origen vegetal**

Las plantas han desempeñado un papel importante en la vida del humano, desde los inicios de la humanidad, se han utilizado para suplir necesidades como alimento, vivienda, vestido, medicina e incluso en actos rituales.

En los diferentes sistemas de medicina tradicional del mundo, las plantas han sido utilizadas como fuente para tratar diversas enfermedades. El uso de las plantas medicinales hasta la fecha no ha perdido vigencia e incluso en la actualidad registra un auge y en el futuro su importancia será mayor (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2006). Prueba de ello es que muchas enfermedades infecciosas, se sabe que son tratadas por medio de las plantas curativas, las cuales siguen desempeñando un papel importante en la atención primaria de salud en países en vías de desarrollo (Heno *et al.*, 2009).

Actualmente los investigadores buscan alternativas de agentes antimicrobianos contra patógenos y deterioradores principalmente (Pszczola, 2002). A través de los años ha existido una tendencia a desarrollar agentes antimicrobianos naturales, ya que los consumidores exigen alimentos libres de aditivos, más frescos y que mantengan al mismo tiempo su inocuidad. El uso de compuestos antimicrobianos naturales, son por lo tanto de interés para la industria alimentaria.

Se estima que a nivel mundial existen de 250,000 a 500,000 especies de plantas y solo una décima parte de ellas se ha explorado hasta ahora (Negi, 2012). Sin embargo, gran número de estas plantas de todo el mundo han sido reportadas como

fuentes potenciales de agentes antimicrobianos. Por ello cientos de artículos científicos han sido publicados en los últimos 20 años, los cuales muestran la actividad antimicrobiana de compuestos naturales contra microorganismos patógenos y deterioradores. Sin embargo, todavía hay poca información disponible acerca del uso de plantas medicinales como una fuente de sustancias antimicrobianas con usos potenciales en los alimentos (Roller, 2003).

En México, una amplia variedad de plantas se utilizan para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y diarreas infecciosas en las zonas rurales (INEGI, 2012). De las aproximadamente 3,500 plantas utilizadas en la medicina tradicional de México, cerca de 800 son de uso general por la gente del estado de Hidalgo, para tratar una variedad de problemas de salud. Sin embargo, la mayoría de las especies de plantas utilizadas en la medicina tradicional en México, incluidas las utilizadas en Hidalgo, no han sido evaluadas para identificar y confirmar sus posibles efectos terapéuticos o beneficiosos, tales como la acción antimicrobiana.

Las sustancias naturales con efecto antimicrobiano se pueden encontrar en muchas plantas. Este tipo de compuestos se localizan en diferentes partes de la planta tales como semillas, raíces, hojas, tallos y frutas.

Más de 1.300 especies de plantas se han reportado para producir compuestos químicos con actividad antimicrobiana, muchos de los cuales han sido aislados y se utilizan en muchos campos, incluyendo la industria de alimentos (Burt, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010).

La actividad de compuestos antimicrobianos derivados de plantas contra diferentes microorganismos se ha ensayado individualmente por métodos *in vitro* (Nychas y Skandami, 2003), información que está bien documentada (Tabla 3).

**Tabla 3. Algunas plantas con actividad antimicrobiana**

Nombre común		
Achiote	Cilantro	Menta
Albahaca	Comino	Mostaza
Almendra	Curcuma	Naranja
Anetol	Cymbopogon	Nuez moscada
Angélica	Eneldo	Orégano
Anís	Enula	Palmarosa
Asafetida	Estragón	Paprika
Abedul	Eucalipto	Perejil
ajenjo	Flor de Naranja	Pimienta
Ajo	Flor de lima	Pimienta de jamaica
Anís estrellado	Gale	Pimienta negra
Anisillo	Gardenia	Rabano picante
Almistle	Geranio	Ravensara
apio	Goma de lentisco	Rosa
Artemisa	Hierba Buena	Regaliz
Bergamota	Hinojo	Romero
Cajeput	Jasmín	Sabila
Cálamo	Gengibre	salvia
Cardamomo	Laurel	Senecio
Cebolla	Lavanda	Tomillo
Cedro	Limón	Tuberosa
Cenizo	Lima	Vainilla
Chile	Mandarina	Valeriana
Canela	Manzanilla	Verbena
Clavo	Mejorana	zanahoria

Fuente: Nychas y Skandami (2003).

Dentro de las plantas con efecto antibacterial, es importante mencionar a las hierbas y especias que son utilizadas ampliamente como saborizantes y fragancias en la industria de los alimentos, sin embargo, también se podrían utilizar como conservadores de alimentos, ya que algunas, como las especias, han mostrado efecto antimicrobiano en medios de cultivo, no obstante, su uso es limitado debido a que pueden conferir aromas y sabores a los alimentos, lo que afecta los niveles organolépticos del producto (Rocha, 2001).

En el comercio se presentan especias molidas, puras o mezcladas unas con otras. El efecto antimicrobiano se debe principalmente a los aceites esenciales, alcaloides y taninos que contienen. Hasta ahora solo se conocen algunos compuestos químicos de las sustancias antimicrobianas de las especias (Tabla 4).

**Tabla 4. Antimicrobianos contenidos en especias**

<b>Especia</b>	<b>Componentes activos</b>
Anís	Cresol, Aldehído Anisínico, Ácido benzóico
Clavo	Aceite de clavo, Eugenol, Ácido benzóico
Pimentón	Capsaicina
Ajo	Alicina, Alistatina, Acroleina
Comino	$\alpha$ -Terpineno, $\gamma$ - Terpineno, Carvona
Nuez moscada	Aceite de pimienta, Piperina, Piperidina, y Citral.
Pimienta de Jamaica	Eugenol y Citral.
Tomillo	$\gamma$ - Terpineno, Timol, Carvacrol.
Canela	Aceite de canela, Aldehído cinámico, Ácido benzoico, Eugenol y Citral.
Cebolla	Alocina

Fuente: Müller, G., 1981

Si bien, algunas de las especias no matan a los microorganismos, sí inhiben su crecimiento. Es de importancia resaltar que el éxito de controlar el desarrollo de bacterias depende de factores como el tipo de extracto, gránulos y polvo, la composición y concentración de las especias, las especies y niveles de microorganismos, la composición del sustrato y las formulaciones (Rocha, 2001).

### **2.6.1 Aceites esenciales**

Como se mencionó, los aceites esenciales pueden presentar actividad antimicrobiana considerable. Estos compuestos son líquidos aceitosos, los cuales pueden ser obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, madera, frutos y raíces (Müller, 1981; Burt, 2004). De acuerdo a sus características químicas, son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas, y terpenos, que además de ser compuestos muy olorosos, son muy solubles en alcohol y poco solubles en agua (Nychas, 1995).

Se ha estudiado el efecto antimicrobiano de aceites esenciales obtenidos de plantas de diferentes países, como por ejemplo, plantas de América del Sur (molle, muna, cedroncillo y arrayan) contra diferentes microorganismos como *E. coli* O157:H7, *L.*

*monocytogenes*, *S. enteritidis* y *S. aureus* y diferentes plantas han mostrado una fuerte actividad antimicrobiana (Pszczola, 2002).

El aceite de orégano es efectivo contra *E. coli*, *Listeria* y *Staphylococcus*, ya que inhibe su desarrollo. Por otra parte, el aceite de cilantro y albahaca inhibe el crecimiento de *E. coli* O157:H7. Así mismo, los aceites de anís, orégano, cilantro y albahaca inhibieron el desarrollo de mohos (Rocha, 2001).

Se ha observado que aceites de clavo, pimienta, canela y romero a razón de 1/100 de dilución inhibieron el crecimiento de microorganismos Gram negativos como *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia liquefaciens*. Esto gracias a que la canela contiene cinamaldehído, el clavo presenta eugenol, y el romero metaboliza alcanfor, este último compuesto también inhibe mohos y micotoxinas (Rocha, 2001).

Estudios realizados por Dussault *et al.* (2014), reportan actividad antimicrobiana en un modelo in vitro de los aceites esenciales Isotiocianato de alilo, canela china, orégano, tomillo rojo y la oleoresina de canela, contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*. En este mismo estudio *L. monocytogenes* resultó ser sensible al aceite de orégano y canela, observando que la adición de 500 ppm a jamón inhibió su desarrollo en un 19 y 10%, respectivamente para cada compuesto.

Mientras que Zhang *et al.* (2009), evaluaron actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de clavo (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*), romero (*Rosemarinus officinalis*), pimienta (*Capsicum spp.*), nuez moscada (*Myristica fragrans* Houtt), regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), la cúrcuma (*Curcuma longa*), anís (*Pimpinella anisum*), corteza de canela (*Cinnamomum cassia*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), el fresno espinoso (*Zanthoxylum americanum*), cardamomo redondo (*Elettaria Cardamomum*), raíz de Dahurian angelica (*Angelica dahurica*) y de angélica (*Angelica venenosa*) contra *L. monocytogenes* (NICBPB 54002), *E. coli* (ATCC 25922), *P. fluorescens* (AS1.1802) y *L. sake* (AS1.80). Encontrando que los extractos individuales de clavo de olor, romero, corteza de cassia y regaliz contiene una fuerte actividad antimicrobiana, pero la mezcla de romero y extractos de regaliz fue el mejor inhibidor contra las bacterias probadas en el estudio *in vitro*, al igual

que en los estudios realizados en carne de cerdo y jamón donde reducen el desarrollo de *L. monocytogenes*.

Por su parte Gill *et al.* (2002) evalúan la capacidad de aceite de cilantro para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en jamón empacado al vacío; se observó que las concentraciones mínimas inhibitorias de aceite de cilantro determinado por los ensayos *in vitro* dependía de las cinco cepas *L. monocytogenes* probadas, con valores que oscilan entre 0,074 % y 0,018 %. Sin embargo, el aceite de cilantro no parece ser un agente adecuado para el control de *L. monocytogenes* en jamón ya que la adición al 6 % de este aceite a jamón empacado al vacío y almacenado a 10 °C durante 4 semanas no reduce el crecimiento de esta bacteria.

No obstante, se ha reportado que *L. monocytogenes* es sensible al aceite de romero, especialmente al  $\alpha$ - pineno. Se ha observado que la adición de romero deshidratado en polvo (0.5%) o la adición de aceite de romero (1%) a salchichas de hígado de porcino, retardo el crecimiento de bacterias durante su almacenamiento en refrigeración (Rocha, 2001).

Extractos naturales de semilla de uva, corteza de pino, antocianinas de zanahoria, flavonoides de romero y salvia, muestran beneficios antimicrobianos cuando se aplican a carne precocida y refrigerada. Mientras que el puré de ciruela seca es efectivo inhibiendo bacterias patógenas como *E. coli* y *Salmonella* en productos de carne molida (Pszczola, 2002).

Aunque muchos condimentos e ingredientes de alimenticios contienen sustancias antimicrobianas, pueden presentar una elevada tasa de microorganismos, y es frecuente, que la alteración presentada en alimentos se deba a estos microorganismos aportados por los condimentos especialmente cuando se trata de embutidos y otros productos cárnicos. Las esporas de *Bacillus subtilis* así como de las pertenecientes al género *Clostridium* suelen estar presentes en pimienta, mejorana, la ajedrea, el tomillo y cilantro, por lo que se relacionan con el abombamiento de las conservas de jamón y productos cárnicos (Müller,1981). Las especias contienen con frecuencia también bacterias no esporuladas, ya que en productos cárnicos se pudo comprobar la presencia de *E. coli* y *Salmonella*. Rara

vez se encuentran levaduras, sin embargo de la pimienta negra, el pimentón y el pimiento rojo picante, se han aislado *Aspergillus glaucus* y *A. restrictus*, *A. flavus* y *A. ochraceus*, de las cuales algunas cepas forman aflatoxinas (Müller, 1981).

## **2.7 Extracción de metabolitos secundarios de origen vegetal**

La extracción es el proceso de pasar un soluto de una fase a otra, cuyo propósito es aislar, concentrar o separar un analito de una especie o sistema (Harris, 2009; Skoog *et al.*, 2001).

Actualmente los métodos de extracción de metabolitos secundarios de plantas con actividad Biológica se basan en la polaridad (solubilidad relativa en disolventes orgánicos), solubilidad en agua, y diferentes solubilidades alteradas a base de sales y pH (acidez o alcalinidad relativa). Estos métodos proporcionan un mayor grado de resolución de los tipos de metabolitos presentes en muestras de plantas.

Los métodos de extracción que se elijan deben basarse en el conocimiento de varias propiedades fisicoquímicas del compuesto de interés. Estos incluyen coeficientes de partición en agua o disolventes orgánicos, la polaridad relativa de la molécula, la estabilidad de la molécula en luz u oscuridad, así como la temperatura empleada durante el proceso de extracción. Si el compuesto de interés es altamente soluble en agua, se emplea este líquido caliente o frío para obtener un extracto acuoso. Si por otra parte, el compuesto es altamente soluble en un disolvente particular orgánico, se emplea un disolvente orgánico (Cseke *et al.*, 2006).

### **2.7.1 Cromatografía**

La cromatografía se utiliza para separar componentes de diversas mezclas, además de que indica el número de compuestos, así como la porción de cada uno de ellos.

Un rasgo característico de la cromatografía es la presencia de dos fases, dispuestas de manera que mientras una permanece estacionaria dentro del sistema, la otra (fase móvil) se desplaza a lo largo de ella (Skoog *et al.*, 2001).

En cromatografía la fase móvil (el disolvente que desciende a través de la columna) es un líquido o un gas. Mientras que la fase estacionaria la que se encuentra fija en el interior es normalmente un líquido viscoso enlazado químicamente a las paredes internas de un tubo capilar o a la superficie de las partículas sólidas empaquetadas dentro de la columna. Así, la clave de separación en cromatografía es que la velocidad con que se mueve cada sustancia depende de su afinidad relativa por ambas fases (Harris, 2009).

Los compuestos más afines a la fase estacionaria (mas retenidos) avanzan lentamente, mientras que aquellos que son más afines a fase móvil se desplazan con mayor rapidez. Así el método cromatográfico funciona como un control de la velocidad de cada sustancia logrando la separación entre ellos (Skoog *et al.*, 2001).

La cromatografía se divide en cinco categorías de acuerdo al mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria (Harris, 2009; Cseke, 2006).

Cromatografía de adsorción: se utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas. Cuando más fuerte se adsorbe un soluto más lentamente atraviesa la columna.

Cromatografía de reparto: utiliza una fase estacionaria, en forma de una fina película de alto punto de ebullición, sobre la superficie de un soporte sólido, que en cromatografía de gases es, típicamente, la cara interna de una columna de cromatografía de sílice. El soluto está en equilibrio entre el líquido estacionario, y la fase móvil que es el gas en cromatografía de gases.

Cromatografía de intercambio iónico: en cromatografía de intercambio iónico, la separación se basa en interacciones iónicas de los componentes individuales de una mezcla con una fase estacionaria que es una superficie de carga iónica de carga opuesta a los iones de la muestra. La fase móvil es un tampón acuoso, donde se utilizan tanto el pH y la fuerza iónica para controlar el tiempo de elución. Cuanto más fuerte es la carga en la muestra, más fuerte será atraído a la superficie iónica, y por lo tanto, más tiempo se necesita para que se produzca la elución de la columna.

Cromatografía de exclusión molecular: la separación de mezclas se basa estrictamente en el tamaño. La columna se rellena con un gel con poros de tamaño estrictamente controlados, así las moléculas pequeñas tardan más tiempo en salir ya que penetran dentro del gel, mientras que las moléculas de mayor tamaño eluyen más rápido, ya que no entran en los poros.

Cromatografía de afinidad: El principio de esta técnica se basa en el hecho de que algunas proteínas tienen una afinidad muy alta para los grupos químicos específicos (ligandos) unido covalentemente a un material de lecho cromatográfico (la matriz). Sólo las proteínas con una alta afinidad para el ligando se puede unir a la matriz de la columna. Otras proteínas, por el contrario, eluyen a través de la columna, debido a que son incapaces de unirse al ligando. Las proteínas unidas se puede eluir de la columna por una solución que contiene una alta concentración de la forma soluble del ligando.

### **2.7.1.1 Cromatografía en capa fina**

En este tipo de cromatografía la mezcla de compuestos que se va a separar, se aplica en forma de pequeñas gotas de solución cerca del borde de un soporte plano, ya sea lámina de vidrio, plástico o aluminio los cuales están recubiertos por una capa delgada de gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) y la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), ambas adsorbentes de carácter polar. El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. Estas placas con las muestras se sumergen en un disolvente que actúa como fase móvil o eluyente, el cual sube por la placa por capilaridad. El eluyente puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad (Tabla 5). En cromatografía en capa fina, el grado con que eluyen las sustancias depende tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado (Fox y Whitesell, 2000).

**Tabla 5. Eluyentes empleados en cromatografía en capa fina**

Disolventes	
Éter de petróleo	Cloruro de metileno
N-hexano	Acetato de etilo
Ciclohexano	Acetona
Tolueno	Iso-propanol
Dietil-éter	Etanol
T-butil-éter	Metanol
Cloroformo	Ácido acético

Actualmente las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). En el caso de compuestos que no absorben luz UV, la visualización (o revelado) del cronograma requiere utilizar un agente revelador los cuales poder ser vapores de yodo o con la aplicación de una mezcla de agua/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1) sobre la placa y su posterior calentamiento (Sharapin, 2000).

### 2.7.1.2 Cromatografía en columna

En la cromatografía de líquidos se utiliza una columna empaquetada con una fase estacionaria utilizando normalmente alúmina o gel de sílice (que son en realidad polímeros de subunidades de Al<sub>3</sub>O<sub>3</sub> y SiO<sub>2</sub>). Mientras que la fase móvil son los eluyentes, los cuales fluyen al fondo por efecto de la gravedad. Así los componentes que se adhieren fuertemente a la fase solida o estacionaria son compuestos polares ya que la alúmina y el gel de sílice son óxidos metálicos polares cuyas superficies están recubiertas por grupos hidroxilo (OH). Además de que requieren de un mayor número de disolventes para poder eluir, por lo que se forman bandas y la mezcla de compuestos se separa en sus componentes (Fox y Whitesell, 2000).

## 2.8 Métodos de determinación estructural

La determinación de la estructura de los compuestos orgánicos obtenidos a partir de plantas es una parte importante dentro de la química orgánica. Actualmente los investigadores tratan de encontrar nuevos compuestos que presenten actividad fisiológica, de los cuales una vez localizados deben aislarse y posteriormente determinar su estructura (Yurkanis, 2008).

Actualmente se cuentan con técnicas instrumentales diferentes para la determinación de estructura de los compuestos orgánicos. Estas técnicas se caracterizan por ser rápidas y se necesitan pequeñas cantidades de un compuesto a analizar (Yurkanis, 2008).

Dentro de estas técnicas se pueden encontrar a:

**Espectrometría de masas:** la cual permite determinar la masa molecular y la forma molecular de un compuesto así como de algunas características estructurales (no emplea radiación electromagnética por ello espectrometría)

**Espectroscopia de infrarrojo:** esta técnica emplea radiación electromagnética e indica las clases de grupos funcionales que tiene un compuesto.

**Espectroscopia Violeta/visible:** esta técnica emplea radiación electromagnética y proporciona información sobre aquellos compuestos orgánicos con enlaces dobles conjugados.

### 2.8.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopia de RMN ayuda a identificar la estructura de carbonos e hidrógenos en un compuesto orgánico. La ventaja de la espectroscopia de RMN es que no sólo hace posible identificar la funcionalidad en un carbono específico sino que también permite conectar carbonos vecinos. En muchos casos se puede usar la RMN para determinar toda la estructura de una molécula (Yurkanis, 2008).

Esta técnica se basa principalmente en el hecho de que algunos núcleos atómicos son intrínsecamente magnéticos. Solo un número limitado de isótopos presenta esta

propiedad, conocida como spin (rotación), de los más importantes se citan en la Tabla 6.

**Tabla 6. Núcleos de importancia biológica que dan señales de RMN**

Núcleo	Abundancia natural (% en el peso del elemento)
<sup>1</sup> H	99,984
<sup>2</sup> H	0,016
<sup>13</sup> C	1,108
<sup>14</sup> N	99,635
<sup>15</sup> N	0,365
<sup>17</sup> O	0,037
<sup>23</sup> Na	100,0
<sup>25</sup> Mg	10,05
<sup>31</sup> P	100,0
<sup>35</sup> Cl	75,4
<sup>39</sup> K	93,1

Fuente: Stryer, L., Berg J.M. y Tymoczko J.L., (2004)

El ejemplo más sencillo es el núcleo de hidrógeno (<sup>1</sup>H) que es un protón. La rotación de un protón genera un momento magnético. Cuando se aplica un campo magnético externo, este puede adoptar una de dos orientaciones o estados de spin (llamados  $\alpha$  y  $\beta$ ). La diferencia de energía entre estos dos estados es proporcional a la fuerza magnética aplicada. El estado  $\alpha$  tiene una energía ligeramente más baja, por ello está poblado porque está alineado con el campo. Así un protón en estado  $\alpha$  puede elevarse al estado  $\beta$  si se aplica (un pulso de radiación electromagnética un pulso de radiofrecuencia, o FR), siempre y cuando la frecuencia corresponda a la diferencia de energía entre los estados  $\alpha$  y  $\beta$  y se obtendrá una resonancia. Así un espectro de resonancia para una molécula se puede obtener variando el campo magnético a frecuencia constante de la radiación electromagnética, o manteniendo el campo magnético constante y variando la radiación electromagnética (Stryer *et al.*, 2004).

## 2.8.2 Espectroscopia infrarroja (IR)

Espectroscopia infrarroja analítica (IR) abarca varios métodos que se basan en la absorción de radiación electromagnética con longitudes de onda en el rango de 1 a 1000 micras. Esta gama espectral es típicamente dividida en el infrarrojo cercano (1 a 2,5  $\mu\text{m}$ ), infrarrojo medio (2,5 a 25  $\mu\text{m}$ ) e infrarrojo lejano (mayor de 25  $\mu\text{m}$ ). El IR medio es el rango que es más rico en información estructural y es el más fácil de acceder. Este rango espectral no sólo se utiliza para determinar los grupos funcionales de una molécula, sino que también proporciona regiones características que se pueden utilizar para identificar compuestos. Para las mediciones de IR, es común reportar longitudes de onda ( $\mu$ ) o frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Resulta que la espectroscopia de IR se puede utilizar fácilmente como un método para análisis estructural semiempírico, ya que se observó que existe una buena correlación entre la posición de las bandas y grupos funcionales orgánicos o características estructurales (Vogler y Setzer, 2006). Las bandas típicas de absorción del infrarrojo que suelen encontrarse en los productos naturales están listados en la Tabla 7.

**Tabla 7. Características de absorción en el infrarrojo de algunos grupos funcionales**

Tipo de grupo funcional	Posición de la banda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad de absorción
Alcanos, grupos alquilo		
C-H	2850-2960	Media a fuerte
Alquenos		
=C-H	3220-3100	Media
C=C	1640-1680	Media
Alquinos		
$\equiv\text{C}-\text{H}$	3300	Fuerte
$-\text{C}\equiv\text{C}-$	2100-2260	Media
Halogenuros de alquilo		
C-Cl	600-800	Fuerte
C-Br	500-600	Fuerte
C-I	500	Fuerte

Alcoholes		
O-H	3400-3650	Fuerte, ancha
C-O	1050-1150	Fuerte
Aromáticos		
	3030	Débil
	1660-2000	Débil
	1450-1600	Media
Aminas		
N-H	3300- 3500	Media
C-N	1030-1230	Media
Compuestos carbonilo <sup>a</sup>		
C=O	1670-1780	Fuerte
Ácidos carboxílicos		
O-H	2500-3100	Fuerte, muy ancha
Nitrilos		
C≡N	2210-2260	Media
Compuestos Nitro		
NO <sub>2</sub>	1540	Fuerte

Fuente: McMurry, 2005. <sup>a</sup> Ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos y cetonas.

## 2.9 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC por sus siglas en inglés), reporta el flujo de calor como una función de la temperatura es una excelente herramienta para la medición del calor específico y fase de transición dependientes de la temperatura (Sahin y Sumnu, 2007).

Esta técnica termoanalítica, es utilizada para monitorear los cambios en la energía asociados con las transformaciones físicas o químicas de los materiales en función de la temperatura (Fonseca-Florido, 2013). Dicha técnica nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o

enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas (Suriñach *et al.*, 1992).

De acuerdo con Suriñach *et al.* (1992), entre las diversas utilidades de la técnica DSC se pueden destacar:

- Medidas de capacidad calorífica aparente.
- Determinación de temperaturas características de transformación o de transición tales como: transición vítrea, transición ferro-paramagnética, cristalización, transformación polimórfica, fusión, ebullición, sublimación, descomposición, isomerización.
- Estabilidad térmica de los materiales.
- Cinética de cristalización de los materiales.

### **III. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto antimicrobiano de treinta y un especies de plantas contra diferentes bacterias patógenas en medios de cultivo y el efecto de sólo una planta en jamón cocido de cerdo.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos o metanólicos o etanólicos o cetónicos o hexanoicos de 31 especies de plantas contra 10 diferentes especies de bacterias patógenas.
- Obtener fracciones y colecciones cromatográficas de los extractos que presenten mayor actividad antimicrobiana.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de las colecciones de fracciones cromatográficas en medio de cultivo.
- Identificar parcialmente con apoyo de la Resonancia Magnética Nuclear algunos compuestos con actividad antimicrobiana presentes en las plantas.
- Determinar el comportamiento de *S. Typhimurium* y *S. aureus* en jamón cocido de cerdo adicionado con y sin extractos, fracciones cromatográficas y compuestos puros, con actividad antimicrobiana.

## IV. Materiales y métodos

### 4.1 Metodología general

La estrategia metodológica desarrollada en este proyecto se muestra de manera general en la Figura 1.

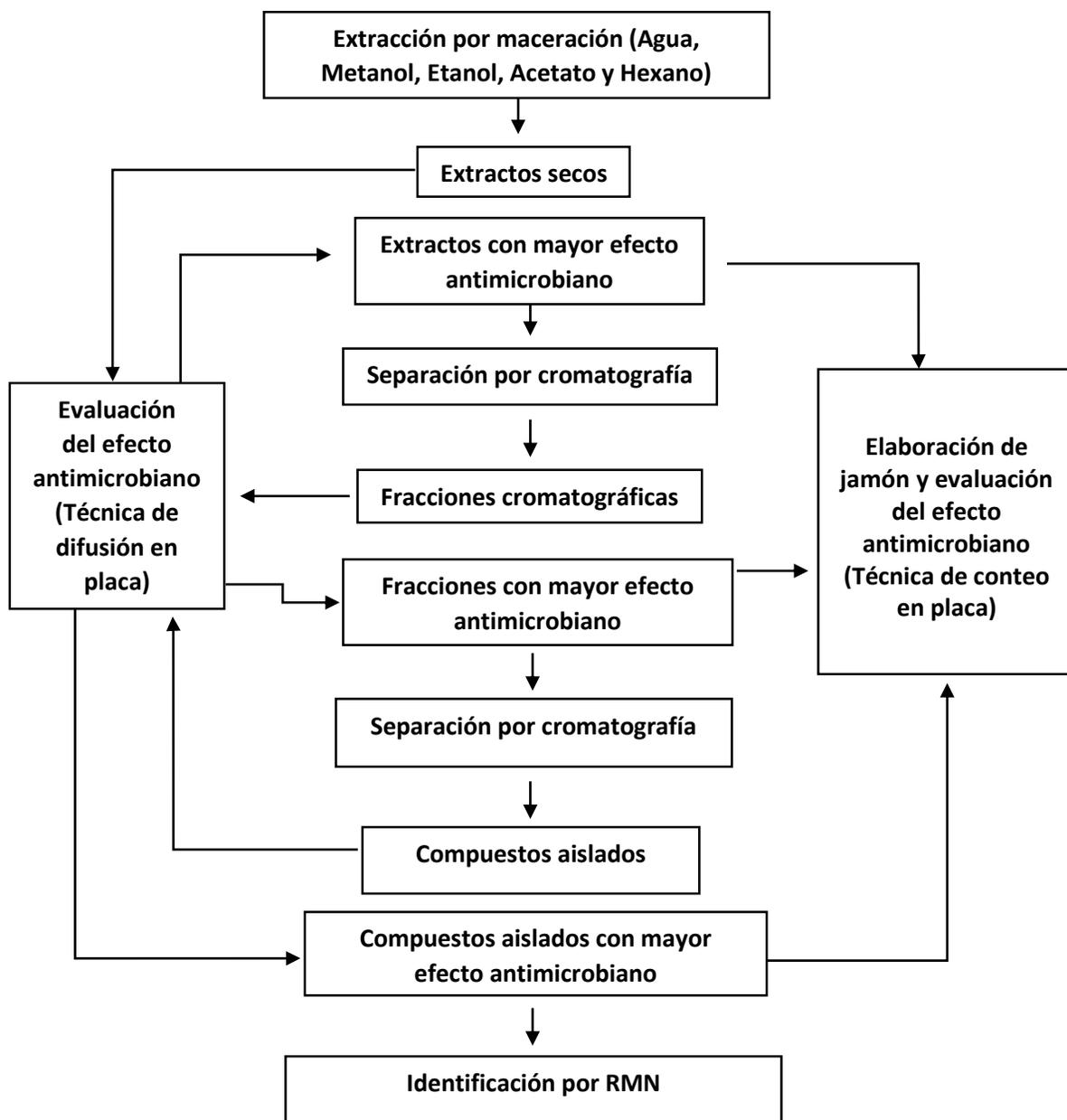


Figura 1. Diagrama de la metodología general

## **4.2 Materiales**

### **4.2.1 Material biológico (plantas)**

Treinta y un plantas utilizadas en la medicina tradicional de Hidalgo fueron analizadas (Tabla 8). De cada planta utilizo solo la parte o partes a las cuales se les atribuye el efecto medicinal (por ejemplo raíz, hoja, etc). Se obtuvo aproximadamente 500 g de cada planta; y estas fueron secadas en un horno a 50 °C con recirculación de aire (Lab-Line, Ambi Hi Low Chamber, USA). Las plantas secas se guardaron en bolsas de plástico, se cerraron herméticamente y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso. Cabe señalar que las plantas denominadas como A y B en la tabla 8, son las que mostraron el mayor efecto antimicrobiano y con ellas se están elaborando formulaciones de aditivos y soluciones desinfectantes que se buscará protegerlas como patente, por lo que, el nombre de tales plantas no se mencionará a lo largo de la tesis y se referirá a ellas como planta A y B.

### **4.2.2 Material biológico (Cepas bacterianas)**

Las bacterias empleadas fueron: *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. Choleraesuis* (ATCC 10708), *L. monocytogenes* (ATCC 19115), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. flexneri* (ATCC 12022), *S. sonnei* (ATCC 25931), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* O157: H7 (E09 donada por E. F. Escartín de la Universidad Autónoma de Querétaro, México ) y *Vibrio cholerae* O1 (87151, serotipo inaba, donada por E. F. Escartín). Todas las cepas fueron resistentes al antibiótico rifampicina (R+). Las cepas se mantuvieron en tubos inclinados con Agar Soya Trypticaseína (TSA; Bioxon, Becton Dickinson, México) en refrigeración (3-7 °C) hasta su uso.

#### **4.2.3 Medios de cultivo**

Agar para Métodos Estándar (Bioxon, Becton Dickinson, México), Agar de Soya Tripticaseína (Bioxon, Becton Dickinson, México), Caldo de Soya Tripticaseína (Bioxon, Becton Dickinson, México) y Peptona de Caseína (Bioxon, Becton Dickinson, México).

#### **4.2.4 Reactivos y disolventes**

Agua destilada, Solución Salina Isotónica (SSI), Rifampicina, Acetato de etilo (J.T. Baker, USA), Hexano (J.T. Baker, USA), Acetona (J.T. Baker, USA), Metanol (J.T. Baker, USA), Etanol (J.T. Baker, USA).

**Tabla 8. Plantas medicinales utilizadas en las pruebas antimicrobianas**

Nombre científico	Nombre común	Partes de la planta utilizadas por la población	Uso tradicional	Forma de uso	Vía de administración
<i>Alternanthera repens</i> (L.) Kuntze	Tianguis	Parte aérea	Diarrea	hervir	Oral
<i>Anethum graveolens</i>	Eneldo	Hojas	Diarrea y trastornos estomacales	hervir	Oral
<i>Brickellia veronicifolia</i> (HBK.) Gray	Peishto	Raíz	Diarrea y trastornos estomacales	hervir	Oral
<i>Brickellia squarrosa</i> (Cav.) Robins	Prodigiosa	Raíz	Diarrea y trastornos estomacales	hervir	Oral
<i>Buddleja perfoliata</i>	Salvia real	Hojas	Diarrea y trastornos estomacales	hervir	Oral
<i>Conyza schiedeana</i> (Less.) Cronq.	Simonillo	Raíz	Diarrea y trastornos estomacales	hervir	Oral
<i>Datura stramonium</i> L.	Toloache	Parte aérea	Lesiones de la piel, erupciones e infecciones cutáneas	hervir	Cutáneo
<i>Eugenia capulini</i>	Piste	Hojas	Diarrea y disentería	hervir	Oral
<i>Eupatorium petiolare</i>	Yolochichitl	Raíz	Diarrea y trastornos estomacales	hervir	Oral
<i>Grindelia inuloides</i> var. <i>Glandulosa</i>	Arnica	Tallos, hojas y flores	Diarrea	hervir	Oral
<i>Hemiangium excelsum</i>	Cancerina	Tallos	Diarrea	hervir	Oral
<i>Hesperozygis marifolia</i> (Briq.) Epling.	Hierba blanca	Parte aérea	Diarrea y trastornos estomacales	hervir	Oral
<i>Hypericum silenoides</i>	Tlahuauquelite	Parte aérea	Diarrea y trastornos estomacales	hervir	Oral
<i>Lepidium virginicum</i> L.	Lentejilla	Parte aérea	Diarrea y trastornos estomacales	hervir	Oral
<i>Lippia graveolens</i> HBK	Oregano	Tallos, hojas y flores	Dolor de estómago	hervir	Oral
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Manzanilla	Tallos, hojas y flores	Cólicos y dolor de estómago	hervir	Oral
<i>Medicago polymorpha</i> var. <i>vulgaris</i>	Carretilla	Flores, hojas y tallos	Diarrea y vómito	hervir	Oral
<i>Montanoa tomentosa</i>	Zopacle	Flores, hojas y tallos	Dolor de estómago	hervir	Oral
<i>Prunus serotina</i> Ehrh.	Capulín	Hojas y tallos	Diarrea	hervir	Oral
<i>Psidium guajava</i> L.	Guayaba	Tallos y hojas	Diarrea	hervir	Oral
<i>Ruta chalepensis</i>	Ruda	Tallos y hojas	Cólico y dolor de estómago	hervir	Oral
<i>Sanvitalia procumbens</i> Lam.	Ojo de gallo	Raíz	Diarrea	hervir	Oral
<i>Sigesbeckia jorullensis</i> HBK.	Flor de araña	Raíz	Diarrea	hervir	Oral
<i>Silvia prostrata</i> Benth	Tripa de gallina	Flores	Diarrea y disentería	hervir	Oral
<i>Solanum rostratum</i> Dun.	Duraznillo	Raíz	Lesiones infectadas	hervir	Oral, cutáneo
<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip.	Santa María	Raíz	Diarrea	hervir	Oral
<i>Terminalia catappa</i> L.	Almendro	Tallos	Diarrea	hervir	Oral
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomillo	Raíz	Cólico y dolor de estómago	hervir	Oral
<i>Turnera difusa</i> Willd	Hierba del moro	Raíz	Diarrea y antihelmíntico	hervir	Oral
Planta A		Parte aérea	Diarrea y dolor de estómago	hervir	Oral
Planta B		Tallos, hojas y flores	Diarrea	hervir	Oral

#### **4.2.5 Equipo**

Autoclave eléctrica (Yamato, SM 200, Japón), Agitador Vortex (scientific, industries, USA), Balanza analítica (OHAUS, USA), Bomba de vacío (BÜCHI, Vacuum Pump V- 700, Suiza), Incubadora bacteriológica (Lab-Line, Ambi Hi Low Chamber, USA), Campana de flujo laminar (LABCONCO, USA), Cuenta colonias (American Optical Quebec, USA), Parrilla eléctrica (Cimarec, USA), Refrigerador (Vendo, México), Evaporador rotatorio (BÜCHI, Rotavapor R-215, Suiza), Lámpara de luz ultravioleta (Entela U.V., U.S.A), Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (Varian NMR, 400 MHz).

#### **4.3 Métodos**

##### **4.3.1 Obtención de Extractos**

Acuoso: las muestras (25 g) de cada parte de la planta seca (Tabla 8) se pesaron y se colocaron asépticamente en matraces estériles. Se añadió agua destilada (225 ml) a cada matraz, posteriormente los matraces se calentaron a ebullición durante 10 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Para los extractos orgánicos con metanol, etanol, acetona y hexano: las muestras (25 g) de cada parte de la planta seca se pesaron y se colocaron en frascos de vidrio estériles por separado. Dependiendo del tratamiento, se agregaron a cada frasco, 225 ml de etanol al 96 %; 225 ml de metanol; 225 ml de acetona y 225 ml de hexano. Los matraces se almacenaron a temperatura ambiente durante siete días con agitación manual (una vez al día). Después de este período de extracción, la fase líquida se filtró a través un embudo Büchner al cual se le un coloco papel de filtro Whatman N° 4. Lo mismo se realizó con los extractos acuosos.

Todos los extractos, por separado, se concentraron en un rotaevaporador (Büchi, rotavapor R-215). Los disolventes se eliminaron por completo de los concentrados, colocándolos en una estufa con recirculación de aire (Lab-Line, Ambi Hi Low Chamber, USA) durante 2 horas a  $50 \pm 2$  °C. Los extractos obtenidos (considerándolo como extracto concentrado) se colocaron en un

frasco para su posterior utilización en pruebas antimicrobianas mediante técnica de difusión en placa.

#### **4.3.2 Efecto antimicrobiano por técnica de difusión en placa con discos**

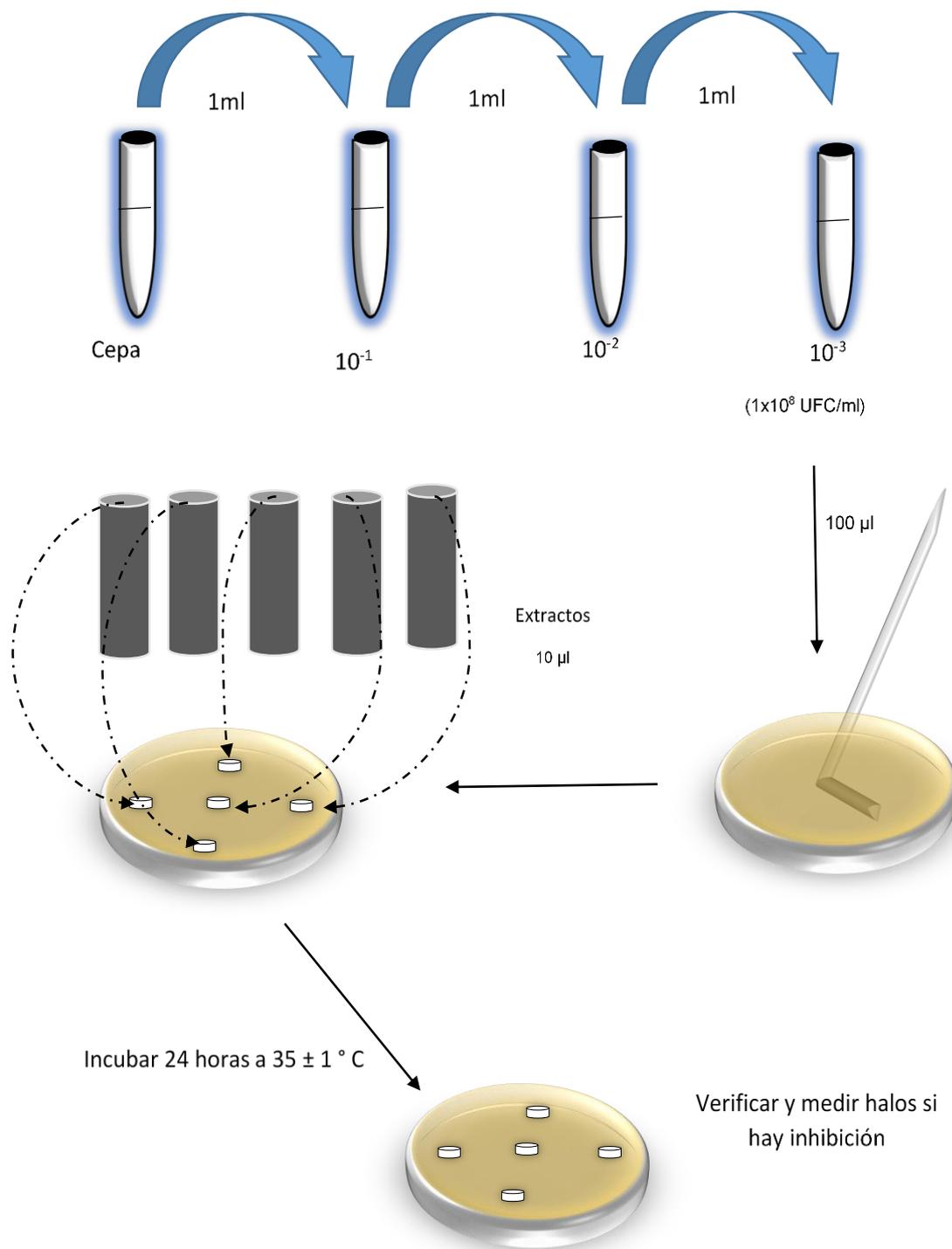
Para la preparación del inóculo, tubos con 3 ml de Caldo de Soya Trypticaseína (TSB, Bioxon, Becton Dickinson, México) se inocularon con cada una de las cepas mencionadas y se incubaron a 35 °C durante un periodo de 18 h. Los cultivos se lavaron dos veces en solución salina isotónica estéril (ISS; 0.85% de NaCl) por centrifugación a 3500 g durante 20 min y los precipitados se resuspendieron en agua peptonada estéril. Posteriormente se realizaron diluciones de los cultivos lavados para producir una concentración final de 10<sup>8</sup> UFC/ml.

Se prepararon soluciones de los extractos en una relación 1:10, para el caso de los acuosos, extracto seco:agua, y para los otros extractos secos, extracto:solución de agua-tween al 20%.

En la evaluación del efecto antimicrobiano, se empleó la técnica de difusión en agar empleando discos de papel (López-Malo *et al.*, 2005; CLSI, 2009). Donde 100 µl de cada cultivo bacteriano (a una concentración aproximada de 1x10<sup>7</sup> UFC) se inocularon en placas de Agar métodos cuenta estándar con rifampicina 100 mg /L (Sigma –Aldrich, USA) y fueron distribuidos en el agar por la técnica de extensión en superficie. Posteriormente se colocaron discos de papel filtro (5 mm de diámetro) en la superficie de cada placa de agar. Alícuotas 10 µl de cada solución de extracto se colocaron a continuación en cada disco (dosis finales por disco: 1 mg de extracto). Se utilizaron como control positivo cloranfenicol (discos con 25 µg) y gentamicina (discos con 25 µg) para *P. aeruginosa*. Una vez que los extractos se absorbieron por el agar, las placas se incubaron de forma invertida durante 24 h a 35 °C ± 1 °C. Transcurridas las 24 h, se midió la zona de inhibición resultante para cada extracto (Figura 2). Cada experimento se realizó por cuadruplicado y se calcularon los valores promedio para cada extracto.

### **4.3.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Esta prueba se realizó con la finalidad de determinar la concentración más baja de los extractos a la cual toda vía se observa sensibilidad de los microorganismos. Para ello se utilizó el método de dilución en caldo (Vanden y Vlietinck, 1991). Se prepararon tubos con caldo de soya tripticaseína, como medio base, a los cuales se les agregarán los extractos a diferentes concentraciones (100 a 1 mg/ml). Los tubos fueron inoculados con una suspensión de microorganismos ( $10^5$  UFC / ml). Todos los tubos inoculados se incubaron a 37 °C durante 24 h. Considerando como CMI la última dilución del extracto que inhibió el crecimiento bacteriano después de este tiempo. Los antibióticos cloranfenicol y gentamicina fueron utilizados como control. Se realizaron cuatro repeticiones por experimento.



**Figura 2. Técnica de difusión en placa con discos**

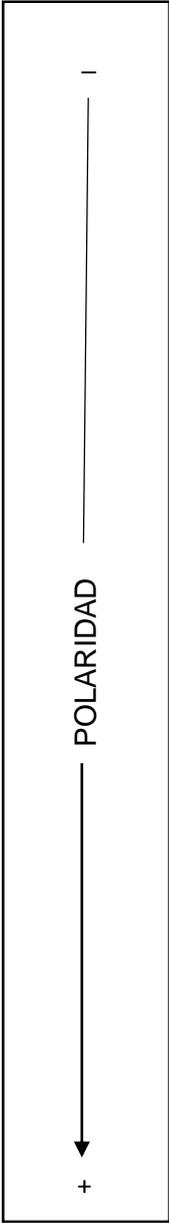
#### **4.3.4 Separación de los extractos en fracciones por cromatografía en columna**

Los extractos que presentaron actividad antimicrobiana se separaron en fracciones por medio de cromatografía en columna. Para ello, cada extracto concentrado se mezcló con sílica gel (Sigma Aldrich, suiza) con el fin de eliminar humedad.

La sílica gel previamente fue activada mediante un proceso que consistió en colocarle a temperatura de 120 °C durante una hora en una estufa de secado con recirculación de aire, con la finalidad de retirar la humedad presente y evitar que la polaridad de la sílica se modificara.

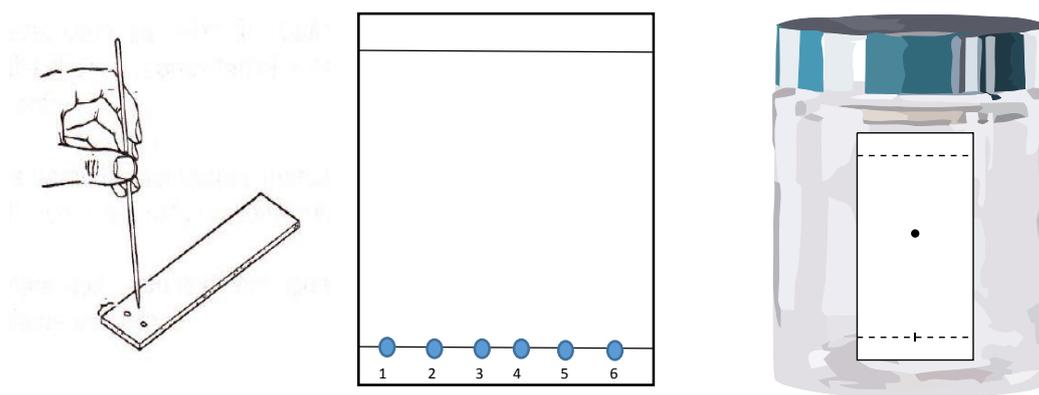
Posteriormente se empaquetó la columna mediante el método descrito por Fox y Whitesell (2000), para esto, se colocó un trozo de algodón en el fondo de la columna con ayuda de una varilla de vidrio con la finalidad de evitar que sea expulsada la fase estacionaria (gel de sílice) al abrir el robinete de la columna. La columna se colocó en soporte universal asegurando que quedara recta. El paso siguiente fue mezclar la sílica gel con hexano en un vaso de precipitado, hasta obtener una pasta fluida, la cual fue vertida en la columna, posterior a esto se adicionó hexano para evitar que la sílica se secase, esto se dejó en reposo por un periodo de 18 a 24 h con la finalidad de que salieran burbujas de aire atrapadas en la sílica, después de este periodo se agregó la mezcla extracto-sílica, y encima de este se colocó una pequeña capa de sulfato de calcio (secante), para finalmente colocar un trozo de algodón que sirvió para amortiguar la caída del disolvente al ser agregado y evitar la dispersión del sulfato de calcio y el extracto. Después de este procedimiento se llenó la columna con disolvente (hexano) y se comenzaron a recuperar o eluir o a “bajar” las fracciones con las diferentes mezclas de disolventes utilizando Hexano, hexano-Acetato, acetato, Acetato-metanol y metanol (Tabla 9), recuperando las fracciones en volúmenes de 50 ml. Los eluatos fueron evaporados con rota evaporador y concentrados de aproximadamente 5 ml de cada fracción se colocaron en viales, considerando cada una de estos como una fracción.

**Tabla 9. Mezclas de disolventes utilizadas en cromatografía en columna**

	<b>Disolvente (s)</b>	<b>Concentración</b>
	Hexano	100%
	Hexano-Acetato	90%-10%
	Hexano-Acetato	80%-20%
	Hexano-Acetato	70%-30%
	Hexano-Acetato	60%-40%
	Hexano-Acetato	50%-50%
	Hexano-Acetato	40%-60%
	Hexano-Acetato	30%-70%
	Hexano-Acetato	20%-80%
	Hexano-Acetato	10%-90%
	Acetato	100%
	Acetato-Metanol	90%-10%
	Acetato-Metanol	80%-20%
	Acetato-Metanol	70%-30%
	Acetato-Metanol	60%-40%
	Acetato-Metanol	50%-50%
	Acetato-Metanol	40%-60%
	Acetato-Metanol	30%-70%
	Acetato-Metanol	20%-80%
	Acetato-Metanol	10%-90%
Metanol	100%	

Para cambiar la mezcla de solventes, se realizó cromatografía en placa fina, y al encontrar diferencias visuales en los cromatogramas entre fracciones, la mezcla se cambió de menor a mayor polaridad. La metodología empleada para la cromatografía en placa fina fue la utilizada por Martínez- Ángeles (2006); donde en una placa de Sílica gel (TLC Sílica Gel 60 F<sub>254</sub>, Merk, Alemania) de 5 x 3.5 cm

se trazaron dos líneas de 0.5 cm por encima del borde superior e inferior de la placa. Posterior a esto, con ayuda de un capilar se colocaron las muestras sobre la línea inferior de la placa. En un vaso de precipitado se agregaban las mezclas de disolventes eluyentes, teniendo cuidado de que el nivel del eluyente en el vaso fuera menor que la distancia entre el borde inferior de la placa. Posterior a esta preparación las placas eran colocadas cuidadosamente dentro del vaso y se tapaban con una caja Petri de cristal (figura 3). Una vez que el eluyente alcanzaba la línea superior trazada por debajo del final de la placa, se extraía la placa del vaso y se visualizaba con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta (254 nm) o yodo elemental. Si el desplazamiento era nulo se repetía el procedimiento, haciendo el cambio de polaridad del eluyente, con la finalidad de observar una mejor separación.



**Figura 3 Colocación de muestras en placa de sílica gel**

La reunión de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna se llevó a cabo mediante de cromatografía en placa fina en base al  $R_f$ , que es la relación entre la distancia alcanzan los compuestos bioactivos y la distancia que alcanza el disolvente de cada fracción. Donde todas aquellas fracciones que presentaran el mismo comportamiento (desplazamiento al mismo nivel de la placa) se reunían para formar un grupo de fracciones al que se denominó colección. El disolvente de cada colección fue eliminado completamente en un horno a 50 °C con recirculación de aire.

Una vez obtenidas las colecciones secas, se evaluó el efecto antimicrobiano de cada colección mediante la técnica de difusión en placa con discos; para ello, se prepararon soluciones de las colecciones secas con una solución de agua-tween al 20% en una relación 1:10 (colección: agua-tween al 20%)

#### **4.3.5 Aislamiento y purificación de compuestos antimicrobianos**

Una vez realizadas las pruebas antimicrobianas de las colecciones cromatográficas, se eligieron aquellas que presentaron un mayor efecto inhibitorio y se procedió a separar los compuestos por recromatografía en columna (segunda cromatografía) y cromatografía en capa fina. Se determinó el efecto antimicrobiano de los compuestos aislados mediante la técnica de difusión en agar tal como se ha descrito arriba.

#### **4.3.6 Determinación estructural**

##### **4.3.6.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)**

Previo al análisis de RMN, se realizaron pruebas de solubilidad de los compuestos para determinar el disolvente a utilizar en la preparación de las muestras. Para ello se tomaron pequeñas muestras con ayuda de una espátula y se colocaron en viales por separado a los cuales se les agregaba 1 ml del disolvente (metanol, acetona, cloroformo o dimetilsulfoxido) y se sometían a agitación con la finalidad de observar en cual solubilizaba la muestra.

Las muestras elegidas para RMN, completamente secas, se solubilizaron nuevamente con disolventes deuterados, los cuales son especiales para este tipo de análisis. Para ello, en cada vial se colocaron 3 ml del disolvente el cual fue mezclado con ayuda de una pipeta Pasteur buscando la mayor solubilización de los compuestos de cada vial. Después de esto, se utilizó una pipeta Pasteur con un trozo de algodón para filtrar la muestra la cual fue depositada dentro de un tubo para el equipo de RMN. Finalmente se cerró el tubo y la muestra se colocó en el equipo de RMN; para el análisis se determinó el espectro del protón dicho análisis dura aproximadamente 3 minutos, tiempo en el que el campo magnético intenso hace que se alineen los núcleos  $^1\text{H}$  en la molécula, en una de las dos orientaciones posibles, y a continuación se irradiará la muestra con

energía de radiofrecuencia. Si la frecuencia de esta irradiación se mantiene constante y se hace variar la intensidad del campo magnético aplicado, cada núcleo entrará en resonancia en una intensidad de campo ligeramente diferente.

Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y se mostrara el espectro resultante. Tras la obtención de los espectros, se procedió al análisis de estos para establecer el tipo de moléculas presentes en las muestras.

#### **4.3.6.2 Espectroscopia de infrarrojo (IR)**

Para este tipo de espectroscopia, las muestras solidas de los extractos se molieron en un mortero con la finalidad de reducir el tamaño de partícula y aumentar la superficie de contacto. Posteriormente, se analizaron los espectros de infrarrojo de los compuestos aislados del extracto metanólico y acetónico, utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo (Perkin Elmer System 200 FT-IR) equipado con un sistema de reflectancia total atenuada (ATR) a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Para cada muestra se colectaron 48 barridos con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$  y de estos se obtuvo un valor promedio. Se trabajó en la región de  $400$  a  $4.000 \text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.3.6.3 Calorimetría diferencial de barrido**

Para determinar el punto de fusión de los compuestos obtenidos de la separación por cromatografía líquida, se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (DSC Modelo 822E. Mettler Toledo, Griefensee, Zurich Sz). Para ello el equipo se calibro de acuerdo a los manuales de operación, utilizando como estándar para la temperatura y el flujo de calor, indio (In) ( $T_o = 156.6$  °C,  $\Delta H = 28.4$  J/g). Para montar las muestras se emplearon crisoles de aluminio estándar de  $40 \mu\text{L}$ , se colocaron aproximadamente  $5 \text{ mg}$  de muestra y se evaluó en el intervalo de  $25$  °C a  $150$  °C empleando una velocidad de calentamiento de  $5$  °C/min (pruebas se realizadas por duplicado).

#### **4.3.7 Estudios en jamón cocido de cerdo**

Los extractos, fracciones y compuestos aislados de la planta B de estudio que presentaron mayor actividad antimicrobiana, fueron empleados a una concentración de 5% en la elaboración de jamón, con la finalidad de observar su efecto antimicrobiano en este producto cárnico.

##### **4.3.7.1 Ingredientes y aditivos en la elaboración del jamón**

Pierna trasera de cerdo (Jamón), Aislado de soya, Dextrosa, Carragenina, Condimento para jamón 001R, Condimento para jamón 2000-III, Condimento para jamón 851, Eritorbato de sodio, Fosfato de sodio, Glutamato monosódico, Hielo, Sal cura, Sal fina, Sorbato de Potasio, PVH, Agua.

##### **4.3.7.2 Equipo utilizado en la elaboración de jamón**

Agitador de salmuera, Cuchillos, Chairas, Deposito de acero ó plástico, Embutidora, Engrapadora, Funda termoencogible, Molino (cedazo 5.0 mm), Tablas para picar, Tumbler de vacío, Tinas de acero.

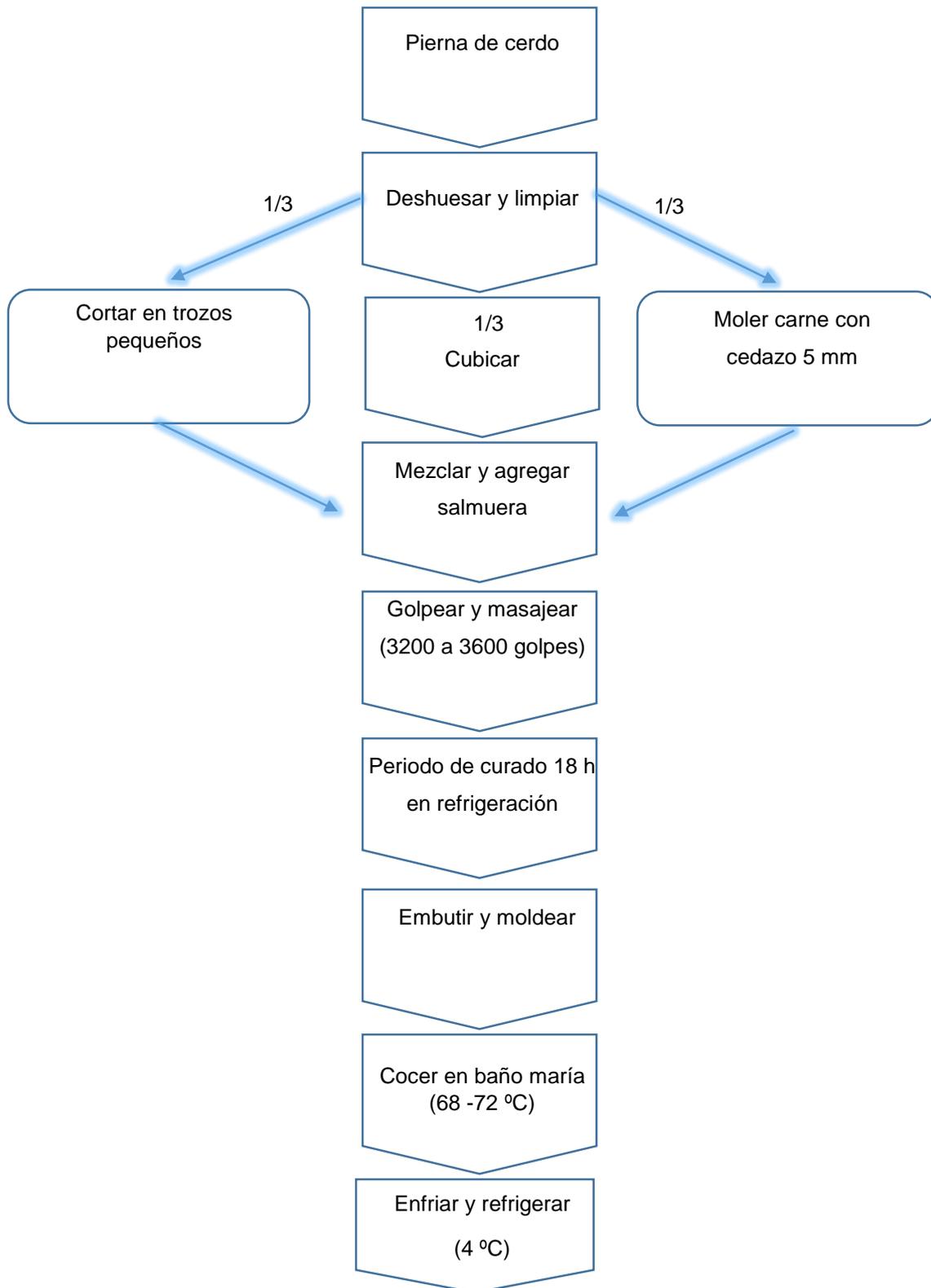
##### **4.3.7.3 Procedimiento en la elaboración de jamón**

Para la elaboración del producto se siguió la metodología de González-Tenorio y Soto-Simental (2007), brevemente, se compró pierna de cerdo y en el laboratorio se deshuesó y se separó la carne magra del tendón y grasa excedente. La carne se molió con los cedazos necesarios se pesó. Posteriormente se preparó la solución de salmuera con agua/hielo (1:1) y agito hasta disolver completamente los aditivos utilizados (Tabla 10). Una vez preparada la salmuera se depositó junto con la carne en un bombo de vacío para masajear hasta observar una buena extracción de proteína (3200 a 3600 golpes). Después del proceso de masaje la pasta se dejó en refrigeración y vacío por un periodo de 18 h. Posteriormente se embutió y coció el jamón hasta alcanzar una temperatura interna mínima de 68 °C a 72 °C. Finalmente se enfrió y refrigeró a 4 °C (Figura 4). Se preparó jamón conteniendo y no, extracto metanólico de la planta de estudio, así como colecciones de fracciones cromatográficas del extracto metanólico y compuestos puros obtenidos de la planta de estudio. Estos

compuestos se agregaron al jamón después de la etapa de curación (18 h en refrigeración) y antes de embutir y moldear para la cocción.

**Tabla 10. Aditivos empleados para la elaboración de jamón (Rendimiento 50%)**

<b>Aditivo</b>	<b>cantidad (Kg)</b>	<b>Formulación (kg)</b>	<b>Formulación( g)</b>	<b>Orden de adición</b>
Aislado de soya	0.006	0.0315	31.5	2
Dextrosa	0.01	0.0525	52.5	2
C. P/ jamón 2000-III	0.005	0.02625	26.25	2
C.P/ jamón 001R	0.005	0.02625	26.25	2
Rojo Carmín	0.0001	0.000525	1	4
Carrag. FA -414	0.003	0.01575	15.75	3
Eritorbato de sodio	0.001	0.00525	5.25	5
Fosfato de sodio	0.005	0.02625	26.25	1
Glutamato (pVH)	0.001	0.00525	5.25	3
Sal de curación	0.005	0.02625	26.25	4
Sal	0.015	0.07875	78.75	2
Benzoato	0.0005	0.002625	2.625	2
<b>Total de aditivos</b>		<b>0.29715</b>	<b>297.625</b>	
<b>Agua/ hielo</b>		<b>1.45285</b>	<b>1452.85</b>	1
<b>Carne magra</b>		<b>3.5</b>	<b>3500</b>	
<b>Total</b>		<b>5.25</b>	<b>5250.475</b>	



**Figura 4. Proceso de elaboración de jamón**

#### **4.3.7.4 Evaluación del efecto antimicrobiano en jamón**

##### **4.3.7.4.1 Preparación del inóculo**

Tubos con 3 ml CST se inocularon con *S. Typhimurium* y *S. aureus* resistentes al antibiótico rifampicina (R+) y se incubarán a  $35 \pm 1$  °C durante 18 h, los cultivos se lavaron dos veces en solución salina isotónica estéril (ISS; 0,85% de NaCl) por centrifugación a 3500 g durante 20 min, y los precipitados se re suspendieron en agua de peptona estéril. La concentración de cada cepa fue de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/ml. Finalmente, cada cepa se diluyo en diluyente de peptona hasta una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml.

##### **4.3.7.4.2 Preparación del material de ensayo (jamón)**

Para estas pruebas se siguió la metodología descrita por Cruz-Galvez (2012), brevemente, de cada tipo de jamón (conteniendo y no extractos, fracciones y compuestos puros obtenidos de la planta de estudio) se cortaron trozos de jamón de aproximadamente 2.5 x 2.5 cm y se colocaron en un recipiente limpio; de manera independiente, cada trozo se inoculo con 10 µl de una suspensión de los patógeno ( $1 \times 10^6$  UFC/ml). Los trozos de jamón inoculados se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se empacaron al vacío empleando empaques especiales para ello. Los trozos inoculados y empacados al vacío se almacenaron en refrigeración. Periódicamente, se tomaron al azar trozos inoculados con cada microorganismo patógeno y se efectuó el recuento de los patógenos. Para esto, los trozos de jamón se colocaron en bolsas de plástico conteniendo 20 ml de diluyente peptona. Posteriormente, los materiales fueron frotados manualmente por la parte exterior de la bolsa por 1 minuto. Del contenido de la bolsa se tomó 1ml y se colocó en una caja Petri. Se realizó una dilución decimal, se agito y colocó 1ml de esta dilución en una segunda caja Petri. Se agregó agar para métodos cuenta estándar (con rifampicina 100 mg/L) en cada caja de petri inoculada y se realizaron movimientos circulares para homogenizar la distribución de la muestra con el agar, posteriormente se incubo a 37 °C durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo se realizó el conteo de

UFC con ayuda de un cuenta colonias (Figura 5). El conteo se realizó para cada tipo de muestra por triplicado, a los 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28 y 35 días.

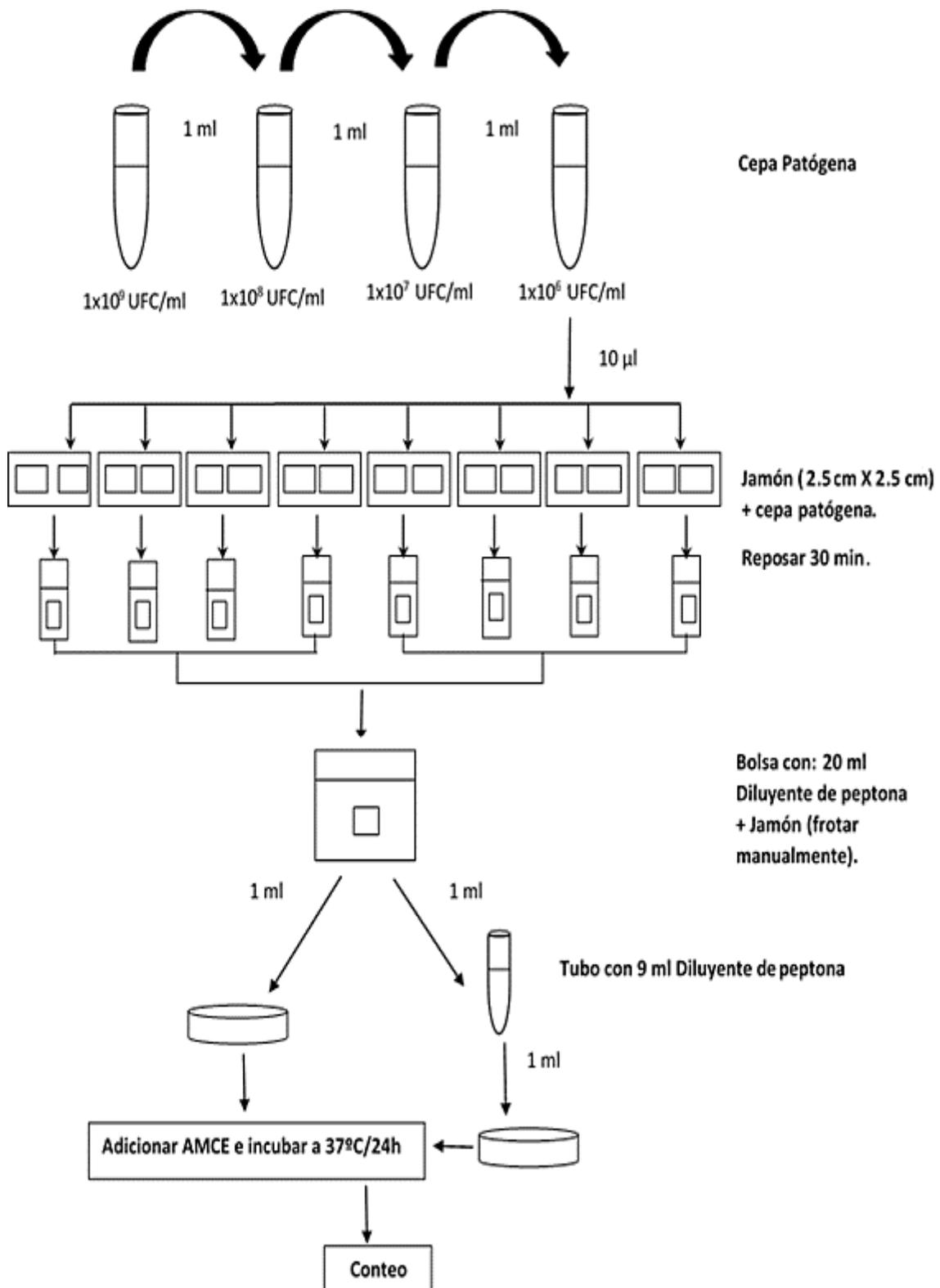


Figura 5. Evaluación de efecto antimicrobiano en jamón

## V Resultados y Discusión

Se utilizaron bacterias patógenas resistentes a la rifampicina (R +), un antibiótico de amplio espectro contra bacterias, debido a que los extractos de plantas no son estériles. El uso de rifampicina (RIF) inhibió completamente (<10 UFC) las bacterias nativas de las plantas bajo estudio.

### 5.1 Efecto Antimicrobiano de las plantas utilizadas en la medicina tradicional de Hidalgo

De las 31 plantas utilizadas, sólo *G. inuloides*, *R. chalepensis*, *D. stramonium* y las plantas de estudio denominadas como A y B exhibieron un efecto antimicrobiano contra al menos uno de los microorganismos de estudio (Tabla 11). Los extractos de aquellas plantas que no mostraron efecto sobre cualquier microorganismo no se muestran en las tablas. Los extractos acuosos de planta A tuvieron un efecto antimicrobiano contra las diez bacterias probadas y *G. inuloides* contra ocho. El *S. epidermidis* fue el único microorganismo sensible a tres extractos acuosos de las plantas evaluadas (Tabla 11). La CMI para los cuatro extractos acuosos fue de 4 mg/ml, que está dentro de los valores reportados para diferentes plantas medicinales con un efecto antimicrobiano (Hammer *et al.*, 1999; Salvat *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2003; Castillo-Juárez *et al.*, 2009).

Las plantas examinadas se utilizan de forma tradicional para hacer infusiones o té, destinados al tratamiento de las infecciones gastrointestinales, piel o garganta. La mayoría de las plantas analizadas no tuvieron efecto antimicrobiano contra las bacterias comúnmente asociados con enfermedades gastrointestinales en México. Sin embargo, esas plantas podrían tener un efecto terapéutico contra las infecciones bacterianas a través de otros mecanismos, tales como la estimulación del sistema inmune. Para identificar estos posibles mecanismos, se necesitan realizar más investigaciones en torno a mecanismos distintos de la actividad antimicrobiana o evaluar distintas partes de las plantas que no exhibieron efecto antimicrobiano.

**Tabla 11. Plantas medicinales con efecto antibacterial<sup>1</sup>**

Nombre de la planta	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>V. cholerae</i> O1	<i>P. aeruginosa</i>
Cloramfenicol	18 ±0.81 <sup>2,3</sup>	18 ±1.15	18 ±0.81	25 ±1.41	26 ±0.81	18 ±1.15	17 ±0.81	19 ±1.41	23 ±0.81	18 ±1.15 <sup>5</sup>
CMI	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002
Planta A	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81
CMI	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Grindelia inuloides</i>	10±0.81	10±0.81	— <sup>4</sup>	10±0.81	10±0.81	—	10±0.81	10±0.81	10±0.81	12±0.81
CMI	4	4	—	4	4	4	4	4	4	4
<i>Ruta chalepensis</i> L.	—	10±0.81	—	—	—	—	—	—	—	—
CMI	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Datura stramonium</i>	—	—	10±0.81	—	—	—	—	—	—	—
CMI	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—

<sup>1</sup> *Extracto acuoso*; <sup>2</sup> Promedio de 4 repeticiones ± SD; <sup>3</sup> milímetros; MIC: concentración mínima inhibitoria (mg/ml); <sup>4</sup> Sin efecto antimicrobiano, <sup>5</sup> Gentamicina

A continuación se discuten los resultados obtenidos por otros investigadores que incluso reportan actividad antimicrobiana para algunas de las plantas que nosotros examinamos y que no mostraron efecto antimicrobiano.

El extracto acuoso de la planta *Alternanthera repens* (L.) Kuntze (conocida comúnmente como Tianguis), el cual es considerado de importancia en etnobotánica ya que las partes aéreas se emplean principalmente para tratar problemas digestivos, como es el dolor estómago, infección intestinal y diarrea, no presentó actividad antimicrobiana frente a los patógenos evaluados, resultados que concuerdan con lo reportado por Zavala *et al.* (1998), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana contra *Sarcina lutea* (ATCC 40322), *Proteus bulgaris* (ATCC 6059), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), y *Escherichia coli* (ETECS 1552), sin observar inhibición para los extractos de hexano, cloroformo, metanol y agua. Sin embargo la actividad como antidiarreico del extracto acuoso de esta planta, ha sido reportada por Astudillo-Vázquez *et al.* (2008), quienes mencionan que su administración por vía oral, inhibe el avance del contenido gastrointestinal en roedores.

La planta *Anethum graveolens* (conocida tradicionalmente como Eneldo) perteneciente a la familia *Apiaceae*, es utilizada principalmente para tratar padecimientos estomacales como lo es el dolor de estómago y diarrea. Por ello se realizó un extracto acuoso de las hojas de esta planta y se evaluó el efecto antimicrobiano, no observándose tal efecto contra las bacterias patógenas evaluadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sonali y Shekhawat (2010), quienes evaluaron el efecto antimicrobiano de la decocción de las hojas de esta planta contra las bacterias *Escherichia coli* HB101 (MTCC-82), *Bacillus subtilis* (MTCC-441), *Bacillus cereus* (MTCC-1306) y *Micrococcus luteus* (MTCC-2452) mediante el método de difusión en pozo, y no se observó efecto con esta técnica; sin embargo, estos mismos autores reportan efecto inhibitorio para *E. coli* y *Bacillus cereus* cuando se emplea el método de difusión en disco.

La planta *Brickellia squarrosa* (Cav.) B.L. Robinson, perteneciente a la familia *Asteraceae*, conocida comúnmente como Prodigiosa y teniendo usos medicinales contra afecciones del estómago y diarrea, no presentó actividad antimicrobiana al utilizarse la decocción de la raíz perteneciente a esta planta.

Sin embargo su uso podría tener un efecto analgésico, ya que Garcia-Sanchez *et al.* (2011), han reportado que en el estado de Michoacán se utiliza en la medicina tradicional para tratar dolor cabeza y dolor muscular, así como inmunoestimulante.

*Conyza schiedeana* (Lees) Cronq., planta conocida como Simonillo, no presentó efecto antimicrobiano, al ser probada la decocción de la raíz de esta planta contra los diez patógenos utilizados en las pruebas de inhibición. Por su parte Leon-Villanueva (2000), reportó que el extracto de acetato de etilo de la raíz de *C. schiedeana* presentó actividad antimicrobiana contra *S. Typhimurium*, mientras que el extracto hexánico de esta planta presentó actividad antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*.

La infusión de raíz de la planta *Eupatorium petiolare* (conocida tradicionalmente como Yoloichichitl), utilizada comúnmente para tratar diarreas y enfermedades digestivas tampoco presentó actividad antimicrobiana. Sin embargo Castillo-Juárez *et al.* (2009) reportaron actividad antimicrobiana moderada contra *Helicobacter pylori* utilizando la decocción de partes aéreas de esta planta.

La planta *Hemiangium excelsum* (conocida tradicionalmente como Cancerina), cuya infusión de los tallos es utilizada para tratar diarrea, no mostró actividad antimicrobiana. Sin embargo los estudios realizados por Alanís *et al.* (2005), reportan actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *Shigella sonnei*, *S. flexneri* y *Salmonella* Sp., esto aplicando extractos acuosos y metanólicos de raíz a una concentración de (8 mg/ml). Castillo-Juárez *et al.* (2009), reportan la actividad antimicrobiana nula contra *Helicobacter pylori*, esto al utilizarse la infusión de una combinación de corteza y raíz de esta planta. Cabe mencionar que el extracto acuoso de la raíz de esta planta presenta un efecto gastroprotector en roedores (Navarrete, Trejo y Reyes, 2002), no obstante, es muy posible que el mecanismo de protección sea por factores distintos a los relacionados con los antimicrobianos.

Al emplearse la infusión de las partes aéreas de planta conocida tradicionalmente como Hierba blanca (*Hesperozygis marifolia* Briq. Epling.), no mostró efecto antimicrobiano. Sin embargo existen reportes como el de Castillo-Juárez *et al.* (2009) quienes mencionan actividad antimicrobiana baja contra

*Helicobacter pylori*, esto al emplear una decocción de las partes aéreas de dicha planta.

El extracto acuoso de las partes aéreas la planta conocida como Lentejilla (*Lepidium virginicum* L.), no presento efecto antimicrobiano en esta investigación, resultados que concuerdan con los obtenidos por Meléndez y Capriles (2006), quienes no observaron halos de inhibición en cultivos de *E. coli* y *S. aureus* al emplear un extracto metanólico de esta planta. Mientras que Gutiérrez-Lugo *et al.* (1996), reportan que no existe actividad antimicrobiana al emplearse todas las partes de esta planta, contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*, dichos resultados no concuerdan con lo reportado por Avila, Muñoz y Marinez (1993), quienes mencionan que esta planta inhibe al desarrollo de *E. coli*, *S. typhi* y *S. boydii*.

El extracto acuoso de *Lippia graveolens* HBK, conocido tradicionalmente como orégano, no presento efecto antimicrobiano contra los diez patógenos que evaluamos en el presente estudio, esto al utilizar la decocción de tallos, hojas y flores cuyas partes han sido reportadas para tratar dolor de estómago. Sin embargo existen estudios como el de Castillo-Juárez (2009) quien reportó bajo efecto antimicrobiano contra *Helicobacter pylori* al utilizar la decocción de las partes aéreas de esta planta.

La planta *Matricaria chamomilla* L., conocida en la medicina tradicional como manzanilla, utilizada como infusión para tratar cólicos y dolor de estómago, no presento efecto inhibitorio contra los patógenos evaluados, esto al usar el extracto acuoso de tallos hojas y flores de esta planta. Estudios realizados por Roby, Sarhan, Selim, y Khalel (2013) reportan actividad contra *E. coli*, *S. typhi*, *B. cereus* y *S. aureus* de los extractos de flores obtenidos con metanol, etanol, éter y hexano.

La decocción de las flores, hojas y tallos de planta *Medicago polymorpha* var. *vulgaris*, conocida tradicionalmente como Carretilla, no presentó efecto antimicrobiano contra ninguna de las bacterias patógenas evaluadas. Dentro de los estudios realizados para evaluar efecto antimicrobiano de otras especies pertenecientes al género *Medicago* se encuentra el de Avato *et al.* (2006), quienes al utilizar un método de extracción y purificación de saponinas, reportan

efecto antimicrobiano de las plantas *Medicago sativa*, *M. arborea* y *M. arabica* contra *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

La decocción de las hojas y tallos de *Prunus serotina* Ehrh., la cual es utilizada de forma tradicional para tratar diarrea, no mostro actividad antibacterial. Por su parte Omar *et al.* (2000), utilizaron un extracto etanólico de la corteza de este árbol, encontraron efecto antimicrobiano contra *S. aureus*, pero no para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. Typhimurium*, resultados que concuerdan con los obtenidos en nuestro trabajo para estos últimos tres patógenos.

La decocción de los tallos y hojas de la planta *Psidium guajava* L., utilizada tradicionalmente para tratar diarrea, no presentó efecto antimicrobiano. No obstante, Abdelrahim *et al.* (2002), reportaron actividad antimicrobiana del extracto acuoso de la corteza de esta planta contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Mientras que Geidam, Ambali y Onyeyili (2007), observaron que el extracto acuoso de las hojas de esta planta, inhibió el crecimiento de *S. typhi* y *Klebsiella pneumoniae*, pero no tuvo efecto sobre *Streptococcus faecalis*, *E. coli* y *S. aureus*, resultados que coinciden con los obtenidos en nuestro estudio para los dos últimos microorganismos.

La infusión de la raíz de la planta conocida como Ojo de gallo (*Sanvitalia procumbens* Lam.), no mostro efecto antimicrobiano contra las bacterias patógenas evaluadas. Sin embargo Rodríguez-Pérez *et al.* (2006), reportaron actividad antimicrobiana para la infusión de las hojas de esta planta contra *S. typhi*, *S. flexneri* y *S. sonnei*, mientras que para *E. coli* dichos autores no observaron actividad antibacteriana.

La decocción de la raíz de la planta conocida tradicionalmente como Flor de araña (*Sigesbeckia jorullensis* HBK.), no presento efecto antibacteriano. Por lo que su uso pudiese estar relacionado con la posible inhibición del avance del contenido intestinal en el caso de diarreas, que es para lo que la gente la utiliza tradicionalmente (Villavicencio-Nieto y Pérez Escandón, 2006).

La decocción de las flores de la planta conocida en la medicina tradicional como Tripa de gallina (*Silvia prostrata*, Benth), no presento efecto antimicrobiano en el presente estudio, por lo que su uso para tratar diarreas (Pérez-Escandón *et al.*,

2003), no se relaciona con el efecto antimicrobiano o al menos no para los diez patógenos empleados en nuestro trabajo.

La planta *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip., utilizada en la medicina tradicional para tratar diarrea, no presentó efecto antimicrobiano, esto al realizar la decocción de la raíz de la planta. Estos resultados concuerdan con los reportados por Castillo-Juárez *et al.* (2009), quienes mencionan actividad antimicrobiana nula contra *Helicobacter pylori*.

La decocción de los tallos de la planta *Terminalia catappa* L, no tuvieron efecto antimicrobiano contra ninguna de las bacterias patógenas evaluadas en la investigación realizada. De acuerdo con lo reportado por Nair y Chanda (2008), el extracto acuoso de las hojas de esta planta, no presenta efecto antimicrobiano contra las bacterias *S. epidermidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, con excepción de *S. aureus* la cual se ve afectada por la infusión de esta planta.

La planta *Thymus vulgaris* L., tradicionalmente conocida como Tomillo, no presentó actividad antimicrobiana al evaluarse la decocción de la raíz. Sin embargo, Essawi y Srour (2000), reportaron actividad antimicrobiana del extracto acuoso de las partes aéreas de dicha planta contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, pero no así para *E.coli*.

Estas discrepancias observadas entre nuestro estudio y los reportados por diferentes investigadores, pueden explicarse por diferentes causas, por ejemplo, la variabilidad en la susceptibilidad de las cepas individuales dentro y entre los géneros, y las diferencias entre variedades de plantas dentro del mismo género y / o especie. Además, la actividad antimicrobiana de un compuesto de la planta puede ser afectada significativamente por el genotipo, el medio ambiente, temporada de cosecha, las condiciones de almacenamiento, las condiciones de la ubicación geográfica, altitud y el tipo de extracción, entre otros factores (Brandi *et al.*, 2006; Proestos *et al.*, 2008.; Silva *et al.*, 2007).

Los resultados para las cuatro plantas que mostraron actividad antimicrobiana (planta de estudio A, *G. inuloides*, *R. chalepensis*, y *D. stramonium*) sugieren que las bebidas o infusiones preparadas con ellos podrían tener un efecto antimicrobiano contra las bacterias probadas cuando se administran en los seres humanos. En otras palabras, una bebida acuosa hecha de cualquiera de las

plantas estudiadas en una proporción de 1:10 (es decir, cerca de las concentraciones ensayadas) podría ayudar en el control de enfermedades causadas por las bacterias evaluadas en este estudio. Sin embargo, sería necesaria una amplia investigación para determinar los posibles efectos tóxicos de los extractos acuosos contra los consumidores en estas dosis o proporciones (1:10), y es necesario realizar estudios con modelos animales para confirmar cualquier efecto antimicrobiano *in vivo* de estos extractos.

En la literatura también se ha reportado actividad antimicrobiana en medio de cultivo para las plantas que nosotros también observamos efecto antimicrobiano: *R. chalepensis* (Al-Bakri y Afifi, 2006) y *D. stramonium* (Reddy, 2010; Shagal *et al.*, 2012), aunque la actividad antimicrobiana de las plantas y microorganismos susceptibles difieren un tanto de los reportados aquí (Tabla 11).

En otros estudios se ha reportado que *R. chalepensis* no tiene efecto antimicrobiano (Cáceres *et al.*, 1990; Hernández *et al.*, 2003). Estas diferencias pueden explicarse como se mencionó antes por la variabilidad de las cepas de los patógenos y las diferencias entre el genotipo de las plantas, las condiciones de almacenamiento, y el tipo de extracción. Teniendo en cuenta esto, hay que hacer investigaciones sobre el efecto antimicrobiano de las plantas utilizadas en la medicina tradicional (con o sin efecto reportado), tomando en cuenta las regiones donde se cultivan y utilizan, ya que diversos factores pueden influir en la presencia y cantidad de los compuestos activos.

## **5.2 Efecto antimicrobiano de extractos flores, hojas y tallos obtenidos con diferentes disolventes a partir de las plantas con efecto antimicrobiano.**

La actividad antimicrobiana observada en los extractos de plantas ensayadas se puede atribuir a la presencia de compuestos con un efecto antimicrobiano en las plantas. Estas sustancias antimicrobianas se pueden localizar en toda la planta o concentrarse en una parte específica de la planta, como la epidermis, el tallo, corteza, flores, hojas o raíces (Beuchat *et al.*, 1994; Tajkarimi *et al.*, 2010). Se sabe que las moléculas activas presentes en las plantas incluyen terpenos, fenoles, taninos, entre muchos otros (Beuchat *et al.*, 1994; Tajkarimi *et al.*, 2010). Estos compuestos tienen diferentes polaridades, lo que afecta su solubilidad en

agua. Como resultado, es posible que las plantas estudiadas contengan sustancias antimicrobianas de baja polaridad que no se extrajeron con agua.

Sabiendo de la polaridad de los compuestos activos y su ubicación en las partes de la planta que los contienen, es posible que cantidades más grandes puedan ser extraídas de manera más eficiente con disolventes de distinta polaridad que la del agua. Por ello, se realizó el análisis para probar el efecto antimicrobiano de los extractos obtenidos con disolventes de diferente polaridad a partir de diferentes partes de la planta de estudio A y de *G. inuloides*. Los extractos se hicieron usando disolventes de diferentes polaridades, incluyendo agua. Los extractos de la planta A y *G. inuloides* exhibieron un efecto antimicrobiano alto (Tabla 12). Los extractos de las flores normalmente mostraron actividad antimicrobiana más alta. Las hojas también tienen actividad antimicrobiana en ambas plantas. Sin embargo, la planta A tenía la actividad más alta (Tabla 12). Tanto el extracto metanólico como el acuoso de la planta A inhibieron ocho de los diez tipos de microorganismos probados, con la excepción de *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa*. La actividad antimicrobiana de extractos de metanol de ambas plantas fue mayor que los extractos acuosos. Los resultados sugieren la presencia de compuestos antimicrobianos en la planta A con diferentes polaridades.

**Tabla 12. Efecto antimicrobiano de los extractos de flores, hojas y tallos obtenidos con diferentes disolventes<sup>1</sup>**

Planta	Parte de la planta	Tipo de extracto <sup>2</sup>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
<i>Planta A</i>	Flores	A	10±0.81 <sup>3,4</sup>	10±0.81	—	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81	—	
		Me	15±0.81	15±0.81	—	15±0.81	17±0.81	15±0.81	15±0.81	16±0.81	14±0.81	—	
		Et	— <sup>5</sup>	14±0.81	—	—	—	—	14±0.81	10±0.81	10±0.81	—	
		He	—	—	—	14±0.81	14±0.81	—	—	—	—	—	
	Hojas	A	—	—	—	10±0.81	10±0.81	—	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81	
		He	—	—	—	12±0.81	12±0.81	—	12±0.81	12±0.81	11±0.81	—	
		Ac	—	—	—	—	—	—	10±0.81	10±0.81	10±0.81	15±0.81	
	Tallos	A	—	—	10±0.81	—	—	—	10±0.81	10±0.81	—	10±0.81	
		Me	—	—	13±0.81	—	—	—	14±0.81	12±0.81	—	—	
		Ac	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15±0.81	
	<i>G. inuloides</i>	Flores	A	10±0.81	—	—	—	—	—	10±0.81	10±0.81	10±0.81	10±0.81
			Me	—	—	—	—	—	—	12±0.81	11±0.81	12±0.81	12±0.81
Ac			—	—	—	—	—	—	12±0.81	10±0.81	—	—	
Et			13±0.81	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Hojas		A	—	—	—	—	—	—	10±0.81	10±0.81	—	—	
		Ac	—	—	—	—	—	—	16±0.81	16±0.81	—	—	
Tallos		A	—	10±0.81	—	10±0.81	10±0.81	—	—	—	—	—	
		Me	—	12±0.81	—	12±0.81	14±0.81	—	—	—	—	—	

<sup>1</sup>Los extractos de plantas sin efecto sobre cualquier microorganismo no se reportan en la tabla; <sup>2</sup> agua (A), etanol (Et), metanol (Me), acetona (Ac), hexano (He); <sup>3</sup> promedio de cuatro repeticiones ± SD, <sup>4</sup> milímetros, <sup>5</sup> No hay efecto antimicrobiano.

Este es el primer informe de un efecto antibacteriano de *G. inuloides* contra bacterias transmitidas por los alimentos. Los resultados apoyan la posible aplicación de los extractos de la planta de estudio A, para controlar bacterias patógenas. Sin embargo, se necesita más investigación para evaluar el efecto antibacteriano de la combinación de los extractos de la planta de estudio A y de *G. inuloides* contra diferentes bacterias transmitidas por los alimentos, tales como *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *S. flexneri* y *S. aureus*. Además, se necesitan evaluaciones de la eficacia antimicrobiana de los extractos de la planta de estudio A y *G. inuloides* en diferentes sistemas alimentarios, o como agentes antimicrobianos activos de películas comestibles o como soluciones desinfectantes de frutas y hortalizas. Los extractos de estas dos plantas son prometedores como agentes antimicrobianos naturales en los alimentos.

### **5.3 Efecto antimicrobiano de la planta de estudio B**

La planta de estudio B fue la que presentó desde los estudios preliminares el mayor efecto antimicrobiano, mostrando en ocasiones hasta el doble de efecto antimicrobiano que el observado con la planta A. Es por ello que en la tesis se discute de manera separada. Y además, es con esta planta B con la que se profundizó en los estudios en este trabajo.

La planta B mostró efecto antimicrobiano contra *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium* (Tabla 13) al emplearse los extractos acuoso, metanólico, acetónico y de acetato de etilo, tanto sin tratamiento térmico como con extractos sometidos a esterilización (121 °C, 15 m, 15 Lb/in<sup>2</sup>).

Los extractos de mayor actividad antimicrobiana fueron los acetónicos, los cuales mostraron halos de inhibición con un diámetro en promedio de 11.49 mm para el extracto sin tratamiento térmico y 15.53 mm para los extractos sometidos a esterilización, esto para *E. coli*, mientras que para *S. Typhimurium* el diámetro de los halos fueron de 11.99 mm y 17.97mm respectivamente. Para los extractos metanólicos se observaron halos de inhibición de 11.5 mm y 13.0 mm (sin y con tratamiento térmico) para *E. coli* O157:H7, mientras que para *S. Typhimurium* se observaron halos de inhibición de 10.88mm y 12.27 mm (sin y con tratamiento térmico). El extracto acuoso sin tratamiento térmico, presento menor actividad

antimicrobiana con halos de inhibición de 7.6 y 7.8 para *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*, mientras que con tratamiento de esterilización mostraron halos de 8.34 mm y 8.37 mm respectivamente.

**Tabla 13. Efecto antimicrobiano de los extractos de la planta B**

Extracto	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>
Acuoso	7.605±0.07 <sup>1,2</sup>	7.89±0.08
Acuoso estéril	8.34±0.14	8.37±0.25
Metanólico	11.5±0.28	10.88 ±0.59
Metanólico estéril	13.0±0.34	12.27 ±0.26
Acetona	11.49±0.44	11.99±0.32
Acetona estéril	15.53±0.93	17.97±0.72
Acetato de etilo	7.88±0.10	9.19±0.14
Acetato de etilo estéril	8.58±0.08	9.7±0.10

<sup>1</sup>Promedio de los halos de inhibición de cuatro repeticiones ± SD, <sup>2</sup>milímetros.

Los resultados de actividad antimicrobiana concuerdan con lo reportado por Cruz-Galvez (2012), quien observó actividad antibacteriana para los extractos acetónicos con halos de inhibición de 22 mm y 24 mm para *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*, mientras que para los extractos metanólicos reportó halos de 23 mm y 25 mm, y para los extractos acuosos observó halos de inhibición de 12 mm y 10 mm respectivamente para ambas bacterias.

Si bien los extractos acuoso y de acetato de etilo mostraron una menor actividad antibacteriana comparada con los acetónicos o metanólicos, esto puede ser debido a la polaridad de los disolventes, ya que se ha comprobado que la extracción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana está influenciada por la polaridad del disolvente utilizado (Muthuvelan y Balaji, 2008; Nostro *et al.*, 2000), ya que estos presentan características químicas y estructurales que ayudan a solubilizar diferentes compuestos bioactivos de las plantas (Villar del Fresno, 1999). Esto, en parte está relacionado de igual forma con la cantidad de extracto obtenido, ya que para el metanólico se obtuvo un rendimiento de 247.88 g por Kg de planta seca, 25,8 g/kg del extracto de acetona y 4.54 g/kg del extracto de acetato de etilo.

Debido a que los extractos metanólico y acetónico presentaron mayor actividad antimicrobiana y rendimiento, en los siguientes estudios sólo se trabajó con los extractos metanólico y acetónico.

#### 5.4 Separación en fracciones de la planta B por cromatografía líquida (Extracto metanólico)

Para realizar la separación del extracto metanólico de la planta de estudio B, se realizó la mezcla de 30 g extracto con 25 g de sílica para quitar la humedad existente y así poder separar por cromatografía líquida, recuperando 50 ml por fracción, los cuales fueron evaporados en rota evaporador y posteriormente se depositaron en viales de cristal. Para esta primera cromatografía en columna se obtuvieron 524 fracciones utilizando distintas combinaciones de los disolventes Hexano, Acetato de etilo y Metanol (Tabla 14). De las fracciones obtenidas se procedió a realizar cromatografía en capa fina para determinar su semejanza, obteniendo 30 colecciones de las cuales se probó su efecto antimicrobiano mediante la técnica de difusión en placa empleando discos (Tabla 15).

**Tabla 14. Fracciones obtenidas en primera cromatografía de la planta de estudio B**

Fracción	Concentración de disolvente
1-26	Hexano 100%
27-50	Hexano 70% : Acetato de etilo 30%
51-128	Hexano 30% : Acetato de etilo 70%
129-192	Hexano 20% : Acetato de etilo 80%
193-224	Hexano 10% : Acetato de etilo 90%
225-302	Acetato 100%
303-337	Metanol 10% : Acetato de etilo 90%
338-505	Metanol 20% : Acetato de etilo 80%
506-524	Metanol 100%

**Tabla 15. Algunas características de las colecciones obtenidas por cromatografía en placa fina de la planta de estudio B**

Colección	Fracción en cromatografía en placa fina	Características en vial (color)	Actividad antimicrobiana
I	No se observan compuestos	Transparente	No presenta
II		Verde	No presenta
III	Compuestos suben al mismo nivel de la placa con Hexano 70%: acetato 30%	Verde	No presenta
IV		Verde	No presenta
V	Se observa un compuesto que se desplaza hasta $\frac{3}{4}$ de la placa con Hexano 30%: acetato 70%	Ámbar	Presenta
VI	El desplazamiento es a $\frac{3}{4}$ de la placa pero se observan al menos dos compuestos en la parte baja	Ámbar	Presenta
VII	El desplazamiento de los compuestos se observa a mitad de la placa con la combinación Acetato 90%: metanol 10%	Ámbar	Presenta
VIII		Ámbar	Presenta
IX		Ámbar	Presenta
X	Desplazamiento a $\frac{1}{4}$ de la placa con tres compuestos observables con la combinación de Acetato 90%: metanol 10%	Ámbar	No presenta
XI	Desplazamiento a mitad de la placa observando 4 compuestos con la combinación de Acetato 90%: metanol 10%	Ámbar	Presenta
XII	Desplazamiento a mitad de la placa observando al menos 6 compuestos con la combinación de Acetato 90%: metanol 10%	Ámbar	Presenta
XIII	Desplazamiento a $\frac{3}{4}$ de la placa observando al menos 6 compuestos con la combinación de Acetato 90%: metanol 10%	Ámbar	Presenta
XIV	El desplazamiento de uno de los compuestos llego casi a la línea superior de la placa, sin embargo se observan dos compuestos en la parte baja, esto al ser subidas con Acetato 90%: metanol 10%	Ámbar	No presenta
XV		Ámbar	No presenta
XVI		Ámbar	No presenta
XVII	Uno de los compuestos fue desplazado hasta $\frac{3}{4}$ de la placa, mientras que tres quedaron en el primer cuarto de la placa, esto utilizando Acetato 80%: metanol 20%	Ámbar	No presenta

XVIII	Uno de los compuestos se observa muy marcado en el $\frac{3}{4}$ de la placa mientras que tres quedaron en el primer cuarto de la placa, esto utilizando Acetato 80%: metanol 20%	Ámbar	Presenta
XIX	Uno de los compuestos observa muy marcado en el $\frac{3}{4}$ de la placa mientras que tres quedaron en el primer cuarto de la placa, esto utilizando Acetato 80%: metanol 20%	Ámbar	Presenta
XX	Se observa el desplazamiento a $\frac{3}{4}$ de la placa pero no es muy marcado y se observan dos compuestos tenues en la parte baja de la placa, esto utilizando Acetato 80%: metanol 20%	Ámbar	No presenta
XXI	Se observa el desplazamiento a $\frac{3}{4}$ de la placa pero no es muy marcado y se observan tres compuestos en el primer cuarto de la placa, esto utilizando Acetato 80%: metanol 20%	Ámbar	No presenta
XXII	Se observa el desplazamiento de cuatro compuestos, uno de ellos muy marcado a $\frac{3}{4}$ de la placa dos más se observan a la mitad de la placa y el último aparece a $\frac{1}{4}$ de la placa, esto utilizando Acetato 80%: metanol 20%	Ámbar	Presenta
XXIII	A $\frac{3}{4}$ de la placa se observa un compuesto muy marcado, y debajo de este se encuentran tres compuestos más, esto utilizando Acetato 80%: metanol 20%	Ámbar	Presenta
XXIV	Desplazamiento tenue de un compuesto a $\frac{3}{4}$ de la placa y otro a la mitad, utilizando Acetato 60%: metanol 40%	Ámbar	Presenta
XXV	Desplazamiento marcado de un compuesto a $\frac{3}{4}$ de la placa y otro a la mitad, utilizando Acetato 60%: metanol 40%	Ámbar oscuro	Presenta
XXVI	Desplazamiento tenue de un compuesto a $\frac{3}{4}$ de la placa y otro a la mitad, utilizando Acetato 60%: metanol 40%	Ámbar oscuro	No presenta
XXVII	Desplazamiento tenue de un compuesto a $\frac{3}{4}$ de la placa y otro a la mitad, utilizando Acetato 60%: metanol 40%	Ámbar oscuro	No presenta
XXVIII		Rojo intenso	No presenta
XXIX	Desplazamiento tenue de un compuesto a $\frac{1}{2}$ de la placa, utilizando Acetato 60%: metanol 40%	Rojo intenso	No presenta
XXX		Rojo intenso	No presenta

De las 30 colecciones obtenidas 14 tuvieron efecto antimicrobiano contra *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium* (Tabla 16). Se observaron halos de inhibición de hasta 16 mm para *E. coli* O157:H7 y 12 mm para *S. Typhimurium*. Dichas fracciones con actividad antibacteriana se obtuvieron con las combinaciones de los disolventes Hexano 30%: Acetato de etilo 70%, Hexano 20%: Acetato de etilo 80%, Hexano 10%: Acetato de etilo 90%, Acetato 100%, Metanol 10%: Acetato de etilo 90% y Metanol 20%: Acetato de etilo 80%, polaridades que concuerdan con estudios previos realizados en nuestro laboratorio por Cruz-Galvez (2012).

**Tabla 16. Promedio de los halos de Inhibición (mm) de las colecciones cromatográficas de la planta de estudio B**

Colección	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>	Colección	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>
I	0	0	XVI	0	0
II	0	0	XVII	0	0
III	0	0	XVIII	10	10
IV	0	0	XIX	10	10
V	11	9	XX	0	0
VI	11	9	XXI	0	0
VII	11	9	XXII	10	10
VIII	10	9	XXIII	10	9
IX	9	10	XXIV	10	9
X	0	0	XXV	9	9
XI	16	12	XXVI	0	0
XII	8	11	XXVII	0	0
XIII	9	8	XXVIII	0	0
XIV	0	0	XXIX	0	0
XV	0	0	XXX	0	0

#### 5.4.1 Segunda cromatografía de la planta B (extracto metanólico)

Para la segunda parte de la cromatografía en columna, se juntaron todas las colecciones activas contra los dos patógenos probados, obteniendo 8.25 g de rendimiento de dicha unión de compuestos con actividad antimicrobiana. Estos compuestos se sometieron al mismo procedimiento cromatográfico para continuar aislando los compuestos activos, para tenerlos puros o completamente separados. De esta segunda cromatografía se obtuvieron 960 fracciones, utilizando distintas combinaciones de los disolventes Hexano, Acetato de etilo y Metanol (Tabla 17). A las fracciones obtenidas se les realizó cromatografía en capa fina para determinar su semejanza, agrupándose en 19 colecciones de fracciones a las que se les probó su efecto antimicrobiano (Tabla 18).

**Tabla 17. Fracciones obtenidas en la segunda cromatografía de la planta de estudio B**

Fracción	Concentración de disolvente
1-21	Hexano 100%
22-42	Hexano 90% : Acetato de etilo 10%
43-64	Hexano 80% : Acetato de etilo 20%
65-188	Hexano 70% : Acetato de etilo 30%
189-278	Hexano 60% : Acetato de etilo 40%
279-366	Hexano 50% : Acetato de etilo 50%
367-441	Hexano 40% : Acetato de etilo 60%
442-503	Hexano 30% : Acetato de etilo 70%
504-555	Hexano 20% : Acetato de etilo 80%
556-594	Hexano 10% : Acetato de etilo 90%
595-631	Acetato 100%
632-710	Acetato de etilo 90% : Metanol 10%
711-750	Acetato de etilo 80% : Metanol 20%
751-802	Acetato de etilo 70% : Metanol 30%
803-823	Acetato de etilo 60% : Metanol 40%
824-848	Acetato de etilo 50% : Metanol 50%
849-895	Acetato de etilo 40% : Metanol 60%
897-917	Acetato de etilo 30% : Metanol 70%
918-927	Acetato de etilo 20% : Metanol 80%
928-950	Acetato de etilo 10% : Metanol 90%
950-960	Metanol 100%

**Tabla 18. Algunas características de las colecciones obtenidas en la segunda cromatografía en placa fina de la planta de estudio B**

Colección	Fracción en cromatografía en placa fina	Características en vial (color)	Actividad antimicrobiana
I	No se observan compuestos	Transparente	No presenta
II	Se observan compuestos por debajo de la línea superior al utilizar la combinación de disolventes Hexano 70%: Acetato 30%.	Verde	No presenta
III	El desplazamiento de los compuestos se observa a $\frac{1}{2}$ de la placa al utilizar la polaridad con la combinación Hexano 70%: Acetato 30%.	Amarillo	No presenta
IV	El desplazamiento de los compuestos se observa a $\frac{1}{2}$ de la placa al utilizar la polaridad con la combinación Hexano 50%: Acetato 50%.	Amarillo	No presenta

V	El desplazamiento de los compuestos se observa a $\frac{1}{2}$ de la placa, con al menos cinco compuestos debajo, al utilizar la combinación Hexano 50%: Acetato 50%.	Amarillo intenso	No presenta
VI	El desplazamiento de los compuestos se observa a $\frac{1}{2}$ de la placa, con al menos cinco compuestos debajo, al utilizar la combinación Hexano 50%: Acetato 50%.	Amarillo	No presenta
VII	El desplazamiento de los compuestos se observa a $\frac{1}{2}$ de la placa, con 2 compuestos debajo, al utilizar la combinación Hexano 50%: Acetato 50%.	Ámbar	presenta
VIII	El desplazamiento de los compuestos se observa a $\frac{1}{2}$ de la placa, con 2 compuestos debajo, al utilizar la combinación Hexano 50%: Acetato 50%.	Ámbar	Presenta
IX	El desplazamiento de un compuesto se observa a $\frac{3}{4}$ de la placa, con 2 compuestos debajo, al utilizar la combinación Hexano 50%: Acetato 50%.	Ámbar	No presenta
X	Se observa un compuesto tenue a $\frac{1}{2}$ de la placa, al utilizar la combinación Acetato 80%: Metanol 20%.	Ámbar	No presenta
XI	Se observa un compuesto marcado a $\frac{1}{2}$ de la placa, al utilizar la combinación Acetato 80%: Metanol 20%.	Café	No presenta
XII	Se observa un compuesto tenue a $\frac{1}{2}$ de la placa, al utilizar la combinación Acetato 80%: Metanol 20%.	Café	No presenta
XIII	Se observa un compuesto tenue a $\frac{1}{2}$ de la placa, al utilizar la combinación Acetato 80%: Metanol 20%.	Café	No presenta
XIV	Se observa un compuesto tenue a $\frac{1}{2}$ de la placa, al utilizar la combinación Acetato 80%: Metanol 20%.	Café oscuro	presenta
XV	Se observa un compuesto tenue a $\frac{1}{2}$ de la placa, al utilizar la combinación Acetato 80%: Metanol 20%.	Café oscuro	presenta
XVI	Se observa un compuesto a $\frac{3}{4}$ y otro a $\frac{1}{2}$ de la placa, al utilizar la combinación Acetato 80%: Metanol 20%.	Café	No presenta
XVII	Se observa un compuesto a $\frac{3}{4}$ y otro a $\frac{1}{2}$ de la placa, al utilizar la combinación Acetato 80%: Metanol 20%.	Café	No presenta
XVIII	Se observa un compuesto a $\frac{3}{4}$ y otro a $\frac{1}{2}$ de la placa, al utilizar la combinación Acetato 80%: Metanol 20%.	Café claro	No presenta
XIX	Se observa un compuesto a $\frac{3}{4}$ y otro a $\frac{1}{2}$ de la placa, al utilizar la combinación Acetato 80%: Metanol 20%.	Café claro	No presenta

De las 19 colecciones obtenidas en la segunda cromatografía sólo cuatro (VII, VIII, XIV y XV) mostraron efecto antimicrobiano empleando el método de difusión placa, contra *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*. Para las colecciones VII y VIII las cuales eluyeron de la columna con la combinación de los disolventes Hexano: Acetato de etilo, se observaron halos de inhibición en promedio de 10 mm de diámetro para ambos patógenos. Mientras que para la colección XIV que se obtuvo con la combinación de los disolventes Hexano: Acetato de etilo, se obtuvieron halos de 8 mm de diámetro para *E.coli* y 9 mm para *S. Typhmurium*. Para la colección XV que se obtuvo con Acetato de etilo: Metanol, se observaron halos de inhibición de 9 mm de diámetro para ambos patógenos.

#### **5.4.2 Separación de extractos acetónicos de la planta de estudio B por cromatografía líquida.**

Para estos estudios, se realizó la mezcla de 20 g de extracto acetónico con 10 g de sílica para poder separar por cromatografía líquida. Para esta cromatografía se recuperaron 100 ml por fracción, los cuales fueron evaporados en rota evaporador y posteriormente se depositaron en viales de vidrio. Se obtuvieron 500 fracciones utilizando distintas combinaciones de los disolventes Hexano, Acetato de etilo y Metanol (Tabla 19). De las fracciones obtenidas se procedió a realizar cromatografía en capa fina para determinar su semejanza, obteniendo 11 colecciones (Tabla 20) de las cuales se probó su efecto antimicrobiano mediante la técnica de difusión en placa con discos.

**Tabla 19. Fracciones obtenidas del extracto acetónico de la planta de estudio B**

Fracción	Concentración de solvente
1-21	Hexano 100%
22-54	Hexano 90% : Acetato de etilo 10%
55-122	Hexano 80% : Acetato de etilo 20%
123-162	Hexano 70% : Acetato de etilo 30%
163-206	Hexano 60% : Acetato de etilo 40%
207-280	Hexano 50% : Acetato de etilo 50%

281-314	Hexano 40% : Acetato de etilo 60%
315-341	Hexano 30% : Acetato de etilo 70%
342-382	Hexano 20% : Acetato de etilo 80%
383-410	Hexano 10% : Acetato de etilo 90%
411-455	Acetato 100%
456- 500	Acetato de etilo 90% : Metanol 10%

De las 11 colecciones obtenidas del extracto acetónico solo tres mostraron actividad antimicrobiana (V, VI y VII) contra *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*. La colección V presento halos de inhibición en promedio de 10.5 mm para *E. coli* O157:H7, mientras que para *S. Typhimurium* se observaron halos de 10.17 mm de diámetro. Para la colección VI se observaron halos de inhibición de 15.9 mm y 15.3 mm en promedio, mientras que para la colección VII se obtuvieron halos de inhibición de 16.1 mm y 15.2 mm respectivamente para *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium* (Tabla 21).

**Tabla 20. Algunas características de las colecciones obtenidas del extracto acetónico de la planta de estudio B**

Colección	Fracción en cromatografía en placa fina	Características en vial (color)	Actividad antimicrobiana
I	No hay compuestos visibles	No hay color	No presenta
II	Desplazamiento de compuestos a tres cuartos de la placa con la polaridad 90% Hexano: 10% Acetato de etilo.	Grasa	No presenta
III	Se observa el desplazamiento de cinco compuestos hasta a tres cuartos de la placa, empleando la polaridad 80% Hexano: 20% Acetato de etilo.	Precipitado Blanco	No presenta
IV	El desplazamiento a mayor distancia observado fue a tres cuartos de la placa, además de otros tres que se observan por debajo del primer cuarto, esto con la polaridad 80% Hexano: 20% Acetato de etilo.	Líquido Amarillo	No presenta

V	Con la polaridad 80% Hexano: 20% Acetato de etilo, se observa un compuesto a tres cuartos de la placa y otros dos por debajo del primer cuarto.	Amarillo	presenta
VI	Se observa un compuesto en el tercer cuarto de la placa y dos compuestos por debajo del primero, cuando se utiliza la polaridad 70% Hexano: 30% Acetato de etilo.	Ámbar	presenta
VII	Empleando la polaridad 70% Hexano: 30% Acetato de etilo se observan dos compuestos a la mitad de la placa y un tercero aparece en el primer cuarto.	Ámbar	presenta
VIII	En el primer tercio de la placa se observan tres compuestos, con la polaridad 70% Hexano: 30% Acetato de etilo.	Ámbar	No presenta
IX	Se observan cuatro compuestos en el primer tercio de la placa con la polaridad 30% Hexano: 70% Acetato de etilo.	Ámbar	No presenta
X	Son observables tres compuestos por debajo de la mitad de la placa cuando se emplea acetato de etilo.	Ámbar	No presenta
XI	Al emplearse la polaridad 90% Acetato: 10% Metanol, se observan cuatro compuestos por debajo de la primera mitad de la placa.	Ámbar	No presenta

**Tabla 21. Promedio de los halos de Inhibición (mm) de las colecciones cromatográficas de la planta de estudio B (extracto acetónico)**

Colección	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>
I	0	0
II	0	0
III	0	0
IV	0	0
V	10.5±0.18	10.17±0.27
VI	15.9±0.56	15.34±1.60
VII	16.1±0.51	15.21±0.55
VIII	0	0
IX	0	0
X	0	0
XI	0	0

El efecto antimicrobiano que presentaron tanto los extractos como las distintas fracciones cromatográficas de metanol y acetona, puede ser debido a un gran número de compuestos posiblemente distintos. No se ha reportado cuales son los compuestos específicos responsables del efecto antimicrobiano de la planta de estudio B; tampoco se conoce con exactitud todos los compuestos químicos que contiene la planta de estudio B. Es por ello que se planteó como objetivo el identificar alguna de las moléculas responsables del efecto antimicrobiano observado en la planta B.

## **5.5 Identificación de compuestos activos por RMN**

Inicialmente se obtuvieron los espectros de los extractos metanólico y de acetona, donde las señales aparecen como desplazamientos químicos respecto a un estándar (generalmente el TMS que aparece en cero ppm), la escala está representada en la escala  $\delta$  (delta), donde un  $\delta$  equivale a 1 ppm (partes por millón). La escala donde aparecen mayoría de las señales de protones ( $^1\text{H}$ ) varían entre 0 y 12 ppm, mientras que el intervalo para el carbono ( $^{13}\text{C}$ ) es más grande, de 0 a 250 ppm.

### **5.5.1 Espectro del extracto metanólico de la planta B en estudio**

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz del extracto metanólico de la planta B (Figura 6), se observa a 2.5 ppm como un quinteto la señal correspondiente al disolvente (DMSO- $d_6$ ). Cerca de 1.2 ppm se observa una señal de protones de alcanos (metilos y metilenos), aunque por la intensidad parece ser parte de la grasa de la planta. Cerca de 2 ppm aparece una señal simple intensa característica de metilos de cetonas, mientras que las señales pequeñas observadas en la región de 2.5 a 3.0 ppm pertenecen a hidrógenos cercanos a carbonilos o bien en carbonos base de hidroxilos. Para la región de 3 a 4 ppm aparecen señales características de los hidrógenos en carbono unido a oxígeno (H-C-OR) donde generalmente aparecen los carbohidratos y las cinco señales que aparecen de 4.5 a 6.5 ppm corresponden a los protones de alquenos.

### **5.5.1.1 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la colección VI del extracto metanólico de la planta B**

En el espectro de RMN de protón correspondiente a la colección VI del extracto metanólico de la planta B (Figura 7), se observa a 2.5 ppm la señal del disolvente (DMSO- $d_6$ ), mientras que se observa un par de señales dobles en la región de 2.6 a 3.2 ppm pertenecientes a hidrógenos cercanos a carbonilos y características de un sistema AB. Las señales que aparecen cerca de 3.7 y 3.8 ppm pertenecen a los protones de metilos ya que se observan como señales simples intensas. Por último cerca de 5.2 ppm se distinguen señales simples propias de protones vinílicos.

### **5.5.1.2 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de la colección VI del extracto metanólico de la planta B**

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  que corresponde a la colección VI del extracto metanólico de la planta B (Figura 8) se observa la señal que se presenta como un septeto a 39.5 ppm pertenece al disolvente de referencia (DMSO- $d_6$ ). Las señales que aparecen en 41.5 ppm, 52.4 ppm, 53.1 ppm, 77.9 ppm y 81.9 ppm pertenecen a carbonos cuaternarios, terciarios, secundarios o primarios, los cuales pueden estar unidos a oxígeno, Nitrógeno o Azufre. Mientras que las señales que aparecen en 166.1 ppm, 170.8 ppm y 172.7 ppm pertenecen a grupos carbonilo de éster, amida o ácidos.

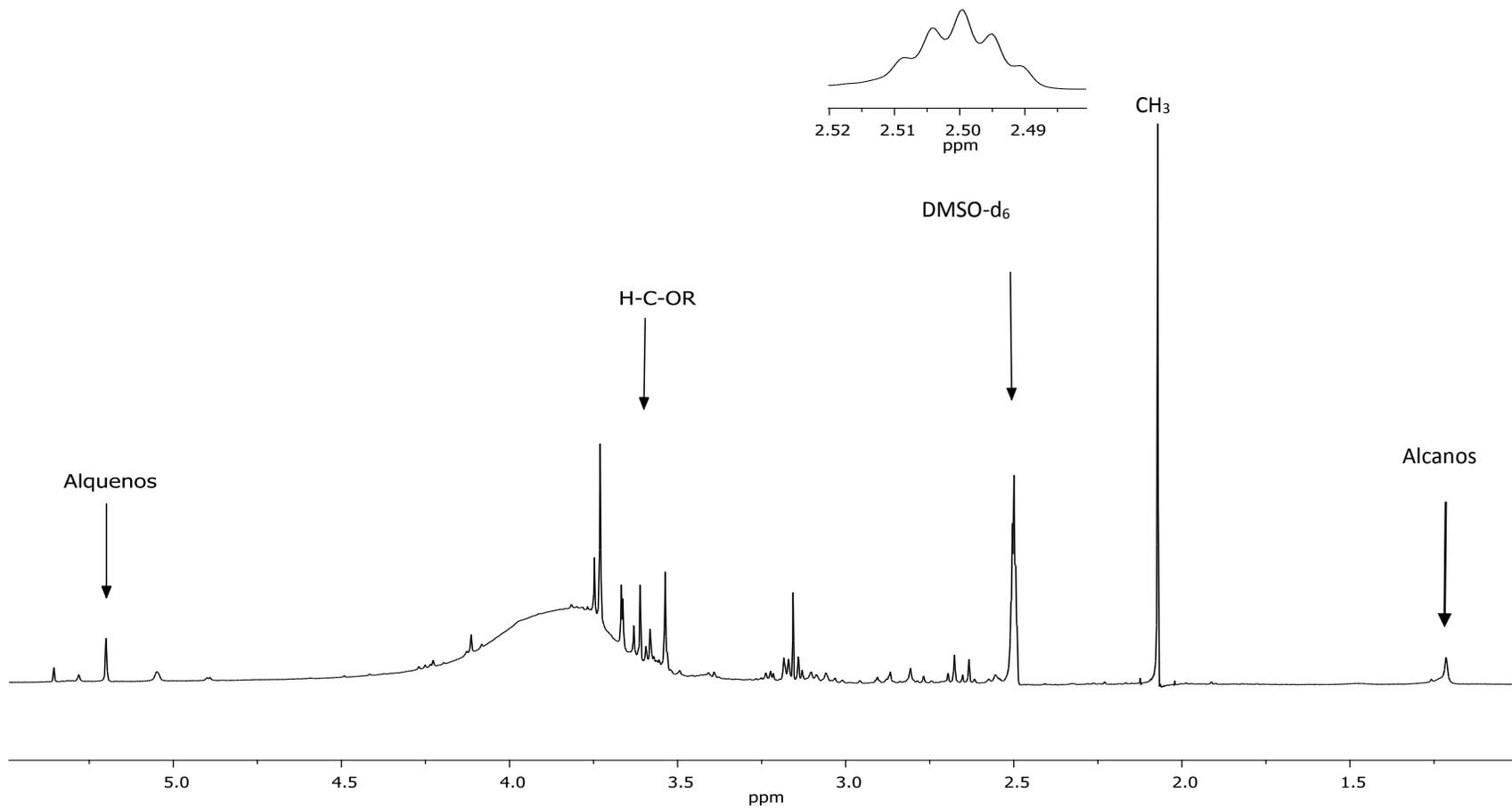


Figura 6. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{DMSO-d}_6$  del extracto metanólico de la Planta B

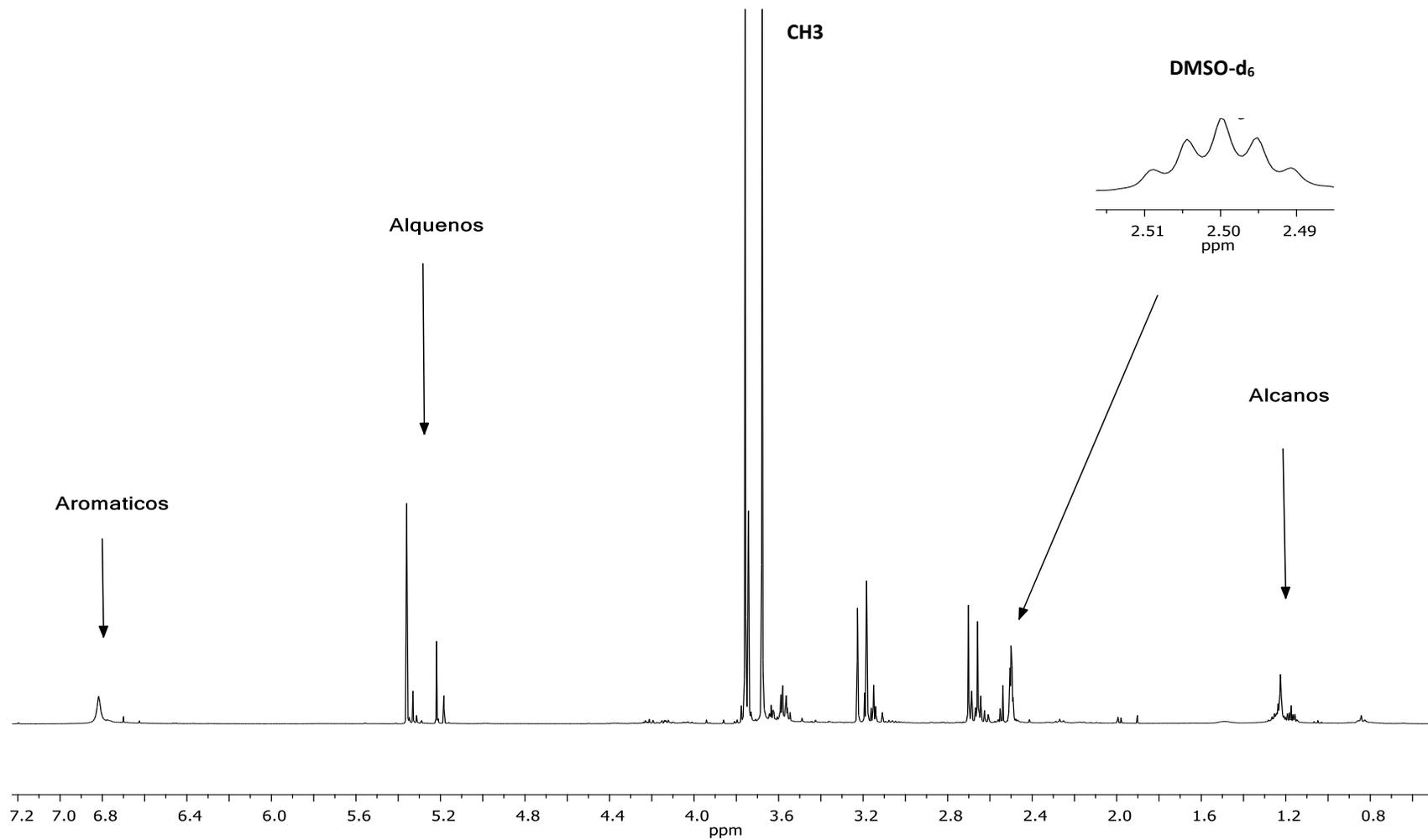
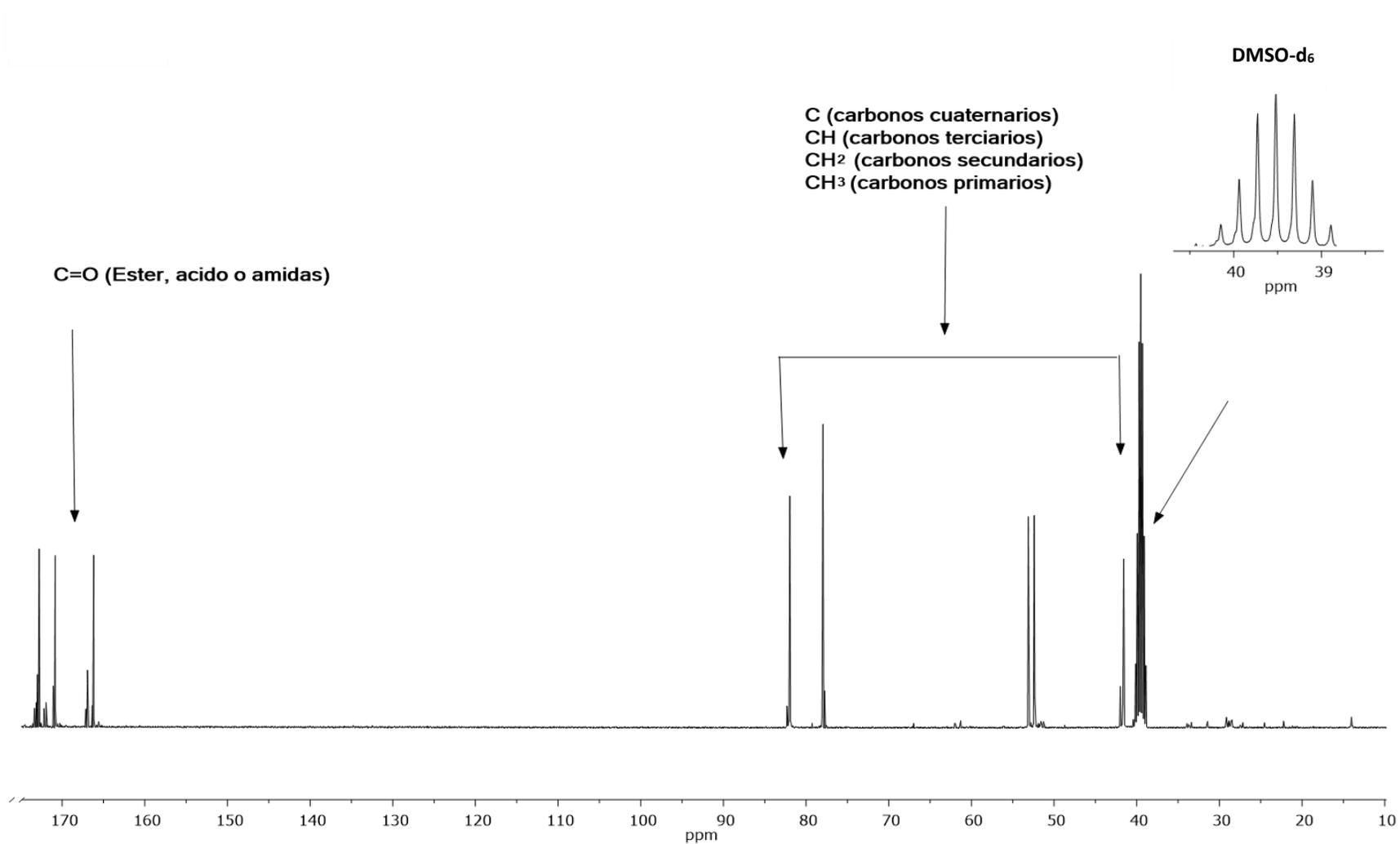


Figura 7. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{DMSO-d}_6$  de la colección VI del extracto metanólico de la planta B



**Figura 8. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C a 400 MHz en DMSO-d<sub>6</sub> de la colección VI del extracto metanólico de la planta B**

### **5.5.1.3 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de las colección VIII del extracto metanólico de la planta B**

En el espectro de protón de la colección VIII del extracto metanólico de la planta B (Figura 9), se observa la señal correspondiente al disolvente de referencia (DMSO- $\text{d}_6$ ) a 2.5 ppm. Las señales que aparecen de 2.6 a 3.2 ppm son características de hidrógenos en carbono alfa al carbonilo y las que aparecen en 3.4-3.8 corresponden a hidrógenos unidos a metilos o metilenos unidos a hidroxilos o éteres ( $\text{H-C-OR}$ ). Mientras que las señales de la región comprendida de 5.1 a 5.4 ppm corresponden a protones de alquenos y la señal amplia que aparece 6.8 ppm corresponde a un hidroxilo (OH) que bien puede ser de agua.

### **5.5.1.4 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la colección XIII del extracto metanólico de la planta B**

En el espectro perteneciente a la colección XIII (Figura 10), se observan dos señales de referencia, una señal simple perteneciente al Tetrametilsilano (TMS) en 0 ppm y la segunda en 2.5 ppm perteneciente al DMSO- $\text{d}_6$ . Las señales que se observan de 0.5 ppm a 2 ppm pertenecen a protones de alcanos. Mientras que las que se observan de 3.0 ppm a 4.5 ppm pertenecen a hidrógenos en carbono unido a oxígeno (H-C-OR). Aquellas señales que se presentan de 5 ppm a 5.5 ppm corresponden a alquenos y de 6.0 ppm a 8.5 ppm son señales de protones para compuestos aromáticos.

### **5.5.1.5 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la colección XVIII del extracto metanólico de la planta B**

El espectro de la colección XVIII (Figura 11) del extracto metanólico de planta B en estudio, muestra señales con poca intensidad de 0.5 a 2.0 ppm las cuales son características de alcanos. En la región comprendida de 3.0 a 4.2 ppm se observan señales un poco más intensas, las cuales corresponden a hidrógenos en carbono unido a oxígeno (H-C-OR) donde puede haber metilos tipo éster o éter. De igual forma se observan señales correspondientes a protones de alquenos en la región comprendida de 5.0 a 5.3 ppm, mientras que en la región

de los protones correspondientes a los grupos aromáticos se observan señales con baja intensidad de 6.5 a 7.9 ppm.

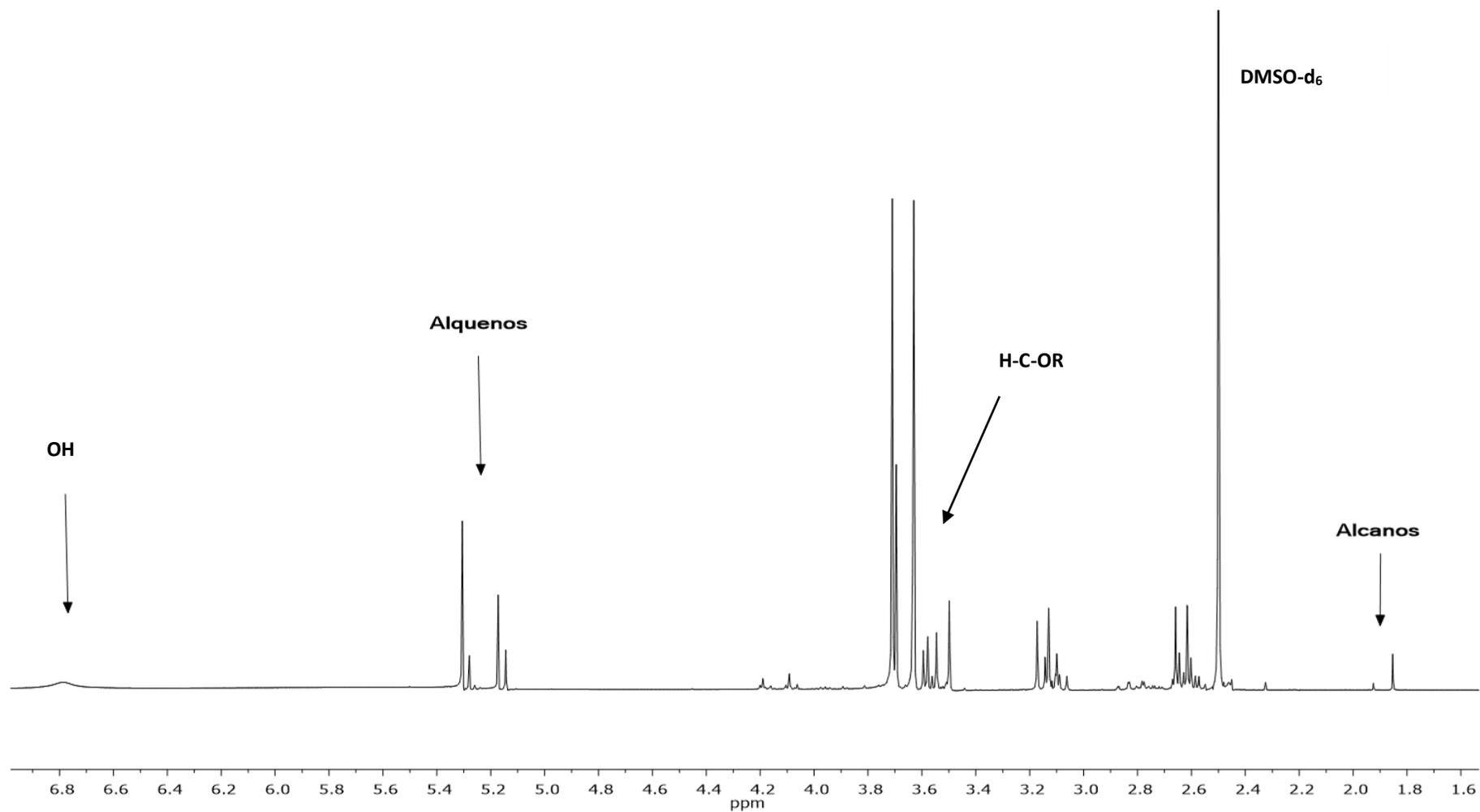


Figura 9. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{DMSO-d}_6$  de la colección VIII del extracto metanólico de la planta B

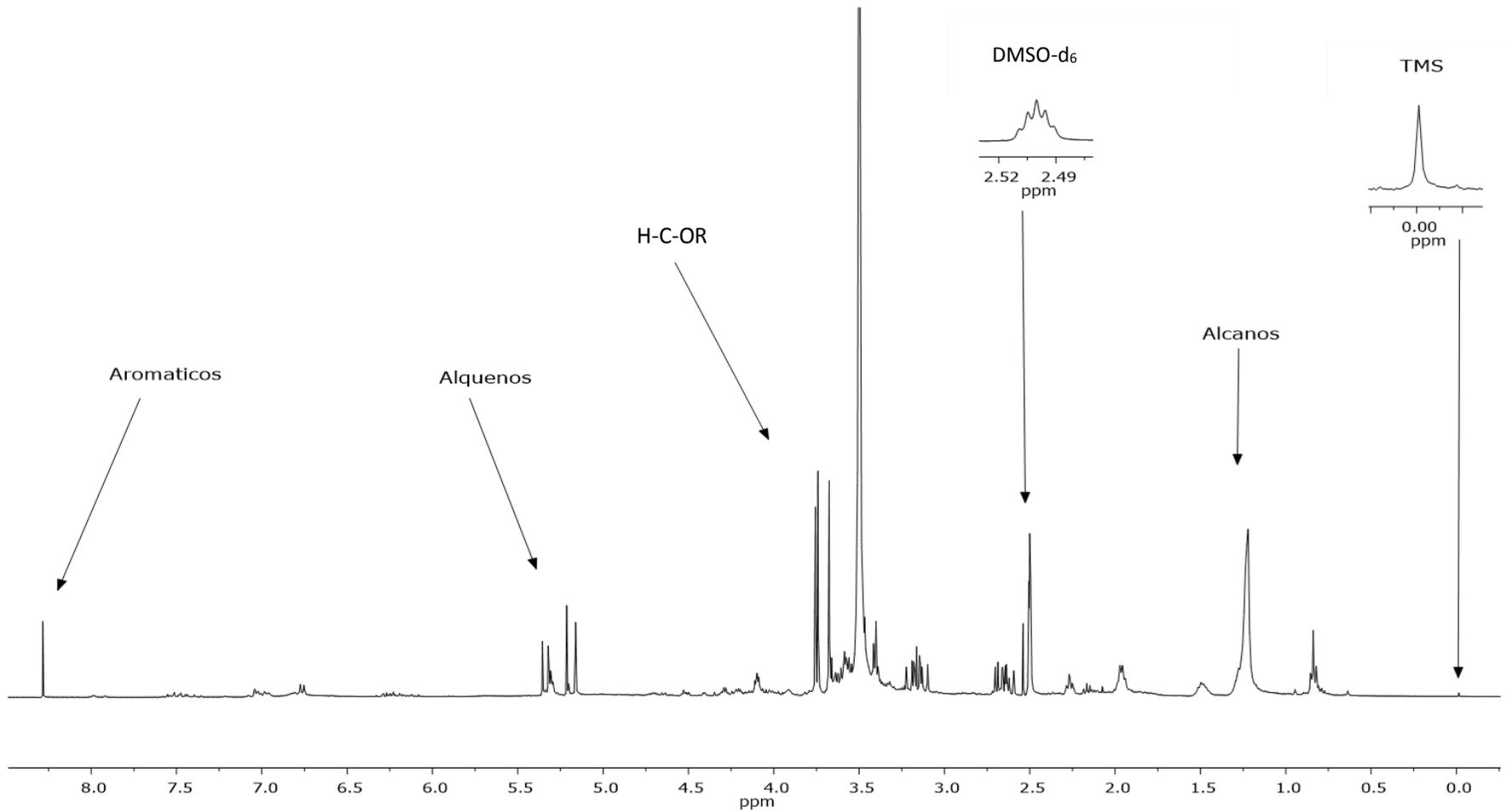


Figura 10. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en DMSO-d<sub>6</sub> de la colección XIII del extracto metanólico de la planta B

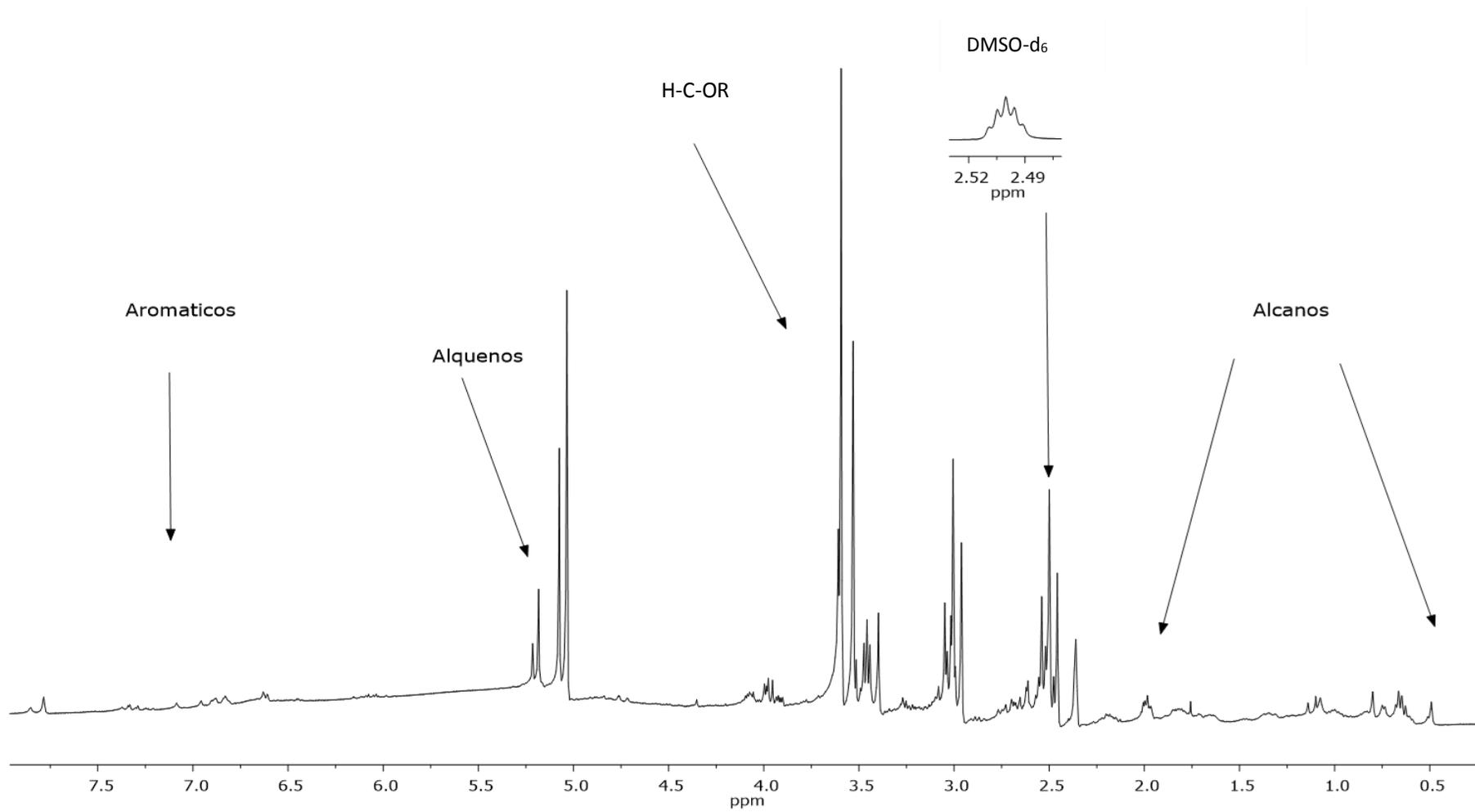


Figura 11. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{DMSO-d}_6$  de la colección XVIII del extracto metanólico de la planta B

#### **5.5.1.6 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la colección VII (recromatografía) del extracto metanólico de la planta B**

La colección VII de la recromatografía del extracto metanólico de la planta B se disolvió en DMSO- $d_6$  (2.5 ppm) para su estudio en el equipo de RMN. Las señales que se presentan de la región comprendida entre 1.1 y 1.27 ppm (Figura 12), pertenecen a protones de metilos y metilenos de hidrocarburos. Cerca de 2.6 se observan señales múltiples que pueden ser de hidrógenos alfa a carbonilos. En la región comprendida de 3.0 a 4.0 ppm se observan señales correspondientes a hidrógenos en carbono unido a oxígeno donde las que aparece como señales simples pueden ser de metilos. Mientras que de 4.3 a 4.9 ppm aparece una señal ancha la cual es característica de protones pertenecientes a grupos hidroxilo (OH) y las señales que aparecen de 5.15 a 5.32 ppm pertenecen a los protones de alquenos.

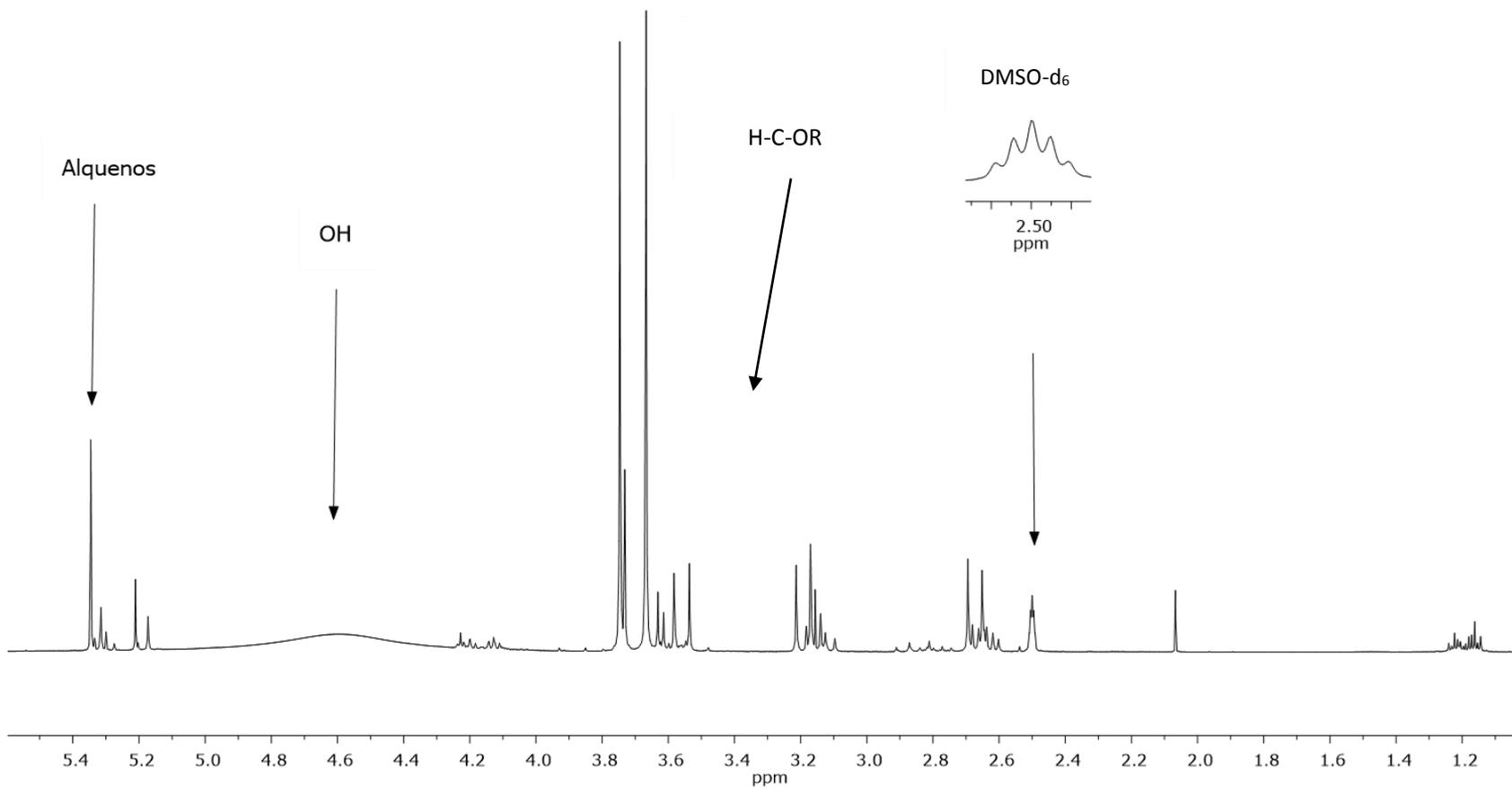
#### **5.5.1.7 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la colección VIII (recromatografía) del extracto metanólico de la planta B**

En el espectro de la colección VIII de la recromatografía del extracto metanólico de la planta de B (Figura 13), muestra grupos de señales que indica una mezcla de compuestos isoméricos como es en la región cerca de 2.6, 3.2 y 3.6 ppm además de las tres señales intensas de hidrógenos en carbono unido a oxígeno (H-C-OR) en la región comprendida de 3.7 a 3.8 ppm que podrían indicar la presencia de grupos metoxi. Mientras que en la región de 5.17 a 5.32 ppm se observan cuatro señales simples las cuales corresponden a protones de alquenos mismas que se desconoce si están acopladas o no. También se observan señales de baja intensidad muestra de otros compuestos minoritarios cerca de 2.8 y 4.2 ppm.

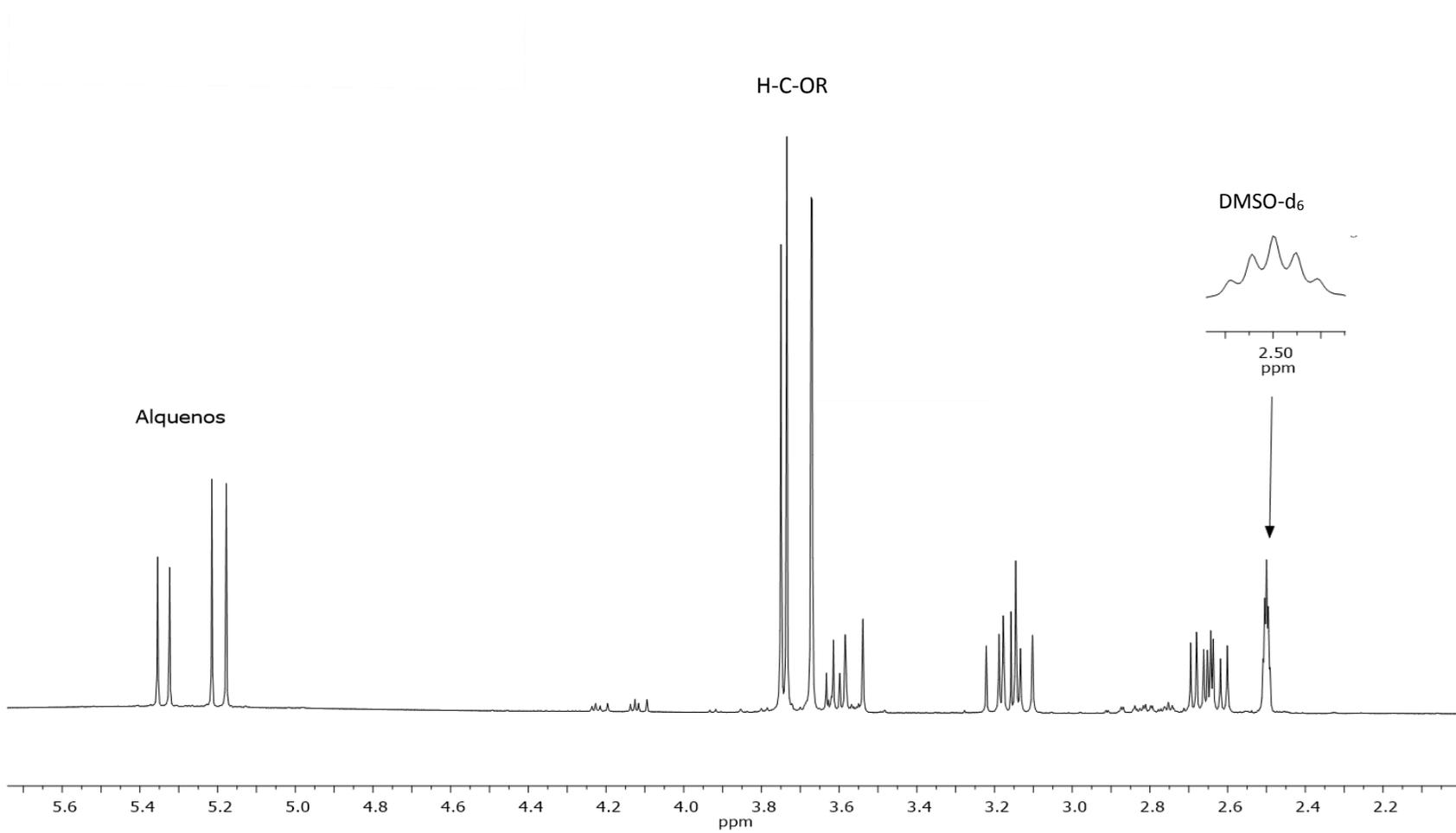
#### **5.5.1.8 Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de la colección XIV y XV de la recromatografía del extracto metanólico de la planta B**

En la figura 14 se presentan los espectros pertenecientes a la colección XIV (arriba) y XV (abajo), ambas disueltas en DMSO- $d_6$  para su análisis en el equipo de RMN. Para ambas colecciones se observan señales de protones

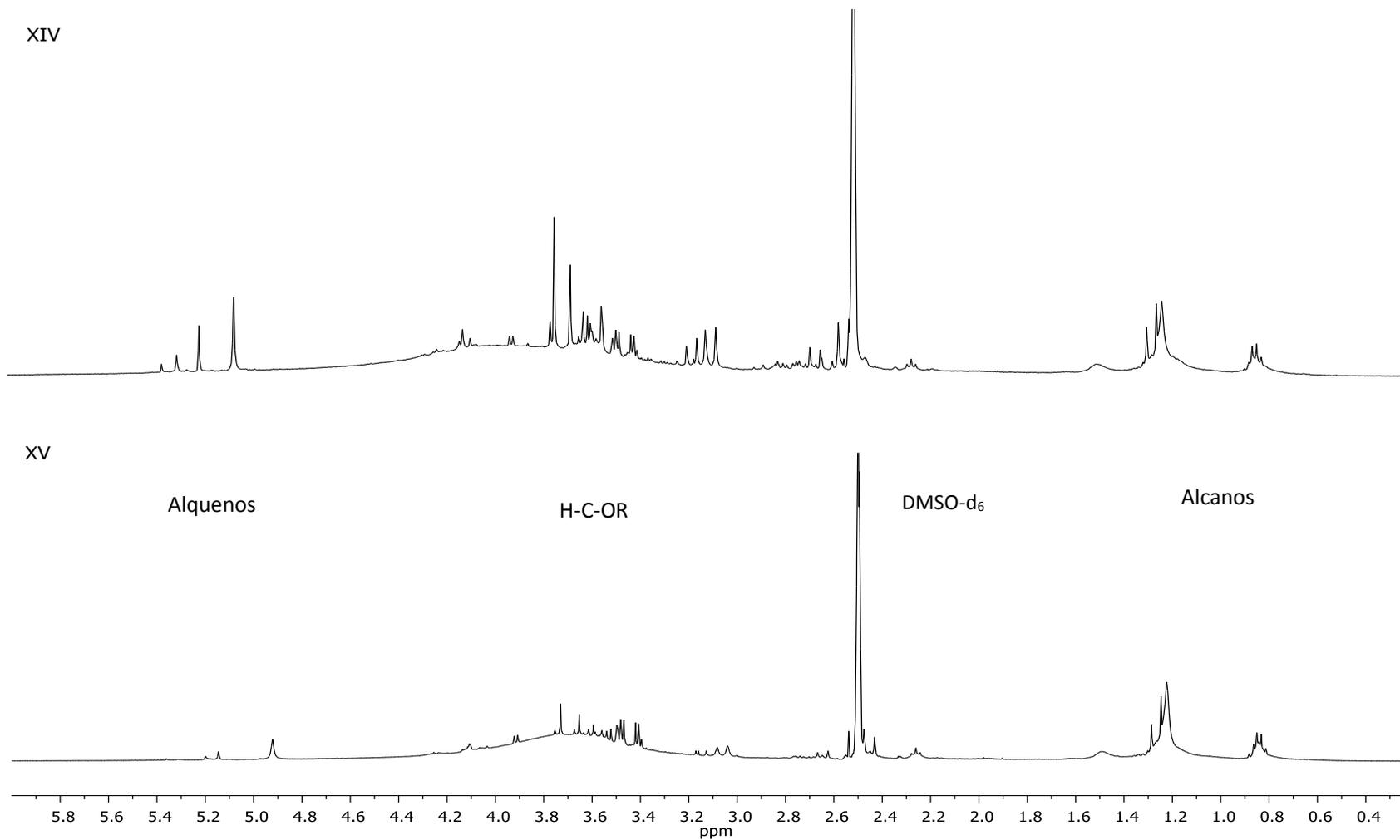
pertenecientes a alcanos en la región comprendida de 0.8 a 1.6 ppm, de igual forma se observan señales de 3.4 a 4.8 ppm las cuales corresponden a hidrógenos en carbono unido a oxígeno (H-C-OR). Mientras que las señales que aparecen de 4.9 a 5.4 ppm corresponden a protones de alquenos. Se concluye que las dos fracciones tienen los mismos componentes sólo que en diferente relación.



**Figura 12. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{DMSO-d}_6$  de la colección VII (recromatografía) extracto metanólico de la planta B**



**Figura 13. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en DMSO- $\text{d}_6$  de la colección VIII (recromatografía) extracto metanólico de la planta B**



**Figura 14. Espectros de RMN de <sup>1</sup>H a 400 MHz en DMSO-d<sub>6</sub> de la colección XIV y XV (recromatografía) extracto metanólico de la planta B**

## 5.5.2 Compuesto aislado del extracto metanólico de la planta B en estudio

Para la obtención del compuesto 1 se realizó un proceso de cristalización en el cual la colección VII fue colocada en acetato de etilo (disolvente en el cual solubilizo la colección), posteriormente se colocó en un embudo de separación y se adicióno hexano, para dejar en reposo por 24 h. Trascurrido dicho periodo se observó la formación de cristales sobre la pared del embudo de separación, decantando el líquido (agua madre) y recuperando los cristales, los cuales fueron analizados por las técnicas de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) e IR (espectroscopia de radiación Infrarroja) además de evaluar su punto de fusión por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

### 5.5.2.1 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del compuesto 1

El espectro de RMN de protón del compuesto 1 (Figura 15 y 16), se obtuvo con el disolvente  $\text{CDCl}_3$  con TMS (Tetrametilsilano) como referencia interna. La señal simple que se observa a 5.14 ppm (1H, s, RO-**CH**-COOMe) pertenece a un protón ubicado en la posición  $\alpha$  al éster en un carbono con oxígeno. En 3.95 ppm (3H, s, CH-CO**OMe**) se presenta una señal simple la cual integra para 3 hidrógenos pertenecientes a un grupo metilo. Mientras que la señal simple en 3.84 ppm (3H, s, COH-CO**OMe**) corresponde para un segundo grupo metilo. En 3.09 ppm (1H, d,  $J=17.5$  Hz,  $\text{H}_a\text{H}_b\text{C}-\text{C}=\text{O}$ ) se observa una señal doble la cual corresponde al hidrógeno en la posición  $\alpha$  unido a un grupo éster. La señal doble en 2.88 ppm (1H, d,  $J=17.5$  Hz,  $\text{H}_a\text{H}_b\text{C}-\text{C}=\text{O}$ ) corresponde al hidrógeno en la posición  $\alpha$  unido a un grupo éster. Mientras que en 1.86 ppm se observa una señal amplia la cual corresponde al protón del grupo hidroxilo (1H, s, **COH**-COOMe) (Tabla 22). El espectro de la figura 15 corresponde a la muestra obtenida de la planta B, mientras que el de la figura 16 corresponde a una muestra determinada previamente y que se reporta en la literatura, ambos espectros son muy similares.

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1, ayudo a determinar la estructura, encontrando carbonos unidos a grupos hidroxilo (OH) en la región comprendida de 75 a 80 ppm, carbonos de esterés en la región que abarca de 165 ppm a 175

ppm, así como de carbonos pertenecientes a grupos metilo localizados en la región de 50ppm a 55ppm.

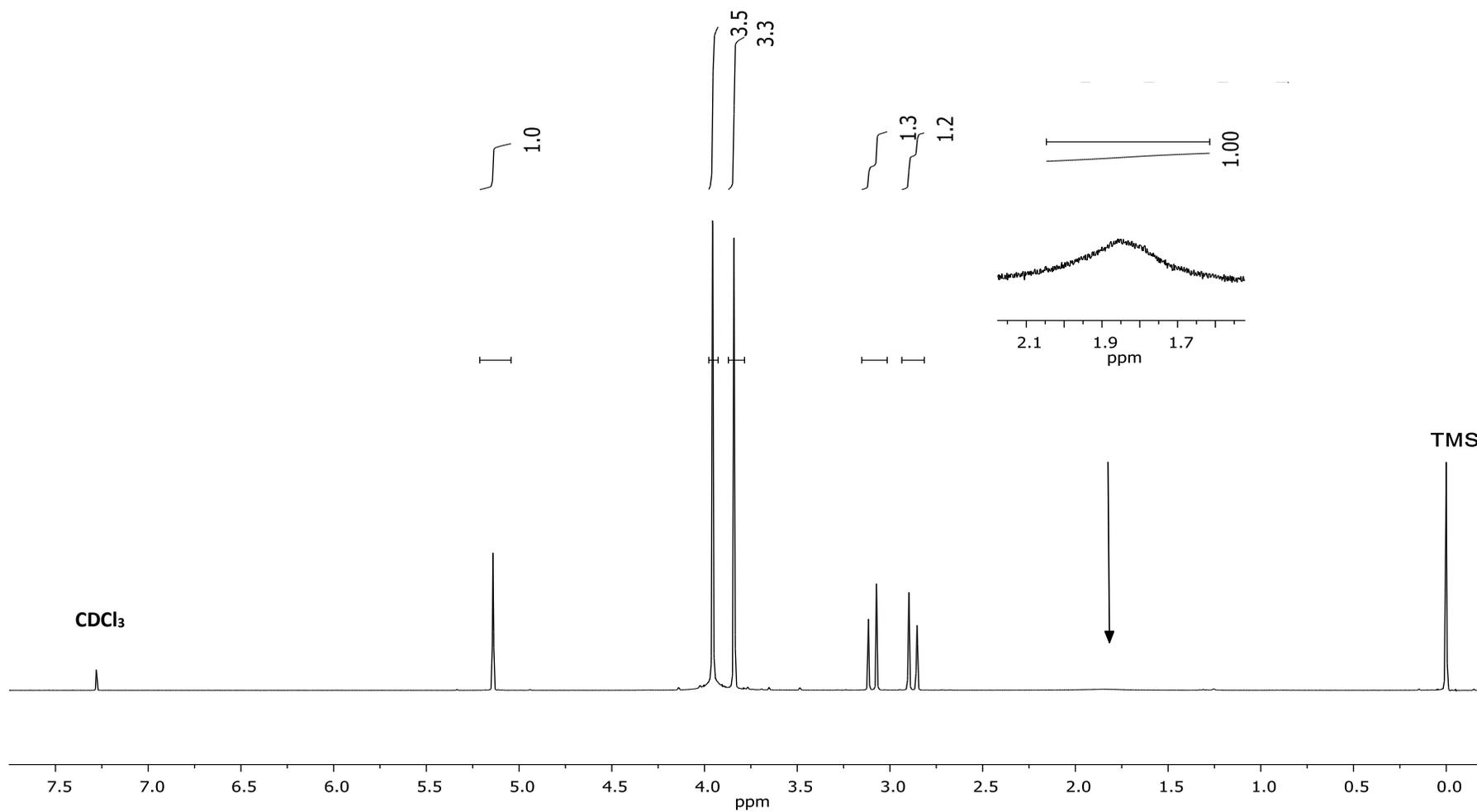


Figura 15. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 1 (extracto metanólico) de la planta B

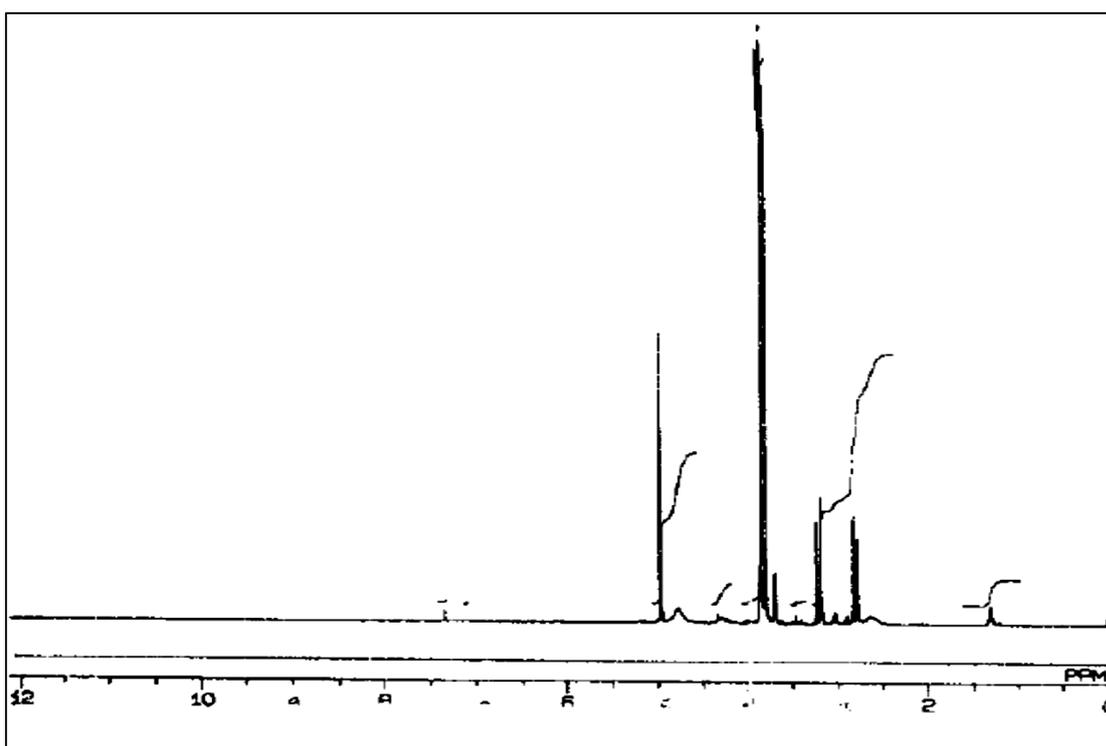


Figura 16. Espectro de referencia de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 1

Tabla 22. Señales de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz del compuesto 1

Posición	Diastereoisómero del compuesto 1 ( $\text{CDCl}_3$ )	Compuesto 1 ( $\text{CDCl}_3$ )	Compuesto 1
			Experimental ( $\text{CDCl}_3$ )
2	4.96 (1H, s, <i>CH</i> -COOMe)	5.31 (1H, s, <i>CH</i> -COOMe)	5.14 (1H, s, <i>CH</i> -COOMe)
Me	3.82 (3H, s, <i>CH</i> -COOMe)	3.95(3H, s, <i>CH</i> -COOMe)	3.95 (3H, s, <i>CH</i> -COOMe)
Me	3.78 (3H, s, COH-COOMe)	3.84 (3H, s, COH-COOMe)	3.84 (3H, s, COH-COOMe)
4-a	3.20 (1H,d, $J=19.0$ Hz, $H_aH_b\text{C}-\text{C}=\text{O}$ )	3.10 (1H,d, $J=20.3$ Hz, $H_aH_b\text{C}-\text{C}=\text{O}$ )	3.09 (1H,d, $J=17.5$ Hz, $H_aH_b\text{C}-\text{C}=\text{O}$ )
4-b	2.82 (1H,d, $J=19.0$ Hz, $H_aH_b\text{C}-\text{C}=\text{O}$ )	2.87 (1H,d, $J=20.3$ Hz, $H_aH_b\text{C}-\text{C}=\text{O}$ )	2.88 (1H,d, $J=17.5$ Hz, $H_aH_b\text{C}-\text{C}=\text{O}$ )

### **5.5.2.2 IR del Compuesto 1**

En el espectro de Infrarrojo (Figura 17 y 18) la señal que aparece a  $3527\text{ cm}^{-1}$  con una transmitancia de 0.5916 pertenece al grupo OH, ya que las bandas características de la absorción infrarroja para los alcoholes casi siempre están en el intervalo de  $3400$  a  $3650\text{ cm}^{-1}$ . La banda de absorción infrarroja a  $1798\text{ cm}^{-1}$  con una transmitancia de 0.2725 corresponde a un grupo éster. Mientras que la banda en  $1741\text{ cm}^{-1}$  con transmitancia de 0.1170 corresponde al estiramiento de C=O, ya que los grupos carbonilo absorben en el intervalo de  $1670$  a  $1750\text{ cm}^{-1}$ . El espectro de la figura 17 corresponde a la muestra obtenida de la planta B, mientras que el de la figura 18 corresponde a una muestra determinada previamente y que se reporta en la literatura, ambos espectros son similares para las señales mencionadas arriba.

### **5.5.2.3 Punto de fusión por calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Para el compuesto 1 el DSC registró una temperatura de inicio ( $T_o$ ) de  $124.16\text{ }^{\circ}\text{C}$ , observando una temperatura de pico ( $T_p$ ) de  $128\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una temperatura final ( $T_e$ ) de  $129.54\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El valor de energía de fusión ( $\Delta H$ ) de  $120.78\text{ J/g}$ , que es la cantidad de energía necesaria para que un gramo del compuesto 1 pase del estado sólido a líquido.

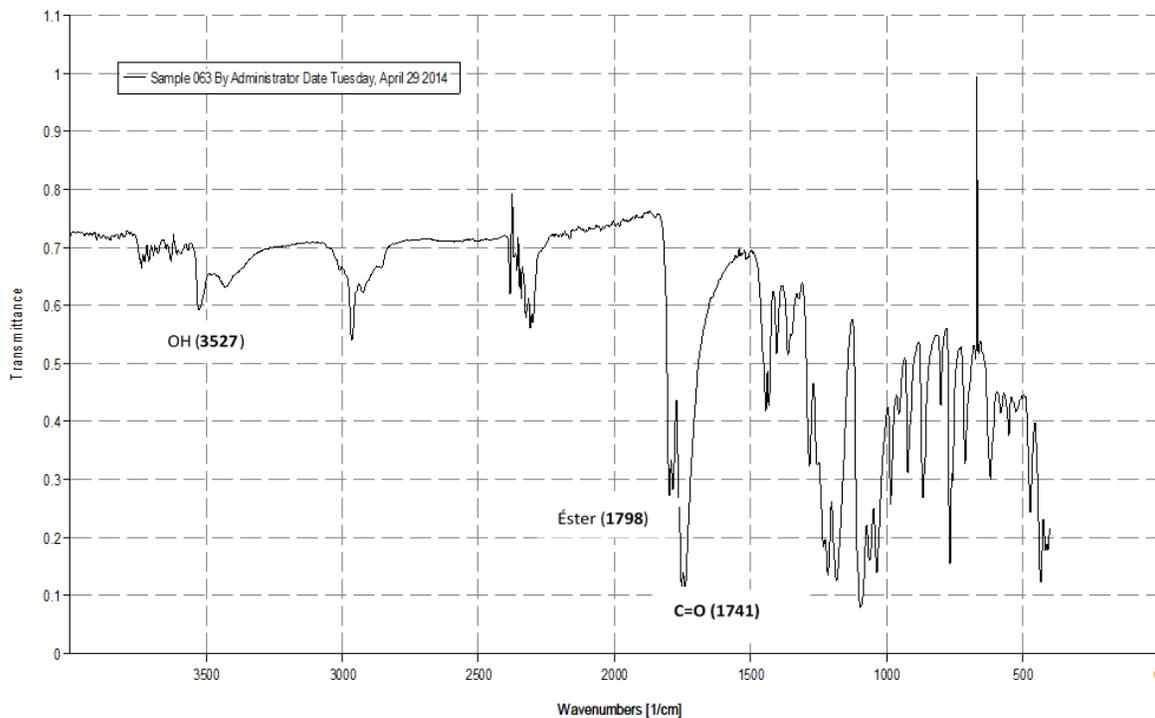


Figura 17. Espectro de IR del compuesto 1

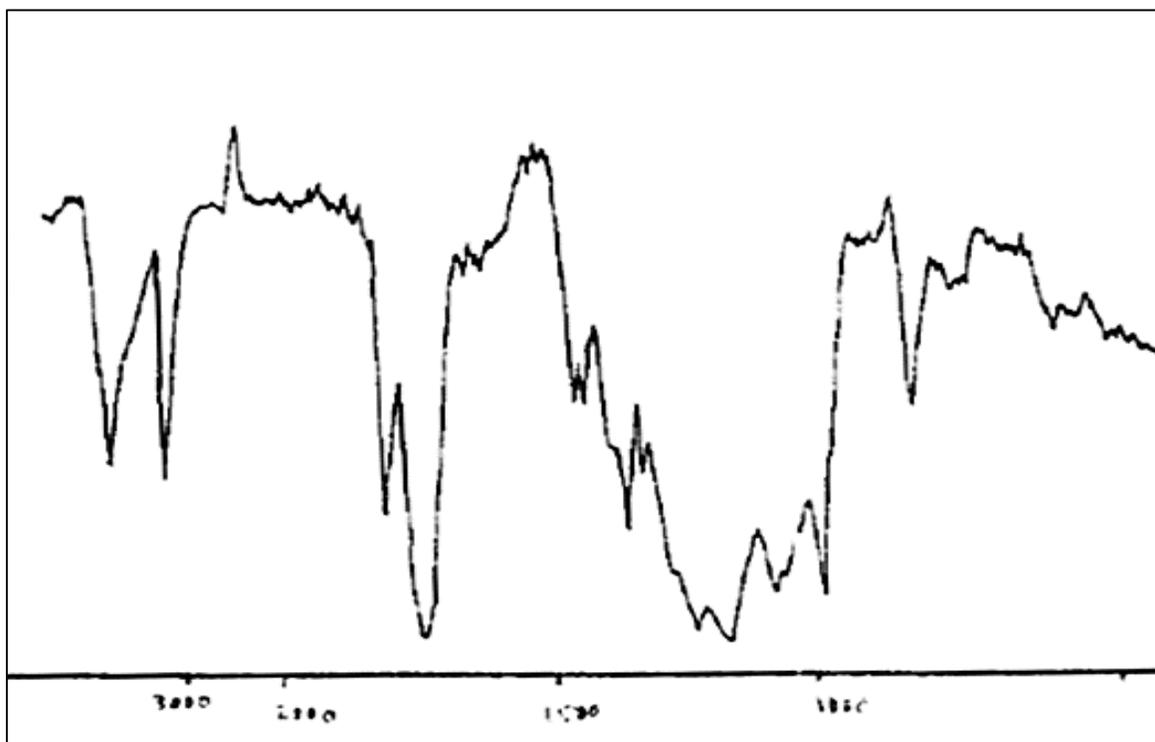


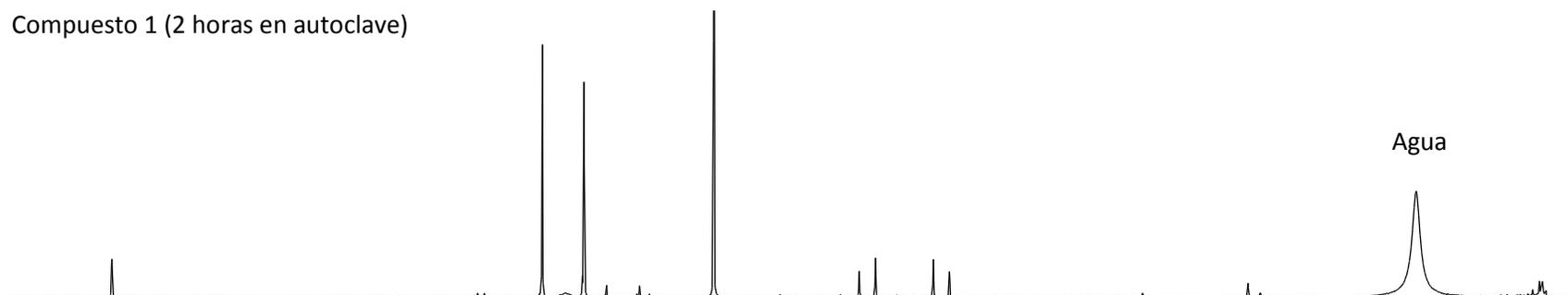
Figura 18. Espectro de referencia de IR del compuesto 1

#### 5.5.2.4 Espectros de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz del compuesto 1 (Tratamiento térmico)

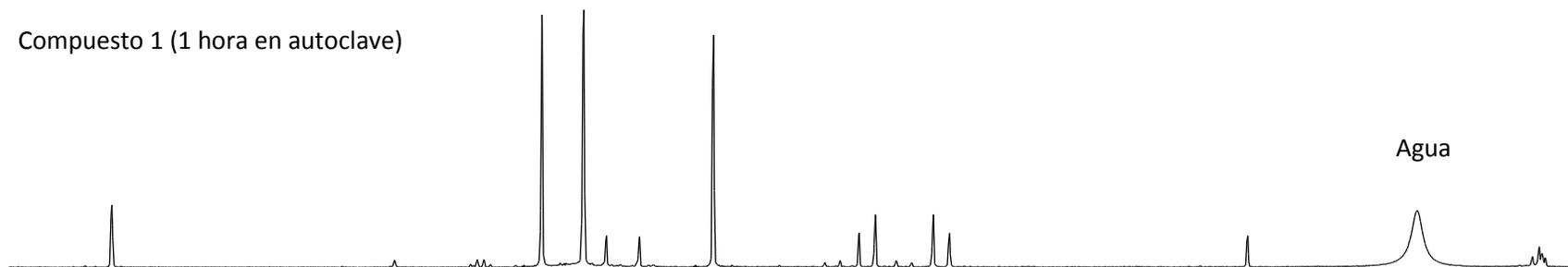
El compuesto 1, aislado a partir del extracto metanólico de la planta B no presento actividad antimicrobiana en las pruebas *in vitro*, hasta que se sometió a condiciones de esterilización por 1 y 2 h. Por ello se obtuvieron los espectros de protón en estos tiempos y se compararon con el compuesto puro (sin tratamiento térmico) (Figura 19). Las señales que aparecen para el compuesto puro a 5.14, 3.95, 3.84, 3.09 y 2.88 ppm también están presentes en los espectros del compuesto sometidos a tratamiento térmico para ambos tiempos. Sin embargo las muestras sometidas a calentamiento húmedo y presión presentan mayor intensidad para las señales que aparecen de 1.24 a 1.29 ppm, en 1.59, 2.05, 2.95, 3.0, 3.15, 3.19, 3.69 y 3.78 ppm. Dicho cambio en la intensidad puede ser causado por las condiciones de humedad, presión y temperatura. Se observa que con el calentamiento el compuesto no sufrió cambios significativos en los tres espectros.

Compuesto 1 (2 horas en autoclave)

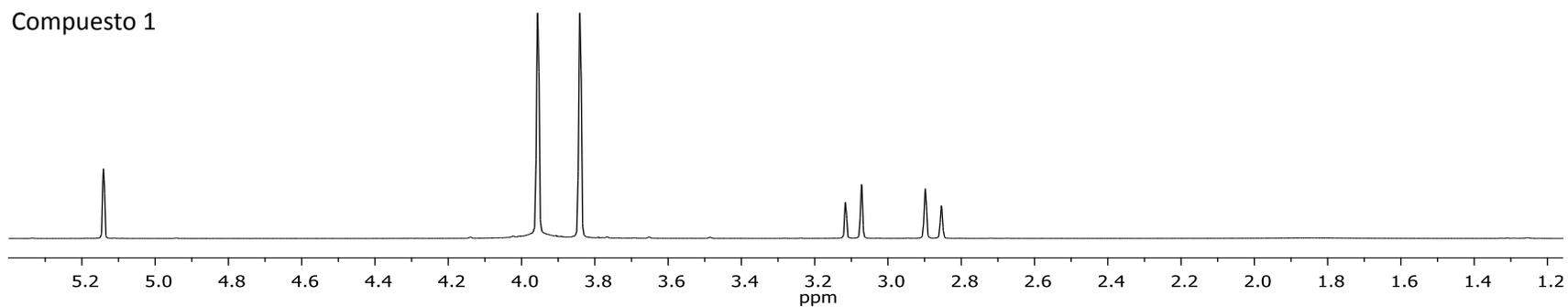
7



Compuesto 1 (1 hora en autoclave)



Compuesto 1



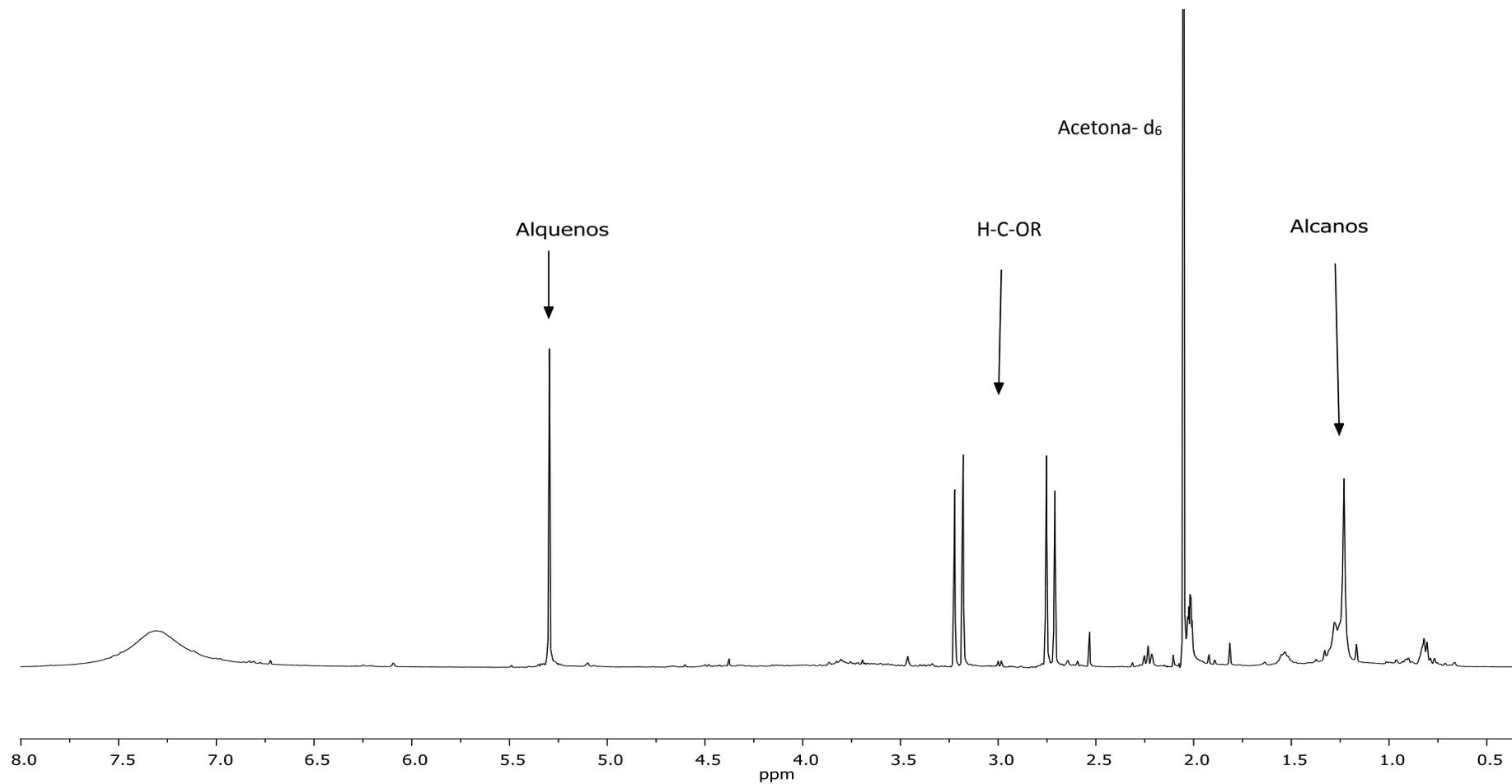
**Figura 19. Espectros comparativos de RMN de <sup>1</sup>H a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub> del Compuesto 1 normal y con tratamiento térmico a una y dos horas**

### 5.5.3 Espectro de RMN del extracto Acetónico de la planta B en estudio

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz del extracto acetónico de la planta B (Figura 20), se observa a 2.05 ppm la señal correspondiente al disolvente (Acetona- $\text{d}_6$ ). En la región comprendida de 0 a 1.5 ppm se observan los protones de alcanos (metilos y metilenos). En la región de 2.6 a 3.3 ppm se observa un par de señales dobles pertenecientes a hidrógenos cercanos a carbonilos y características de un sistema AB. Por último la señal que aparecen 5.34 ppm corresponde a un protón ubicado en la posición  $\alpha$  al éster en un carbono con oxígeno.

#### 5.5.3.1 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la colección VI (compuesto 2)

El espectro de RMN de protón del compuesto 2 (Figura 21), se obtuvo con el disolvente Acetona- $\text{d}_6$ . La señal simple que se observa a 5.34 ppm (1H, s, RO-**CH**-COOH) pertenece a un protón ubicado en la posición  $\alpha$  al éster en un carbono con oxígeno. En 3.25 ppm (1H, d,  $J = 17.2$  Hz,  $\text{H}_a\text{H}_b\text{C}=\text{C}=\text{O}$ ) se observa una señal doble la cual corresponde al hidrógeno en la posición  $\alpha$  unido a un grupo éster. La señal doble en 2.80 ppm (1H, d,  $J = 17.2$  Hz,  $\text{H}_a\text{H}_b\text{C}=\text{C}=\text{O}$ ) corresponde al hidrógeno en la posición  $\alpha$  unido a un grupo éster. Mientras que en 4.16 ppm se observa una señal amplia la cual corresponde al protón del grupo hidroxilo (1H, s, **COH**-COOH) (Tabla 23). El espectro de la figura 21 corresponde a la muestra obtenida de la planta B, mientras que el de la figura 22 corresponde a una muestra determinada previamente que se reporta en la literatura, ambos espectros son similares.



**Figura 20. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en Acetona- $\text{d}_6$  del extracto acetónico la planta de estudio B**

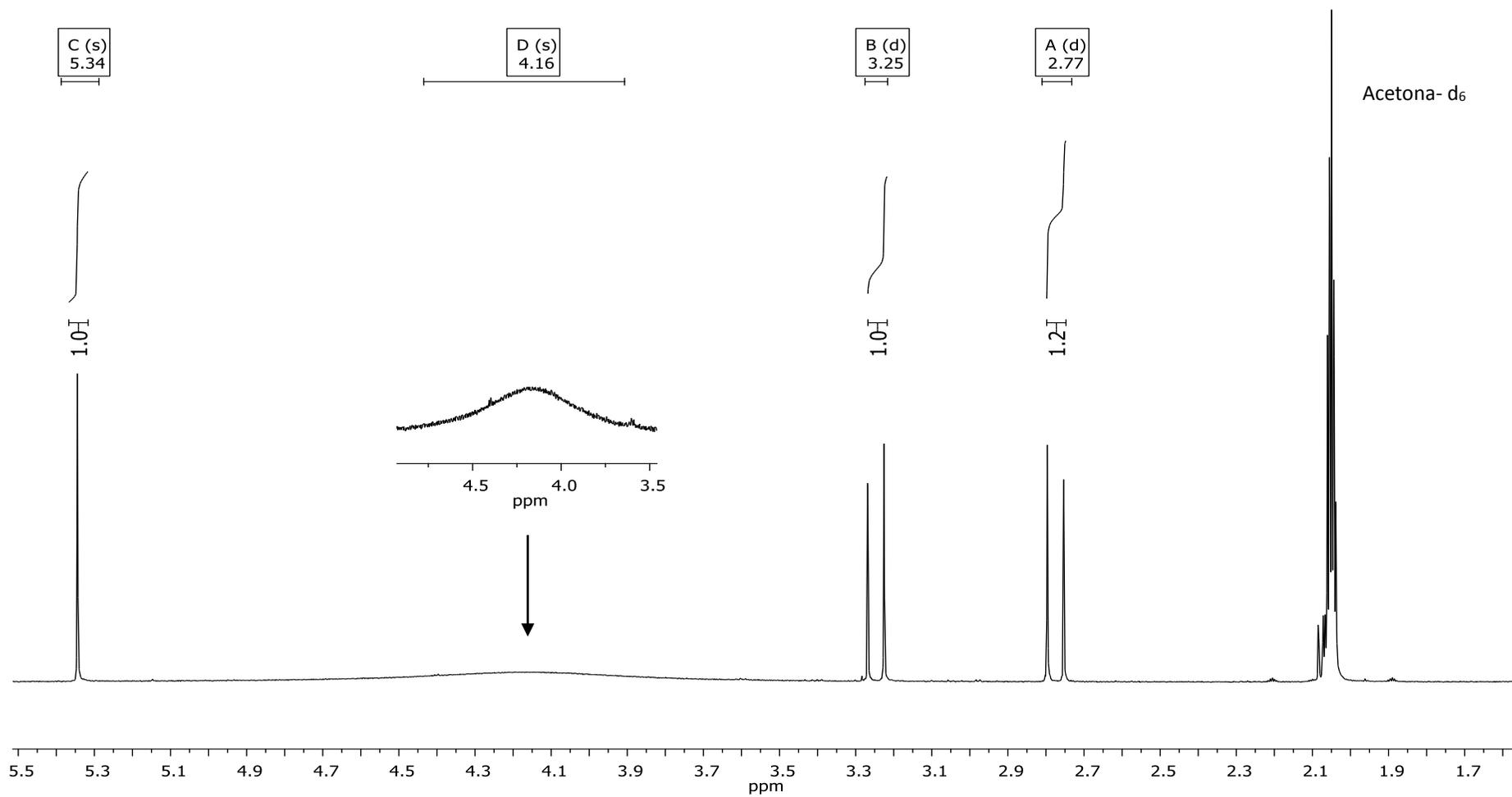


Figura 21. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en Acetona- $\text{d}_6$  de la colección VI (compuesto 2) obtenido del extracto de Acetona de la planta B

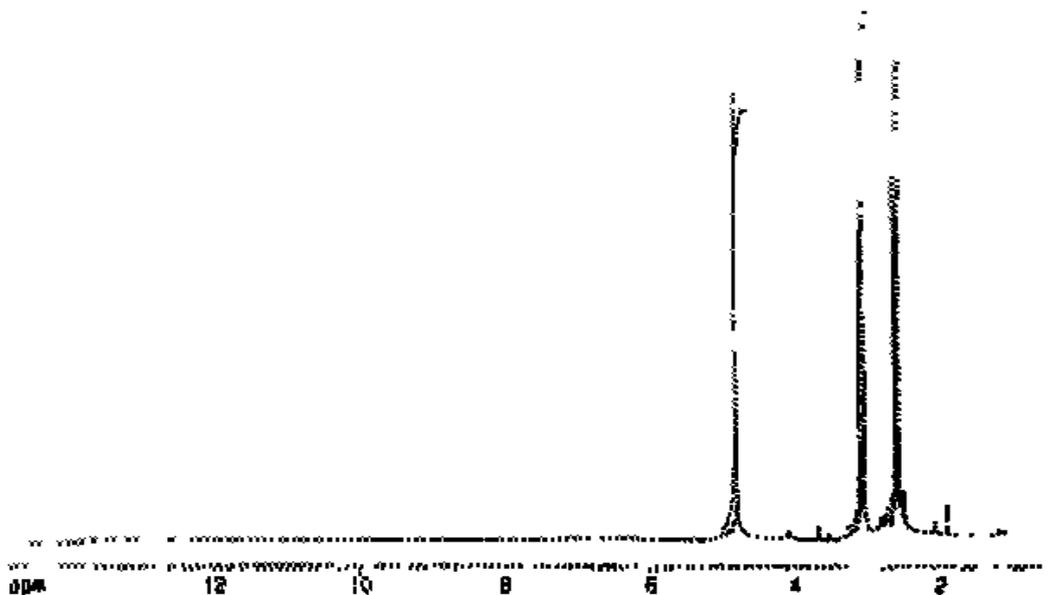


Figura 22. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en Acetona- $\text{d}_6$  del compuesto 2

Tabla 23. Datos de las señales de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 2.

Posición (H)	Diastereoisómero del compuesto 2 (DMSO- $\text{d}_6$ )	Compuesto 2 (Acetona- $\text{d}_6$ )	Compuesto 2
			Experimental (Acetona- $\text{d}_6$ )
2	4.80 (1H, s, $\text{CH-COOH}$ )	5.38 (1H, s, $\text{CH-COOH}$ )	5.34 (1H, s, $\text{CH-COOH}$ )
4- $\alpha$	3.07 (1H, d, J= 17.4 Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$ )	3.30 (1H, d, J= 17.1 Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$ )	3.25 (1H, d, J= 17.2 Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$ )
4- $\beta$	2.60 (1H, d, J= 17.4 Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$ )	2.80 (1H, d, J= 17.1 Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$ )	2.80 (1H, d, J= 17.2 Hz, $\text{H}_a\text{H}_b\text{C-C=O}$ )

### **5.5.3.2 IR del Compuesto 2**

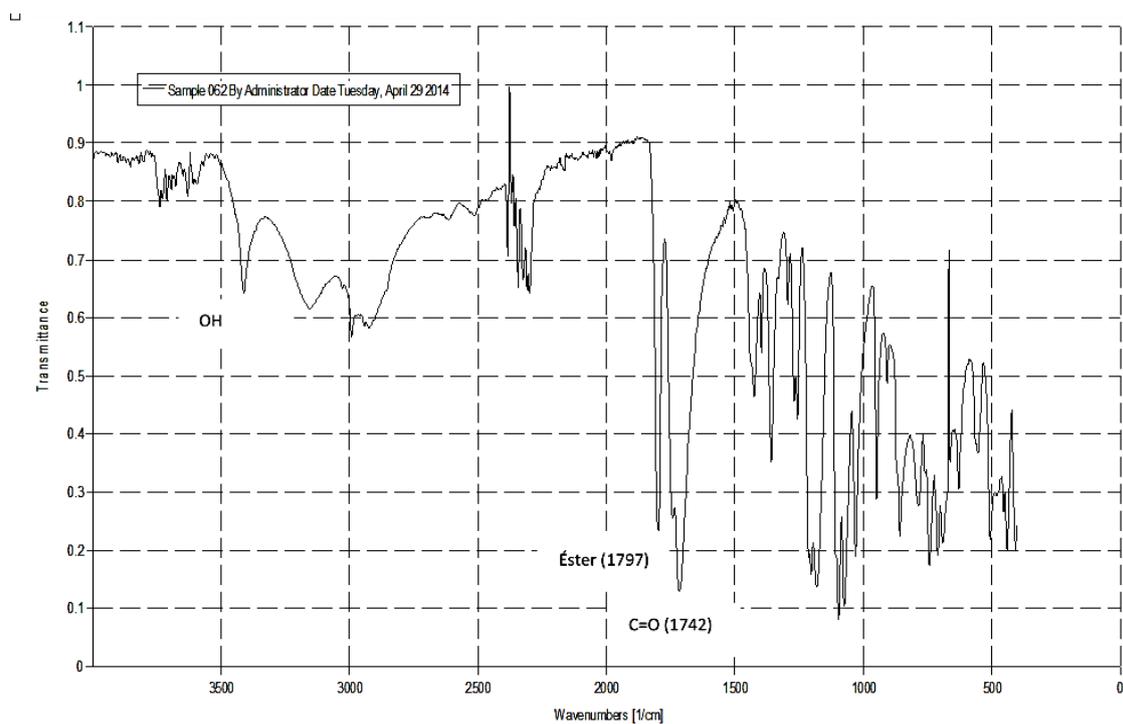
En el espectro de Infrarrojo (Figura 23 y 24) la señal que aparece a  $3410\text{ cm}^{-1}$  con una transmitancia de 0.6427 pertenece al grupo OH, ya que las bandas características de la absorción infrarroja para los alcoholes casi están en el intervalo de  $3400$  a  $3650\text{ cm}^{-1}$ . La banda de absorción infrarroja a  $1797\text{ cm}^{-1}$  con una transmitancia de 0.2334 corresponde a un grupo éster. Mientras que la banda en  $1742\text{ cm}^{-1}$  con transmitancia de 0.2555 corresponde al estiramiento de C=O, ya que los grupos carbonilo absorben en el intervalo de  $1670$  a  $1750\text{ cm}^{-1}$ . El espectro de la figura 23 corresponde a la muestra obtenida de la planta B, mientras que el de la figura 24 corresponde a una muestra determinada previamente y que se reporta en la literatura, ambos espectros son similares para las señales mencionadas arriba.

### **5.5.3.3 Punto de fusión por calorimetría diferencial de barrido**

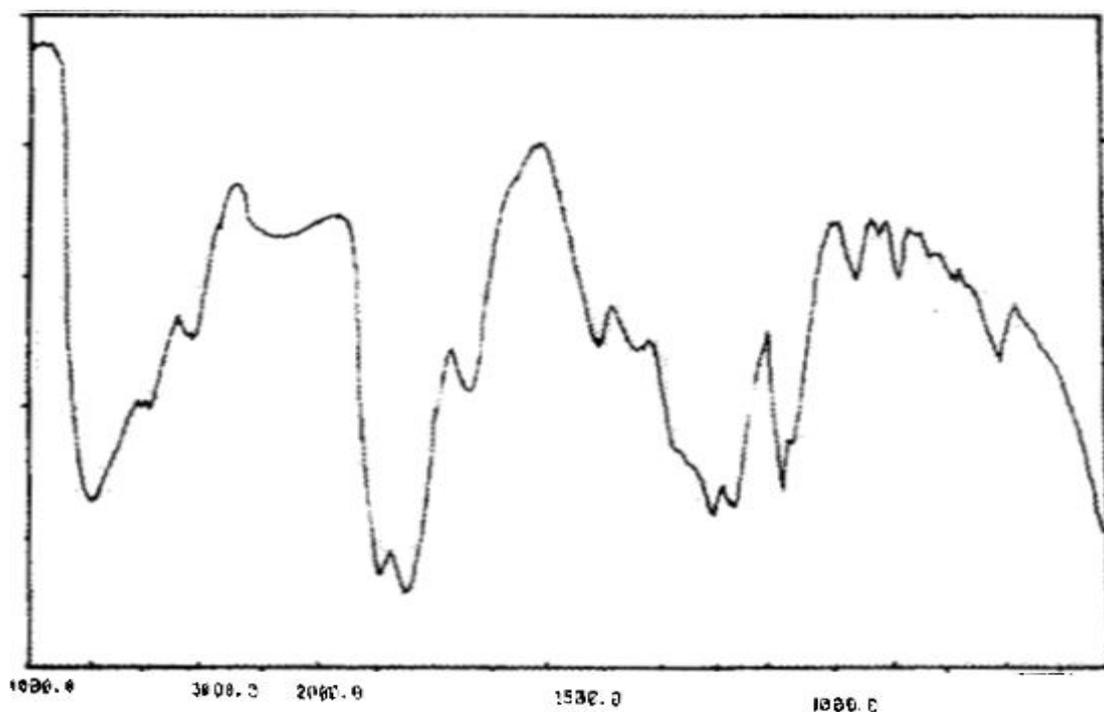
Para el compuesto 2, el DSC registro una temperatura de inicio ( $T_o$ ) de  $188.74\text{ }^\circ\text{C}$ , observando una temperatura de pico ( $T_p$ ) de  $193.03\text{ }^\circ\text{C}$  y una temperatura final ( $T_e$ ) de  $194.19\text{ }^\circ\text{C}$ . El valor de energía de fusión ( $\Delta H$ ) de  $165.08\text{ J/g}$ , que es la cantidad de energía necesaria para que un gramo del compuesto 2 pase del estado sólido a líquido.

### **5.5.3. 4 Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de la colección V y VII de la recromatografía del extracto acetónico de la planta B**

En las colecciones V y VII (Figura 25), se observa la señal característica de Acetona- $d_6$  a  $2.05\text{ ppm}$  (quinteto). Además de que se presentan las señales características del compuesto 2 ( $5.4$ ,  $3.25$  y  $2.80\text{ ppm}$ ) lo cual se relaciona con su actividad antimicrobiana. Para la colección VII aparecen señales en la región comprendida de  $0.7$  a  $1.4\text{ ppm}$  las cuales son pertenecientes a alcanos, además de presentar señales para hidrógenos en carbono unido a oxígeno (H-C-OR) entre  $2,5$  y  $4.4\text{ ppm}$ .



**Figura 23. Espectro de IR del compuesto 2**



**Figura 24. Espectro de referencia de IR del compuesto 2**

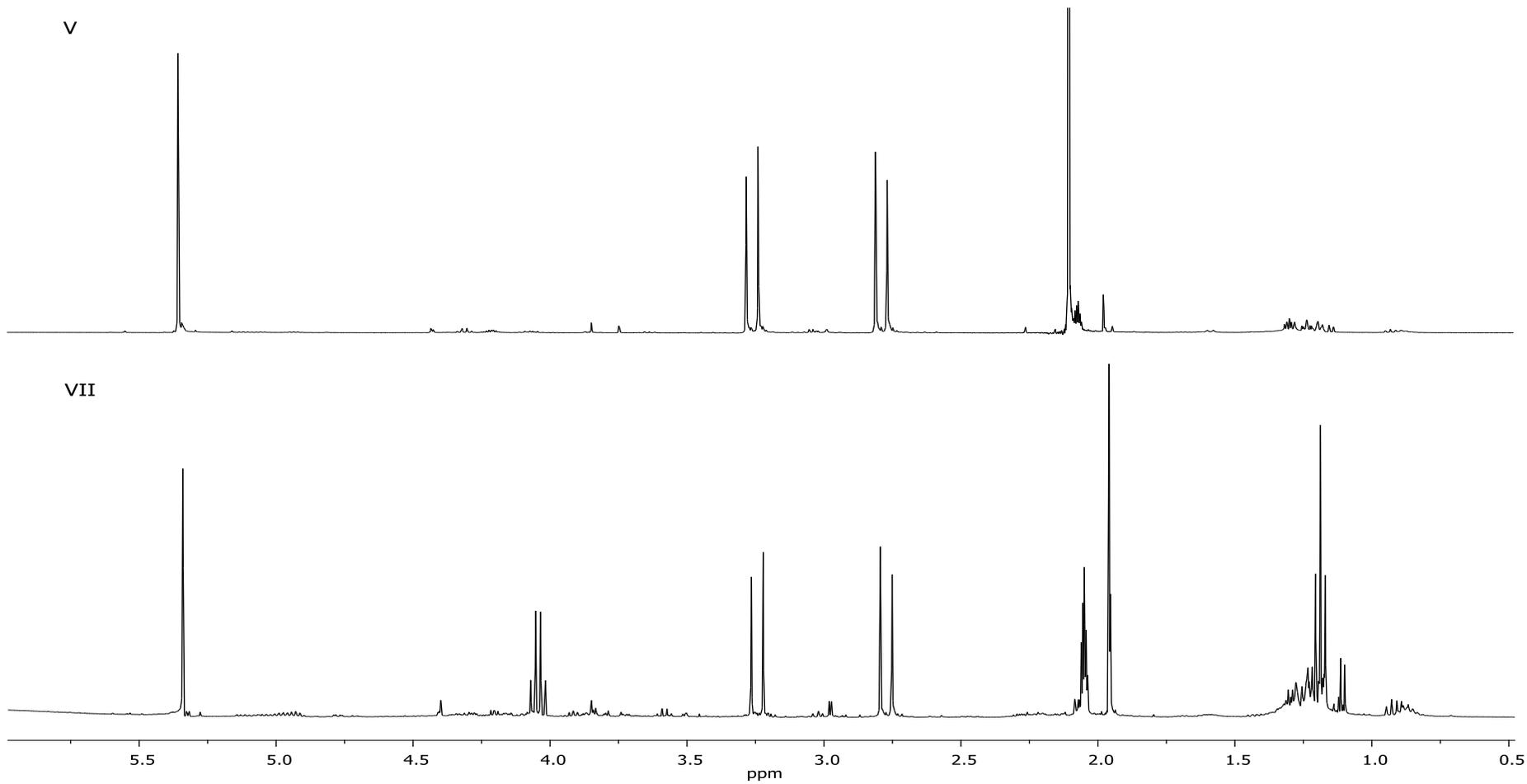


Figura 25. Espectros de RMN de <sup>1</sup>H a 400 MHz en Acetona -d<sub>6</sub> de la colección V y VII del extracto acetónico de la planta B

## 5.6 Comportamiento de bacterias patógenas en jamón adicionado con extractos, colecciones cromatográficas y compuestos puros aislados de la planta B

Debido a que los extractos, las fracciones y compuestos puros serían integrados al jamón o pasta antes de ser cocidos, se realizó una prueba de estabilidad térmica y su mantenimiento de la actividad antimicrobiana, ya que existía la posibilidad de que estos metabolitos secundarios fueran inactivados por la temperatura. Para dichas pruebas se empleó el extracto metanólico y acetónico, las colecciones obtenidas con la combinación de los disolventes hexano-acetato de etilo (para ambos extractos) y los compuestos aislados de dichas fracciones. Como reportamos a atrás, en este estudio se observó mayor actividad antimicrobiana cuando los extractos, fracciones o compuestos puros fueron esterilizados por calor húmedo que cuando los compuestos no se esterilizaron (Tabla 24).

**Tabla 24. Promedio de los halos de Inhibición (mm) de los extractos, colecciones cromatográficas y compuestos puros con y sin tratamiento térmico.**

Material	<i>S. Typhimurium</i>		<i>E. coli</i> O157:H7	
	Sin tratamiento térmico	Tratamiento térmico	Sin tratamiento térmico	Tratamiento térmico
Extracto metanólico	10.88 ±0.59	12.27 ±0.26	10.21±0.84	11.08±0.65
Fracción metanólica	11.0±0.34	12.5±0.55	11.6±0.52	13.0±0.85
Compuesto 1	-	9.88 ± 0.19	-	9.01±0.28
Extracto acetónico	10.53 ±0.22	16.73 ±0.42	10.90±0.16	14.74±0.86
Fracción acetónica	11.10±0.40	12.89±0.30	11.00±0.24	13.90±0.65
Compuesto 2	11.20 ±0.60	14.0 ±0.4	11.65±0.4	13.79±0.45

No existen reportes en la literatura sobre lo que nosotros hemos observado en estos estudios, es decir, incremento del efecto antimicrobiano de un compuesto o extractos de plantas por efecto de un tratamiento térmico. Estos es algo nuevo,

novedoso y de mucho interés para la industria de los alimentos. Nuestra explicación al respecto se limita a especular que la temperatura de esterilización forma nuevas estructuras, ya sea por la formación en una molécula de nuevos enlaces o ruptura de enlaces o por la formación de nuevas moléculas por la interacción de 2 o más moléculas. No obstante, es necesario estudios químicos al respecto para determinar específicamente lo que está ocurriendo.

Es importante mencionar que para la preparación del jamón se decidió utilizar bacterias *S. Typhimurium* y *S. aureus* por su importancia a nivel mundial tanto en países en desarrollo como en países desarrollados. Además de que los cerdos están bien reconocidos por ser portadores de *Salmonella*. Mientras que *S. aureus* se encuentra comúnmente en la piel y fosas nasales del humano, por lo que existe el riesgo de que este patógeno llegue a los productos cárnicos durante su manipulación, además de que tiene interés sanitario por la producción de enterotoxinas (Fernández-Escartín, 2000).

Tomando en cuenta que el producto en el mercado es empacado al vacío y es mantenido en refrigeración, se decidió hacer un estudio con estas condiciones, empacando el jamón a vacío y almacenándolo a 4 °C. Con la finalidad de simular lo que pudiese estar pasando, en caso de que el jamón se contaminara con bacterias patógenas previo a su empaque y su venta en refrigeración. Esto porque normalmente, el producto se envasa al vacío en materiales con poca permeabilidad al oxígeno con la finalidad de evitar el deterioro del color durante su conservación (Rodríguez- Rebollo, 1998).

Los resultados obtenidos para el comportamiento de *S. aureus* en el jamón adicionado con extracto MeOH, Fracción MeOH y el compuesto 1 se muestran en las figuras 26-28, mientras que las figuras 29-31 muestran el comportamiento de *S. Typhimurium*.

Para *S. aureus* el comportamiento en los tres tipos de jamón (adicionado con: extracto MeOH, Fracción MeOH y compuesto 1) fue similar, ya que en un principio se observó una reducción de la carga microbiana para el día 2, sin embargo a partir

del día 4 y hasta el día 35 de almacenamiento, la concentración para los tres jamones fue similar a la concentración del control.

Para *S. Typhimurium*, la concentración se vio reducida en el día 0 para los tres tipos de jamón, comparados con el control, pero a partir del día 2 el comportamiento del patógeno en estos jamones fue similar al del grupo control. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Cruz-Galvez (2012), quien observó que ni el extracto MeOH de la planta de estudio ni las fracciones obtenidas por cromatografía líquida, presentan actividad antimicrobiana contra *S. Typhimurium*, *E. coli* O 157:H7, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, en salchichas empacadas al vacío y mantenidas en refrigeración.

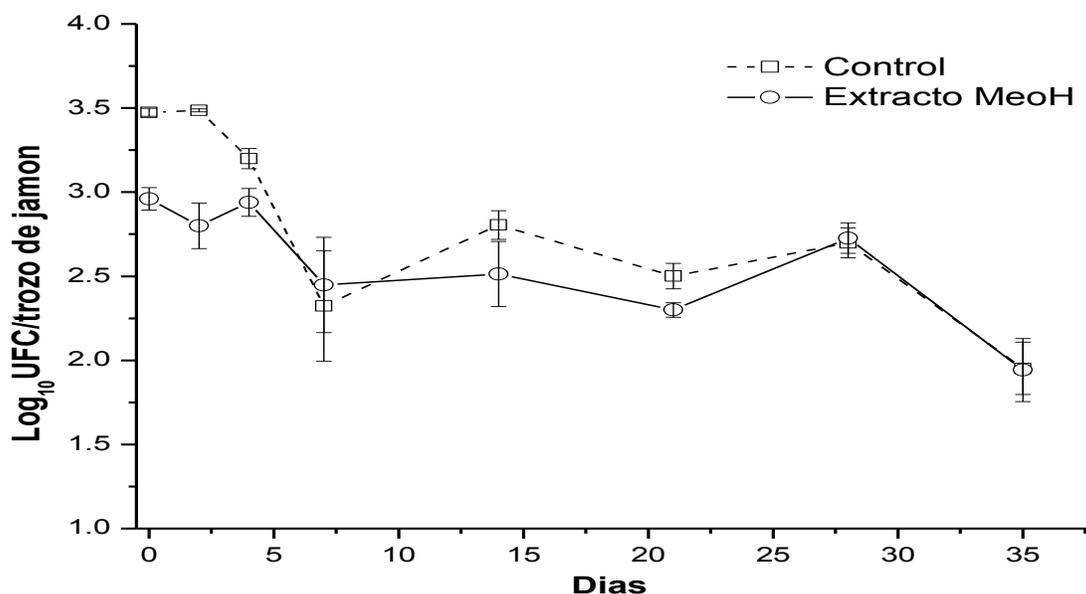


Figura 26. Comportamiento de *S. aureus* en jamón adicionado con el extracto MeOH de la planta de estudio B.

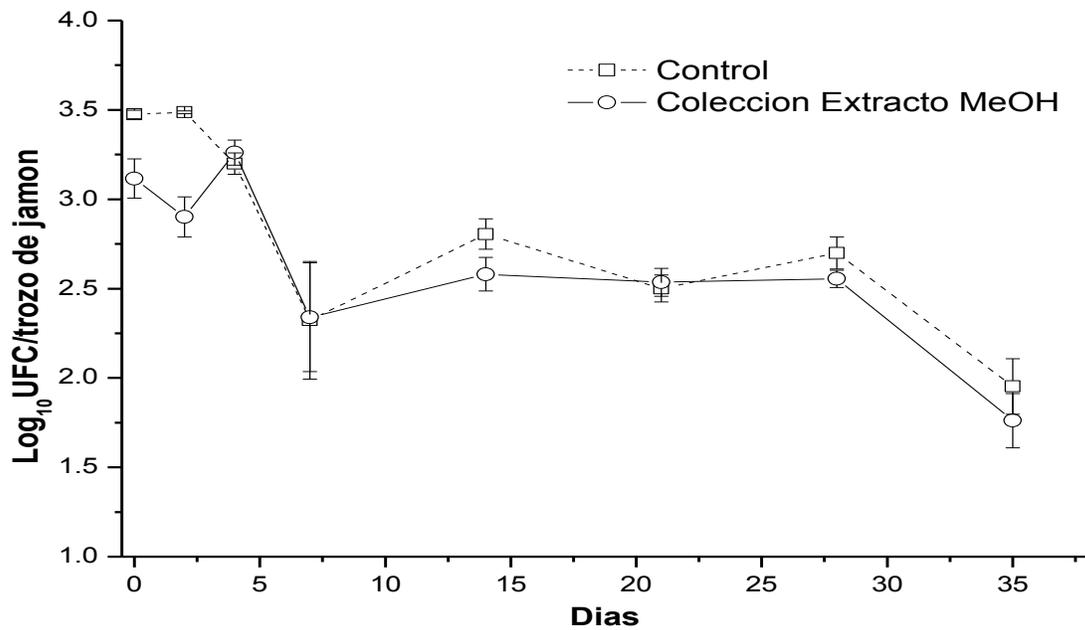


Figura 27. Comportamiento de *S. aureus* en jamón adicionado con la colección del extracto MeOH de la planta de estudio B.

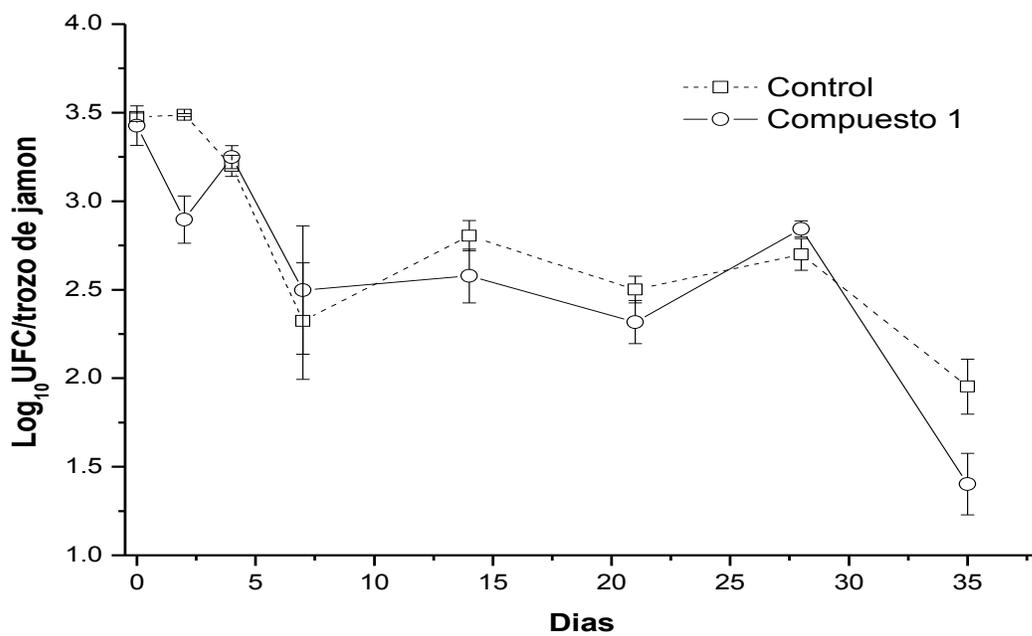


Figura 28. Comportamiento de *S. aureus* en jamón adicionado con el compuesto 1 de la planta de estudio B.

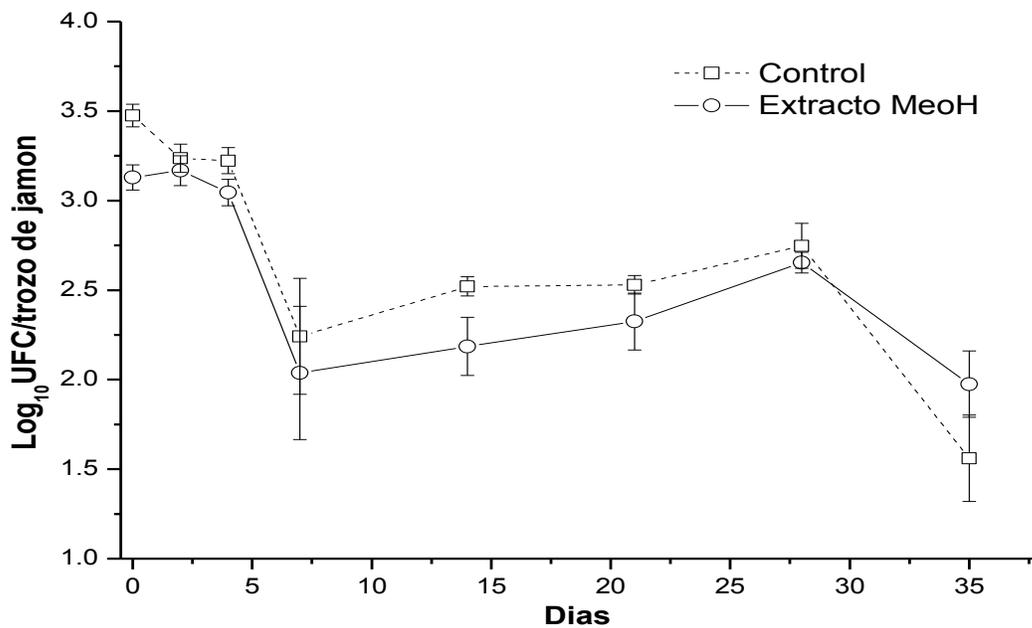


Figura 29. Comportamiento de *S. Typhimurium* en jamón adicionado con el extracto MeOH de la planta de estudio B.

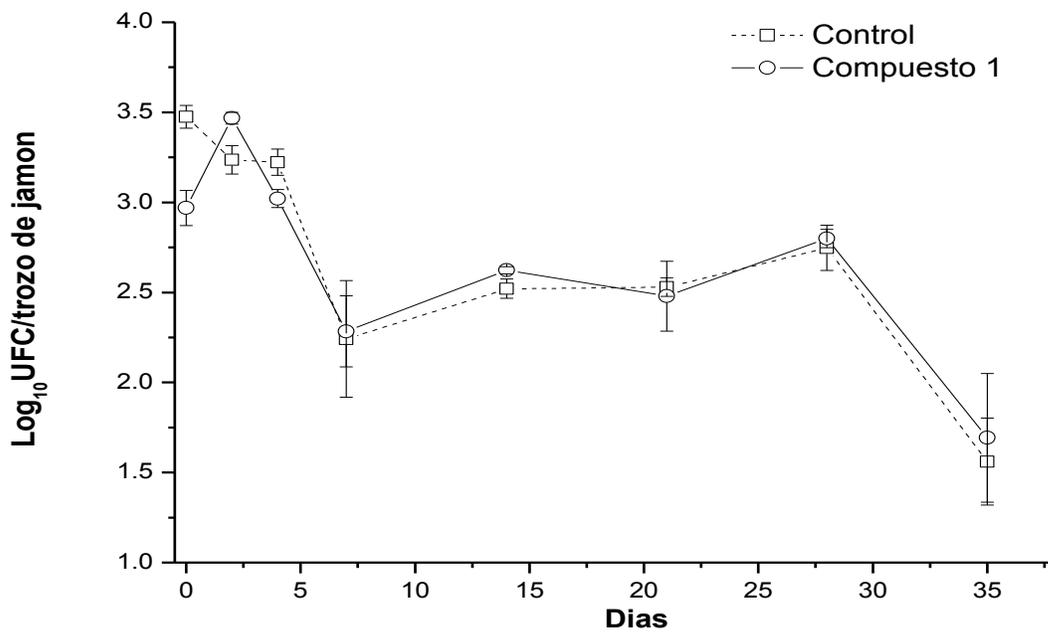
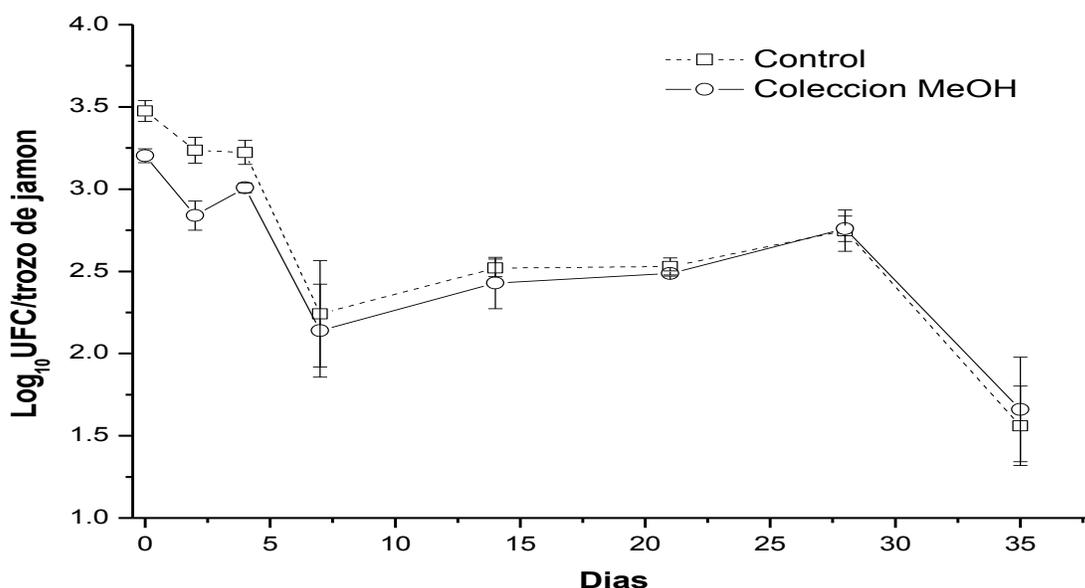


Figura 30. Comportamiento de *S. Typhimurium* en jamón adicionado con la fracción del extracto MeOH de la planta de estudio B.



**Figura 31. Comportamiento de *S. Typhimurium* en jamón adicionado con el compuesto 1 de la planta de estudio B.**

En las gráficas 32-34 se muestra el comportamiento de *S. aureus* en los tres tipos de jamón adicionados con el extracto Acetónico, la fracción de acetona y el compuesto 2; mientras que para el comportamiento de *S. Typhimurium* se presentan los gráficos 35-37.

Para la bacteria *S. aureus* el comportamiento en los tres tipos de jamón (adicionado con: extracto Acetona, Fracción de acetona y el compuesto 2) fue similar, ya que en un principio se observó una reducción de la carga microbiana para los días 2 y 4 comparada con la concentración de *S. aureus* en el jamón control, sin embargo a partir del día 7 y hasta el día 35 de almacenamiento, la concentración para los tres jamones fue similar a la concentración del grupo control.

Para la bacteria *S. Typhimurium*, la concentración se vio reducida en los días 0, 2 y 4 para los tres tipos de jamón, comparados con el control, pero a partir de la primer semana el comportamiento del patógeno en estos jamones fue similar al del grupo control.

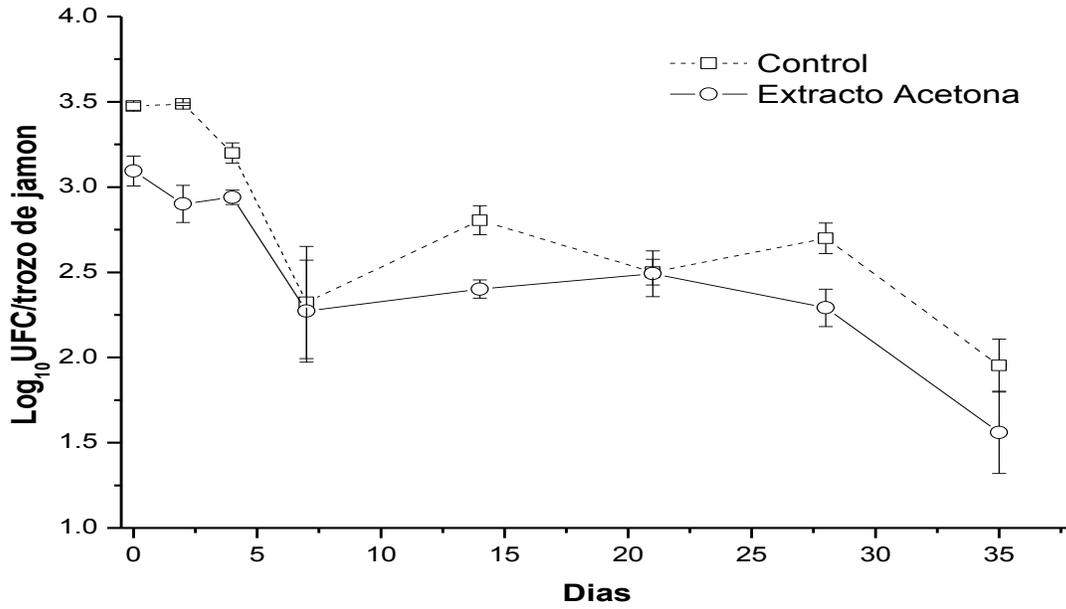


Figura 32. Comportamiento de *S. aureus* en jamón adicionado con el extracto de acetona de la planta de estudio B.

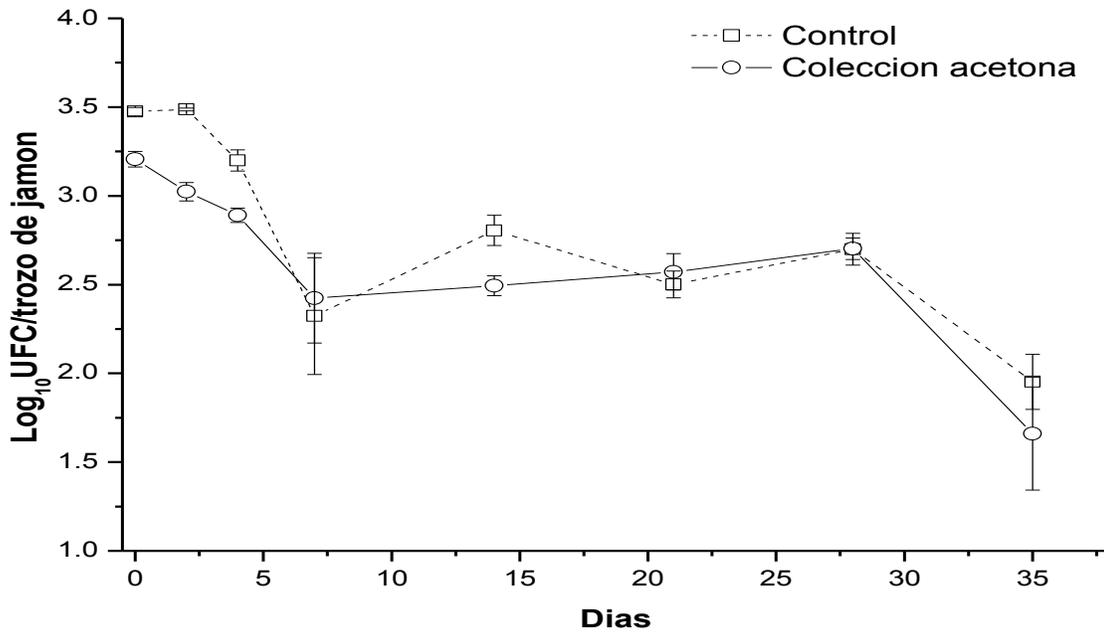


Figura 33. Comportamiento de *S. aureus* en jamón adicionado con la colección del extracto acetona de la planta de estudio B.

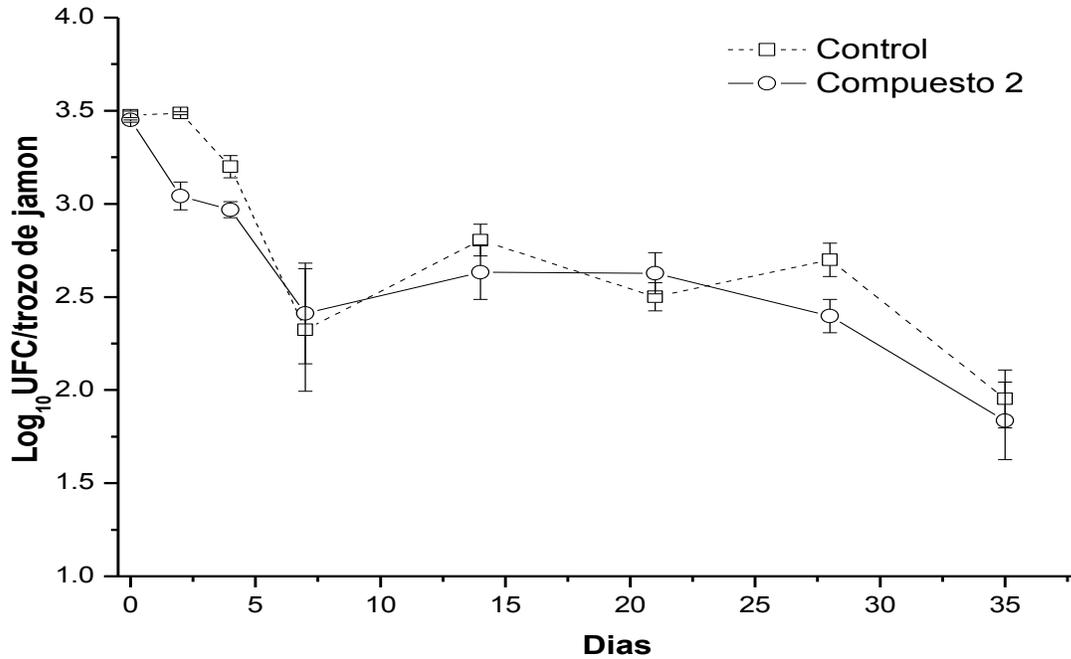


Figura 34. Comportamiento de *S. aureus* en jamón adicionado con el compuesto 2 de la planta de estudio B.

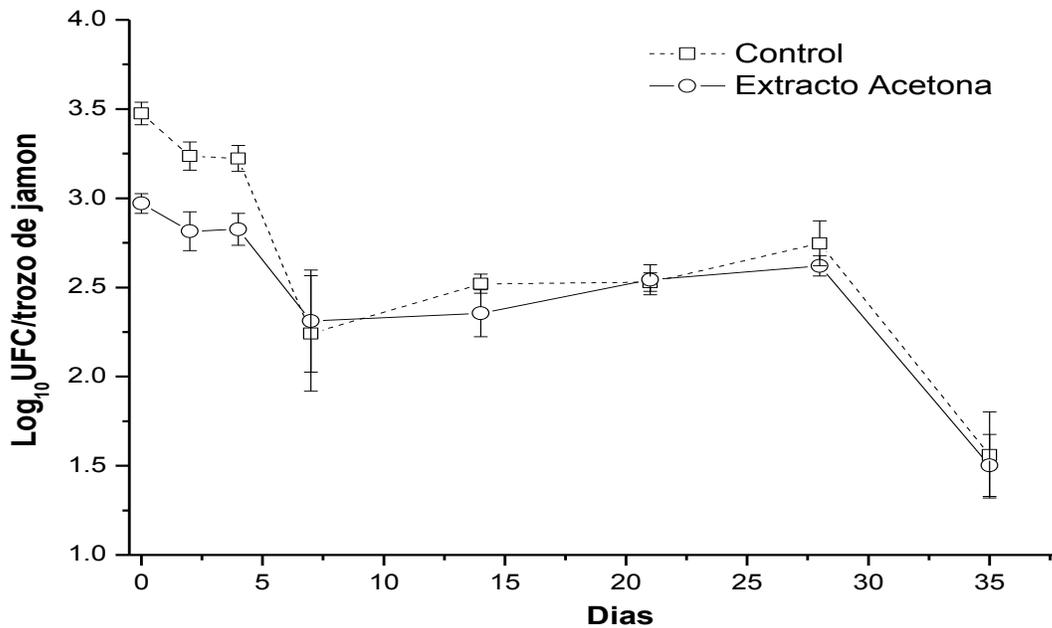


Figura 35. Comportamiento de *S. Typhimurium* en jamón adicionado con el extracto de acetona de la planta de estudio B.

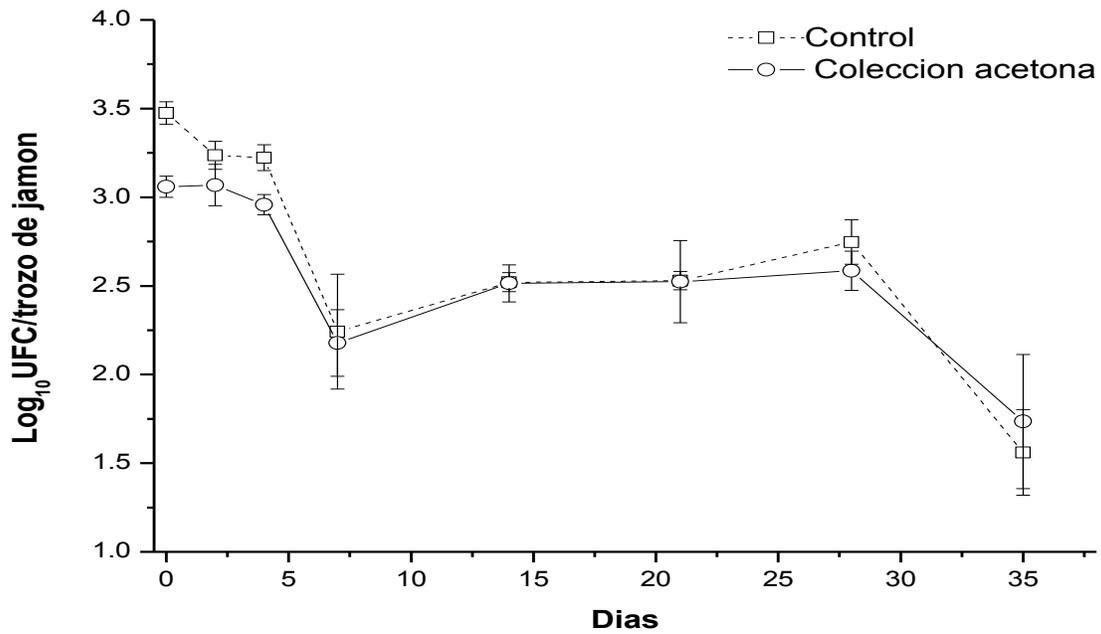


Figura 36. Comportamiento de *S. Typhimurium* en jamón adicionado con la colección del extracto de acetona de la planta de estudio B.

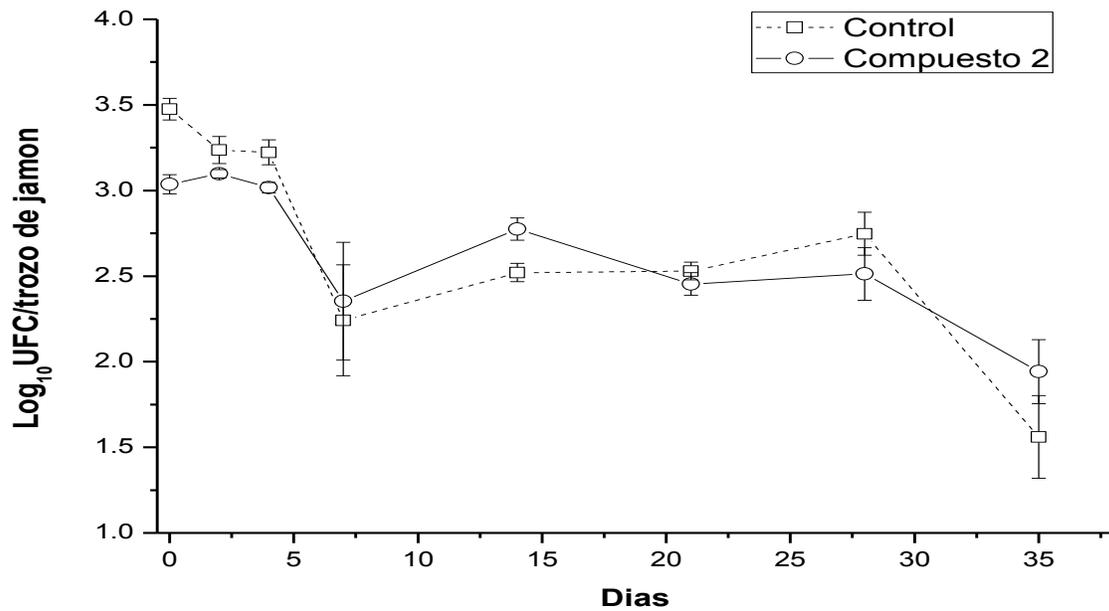


Figura 37. Comportamiento de *S. Typhimurium* en jamón adicionado con el compuesto 2 de la planta de estudio B.

Al parecer los extractos, las fracciones y compuestos aislados no son agentes adecuados para el control de las bacterias *S. aureus* y *S. Typhimurium* en jamón. Por ello se discuten las posibles razones de la disminución de la eficacia de los extractos, las fracciones y compuestos aislados contra las bacterias patógenas en jamón cocido de cerdo.

A partir del día 2 y hasta el día 35 en todos los tratamientos (incluido el control), se observa una reducción en la concentración de los patógenos (*S. aureus* y *S. Typhimurium*), esto puede ser debido a la baja concentración de Oxígeno en el empaque de almacenamiento, ya que como lo mencionan Roncalés (2010) y Ray (2004), este hecho determina que los microorganismos deterioradores y patógenos, que son aerobios, vean fuertemente inhibido su crecimiento. Sin embargo la falta de oxígeno puede beneficiar a microorganismos anaerobios (Ray, 2004) nativos del jamón, los cuales pueden llegar al alimento por diferentes fuentes, como las materias primas, el empaque o malas condiciones de higiene durante la elaboración del jamón. Dentro de los productos cárnicos procesados como el jamón, es común encontrar bacterias ácido lácticas las cuales se ven favorecidas por la anaerobiosis, dichas bacterias pueden llegar a producir sustancias con actividad antimicrobiana, tales como: peróxido de hidrógeno, ácido láctico, ácido acético y bacteriocinas, las cuales puede inhibir de manera importante el desarrollo de microorganismos patógenos (Fernández -Escartin, 2000), lo cual explicaría la inhibición de *S. aureus* y *S. Typhimurium* en todos los tratamientos.

Otra posible explicación a la reducción de la concentración de los patógenos durante su almacenamiento, puede ser por la composición del alimento ya que en la salmuera se incluyó benzoato de sodio el cual es empleado para inhibir el desarrollo de bacterias y hongos con la finalidad de evitar el deterioro en alimentos (Madrid y Madrid, 2000). Ya que como lo mencionan Karabay y Sahin (2005), el benzoato de sodio tiene la capacidad de inhibir de forma *in vitro* tanto a cepas de *S. aureus* sensible a la meticilina como a cepas de *S. aureus* resistente a meticilina. Mientras que Stanojevic *et al.* (2009), observaron que la combinación de benzoato de sodio con nitrito de sodio era efectiva para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus mucooides* y *Candida albicans*.

Para el caso del extracto MeOH, la fracción MeOH y compuesto 1, que mostraron actividad *in vitro*, pero como aditivos en jamón no, puede ser atribuido a que los compuestos se mantuvieron en ambientes hidrofóbicos de las proteínas de la carne por lo que había poca oportunidad para que dichos antimicrobianos entraran en contacto con las células bacterianas que crecen en la superficie del jamón. Otra opción es que los compuestos no difundieron en la matriz del jamón y quedaron atrapados entre las redes formadas por las carrageninas, por lo que existía poca posibilidad de que se presentara la actividad antimicrobiana. Ya que como lo mencionan algunos autores, el transporte de un soluto a través del líquido de un gel debe tener lugar por difusión (Valdés-Martínez, 2006; Fenema 2010). Para ello el soluto tiene que difundir en torno a las hebras de la matriz del gel y la difusión será tanto más difícil cuanto mayores sean las moléculas y más pequeños los poros entre las hebras del gel.

Es importante mencionar que la textura observada en el jamón elaborado con el extracto acetónico, la colección acetónica y el compuesto 2, no era firme y consistente ya que no se formaron geles. En el caso de la carragenina empleada en el jamón, con la finalidad de retener de agua y formar geles, las moléculas de agua se orientan respecto a los grupos hidroxilo que se encuentran en las moléculas del azúcar hidrocólido, mientras que para la formación del gel es importante la presencia de iones  $K^+$  ya que contrarresta las cargas de los grupos sulfato ( $SO_4^-$ ) de la carragenina, permitiendo la formación de dobles hélices (Baianu *et al.*, 1993). Sin embargo la presencia de grupos carboxilo en el compuesto 2 y en particular a los grupos OH los cuales son muy reactivos, pueden estar capturando a los iones  $K^+$  modificando su estructura química y por consiguiente su actividad antimicrobiana impidiendo a la vez la formación de las dobles hélices y por consiguiente no hay formación de gel. Otra posible explicación es que compuesto 2 presente también en el extracto y fracción de acetona (de acuerdo con las señales de RMN) se caracteriza por presentar carboxilos (COOH), lo cual le confiere una propiedad de ácido. Dicha acidez puede ser responsable de la hidrólisis del polisacárido, ya que la Kappa carragenina pierde viscosidad y capacidad de

formación de gel cuando se somete a valores de pH por debajo de 5.5 (Blakemore, 2011).

Esta pérdida de la actividad antimicrobiana de los extractos, las fracciones y los compuestos aislados a partir de la planta de estudio también puede ser atribuida a la complejidad del jamón, ya que como lo menciona Negi (2012), la actividad antimicrobiana mostrada en modelos *in vitro* puede verse afectada por los alimentos, ya que son sistemas complejos de múltiples componentes, por lo que el nivel de antimicrobianos naturales necesarios para mostrar actividad puede ser considerablemente mayor en los productos alimenticios en comparación con medios de cultivo de los modelos *in vitro*, sin embargo esto podría afectar negativamente a las propiedades organolépticas propiedades de los alimentos. La carne y productos cárnicos son un medio complejo y algunos componentes cárnicos pueden incluso proporcionar a las células microbianas una gran protección contra los agentes antimicrobianos. Uhart *et al.* (2006) reportaron que ciertas especias inactivan *S. Typhimurium* en condiciones *in vitro*, pero la actividad disminuyó considerablemente cuando se añade a un sistema complejo de alimentos tales como carne de res molida. Por su parte Larson *et al.* (1996) reportaron que *L. monocytogenes* fue menos sensible a los extractos de lúpulo en la carne que en los medios de cultivo y la sensibilidad también variaron con el contenido de grasa de la carne. Mientras que Cutter y Hruska (2000) sugirieron que la grasa en los alimentos podría formar una capa protectora alrededor de las bacterias, protegiéndolas así de los agentes antimicrobianos.

## VI. Conclusiones

- De las treinta y un plantas examinadas sólo 5 mostraron actividad antimicrobiana contra al menos uno de los microorganismos de ensayo.
- La CMI de los extractos acuosos de las plantas que mostraron actividad antimicrobiana fue de 4 mg/ml.
- La actividad antimicrobiana observada con los extractos realizados con diferentes disolventes de los tallos, hojas y flores de la planta de estudio A, B y *G. inuloides*, se atribuye a la presencia de compuestos químicos de diferente polaridad.
- Existen compuestos en la planta B que incrementan su actividad antimicrobiana al esterilizarse por calor húmedo.
- Los compuestos 1 y 2 aislados de la planta B, son termoestables ya que su punto de fusión se encuentra por encima de los 120 °C y 190 °C respectivamente, lo cual los hace candidatos para ser utilizados en alimentos que reciban tratamientos térmicos por encima de los 100 °C, sin afectar su actividad antimicrobiana.
- Aunque los compuestos 1 y 2 aislados de la planta B no afectaron el desarrollo de los microorganismos de estudio en jamón, son potenciales candidatos para su uso en alimentos; falta por probar su efecto como molécula activa en empaques comestibles de embutidos o bien en microencapsulados.

## VII. Referencias

1. Abdelrahim, S.I., Almagboul, A.Z Abdelrahim, S.I., Almagboul, A.Z., Omer, M.E.A. and Elegami A. (2002) Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. *Fitoterapia*, 73, 713–715.
2. Adams M.R. and Moss M.O. (2005). *Food Microbiology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
3. Alanís, A.D., Calzada, F., Cervantes, J.A., Torres, J. and Ceballos G.M. (2005). Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 153–157.
4. Al-Bakri, A.G. and Afifi, F.U. (2006). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J. Microbiol. Methods*, 68, 19-25.
5. Anónimo. (1995). Reporte del instituto americano de la carne sobre el nitrito y las carnes procesadas. *Lácteos y cárnicos mexicanos*, 10(4), 20-22.
6. Anónimo. (2004). Aditivos para jamón cocido. *Mundo Lácteo y cárnico*, 1(1), 7-11.
7. Anónimo. (2006). Aditivos en la industria cárnica y láctea. *Carnilac*, 21(2), 33-38.
8. Astudillo-Vázquez, A., Dávalos Valle, H., De Jesús, L., Herrera, G. and Navarrete, A. (2008). Investigation of *Alternanthera repens* and *Bidens odorata* on gastrointestinal disease. *Fitoterapia*, 79, 577–580.
9. Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Jöberg A.M., Aarnisalo, K., Björkroth, J., Sandholm, T. M. and Korkeala, H. (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol*, 65(1), 150-155.
10. Avato, P., Bucci, R., Tava, A., Vitali, C., Rosato, A., Bialy, Z. and Jurzysta, M., (2006). Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure–activity relationship. *Phytother. Res.*, 20, 454–457.

11. Avila, A.J. G., Muñoz, L.J. L. and Marinez, C. G. (1993). In-vitro Antimicrobial activity of various plant extracts used by Purepecha against some enterobacteriaceae. *Int. J. Pharmacog.*, 31, 61-64.
12. Beuchat, L.R., Brackett, R.W. and Doyle, M.P. (1994). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.*, 43, 134-142.
13. Bhunia, A. K. (2008). *Foodborne Microbial Pathogens*. New York: Springer Science.
14. Bibek, R. (2005). *Fundamental food microbiology*. Florida: CRC Press LLC.
15. Blakemore, W.R. and Harpell, A. R. (2011). Carrageenan. In: Imeson, A. (Ed.), *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents* (73-94). John Wiley & Sons.
16. Brandi, G., Amagliani, G., Schiavano, G.F., De Santi, M. and Sisti, M. (2006). Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *J. Food Prot.*, 69, 2274-2279.
17. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94(3), 223-253.
18. Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B. and Aguilar, L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders screening of 84 plants against enterobacteria. *J. Ethnopharmacol.*, 30, 55-73.
19. Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. and Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 402–405.
20. Cruz-Galvez, A.M. (2012). Efecto antimicrobiano de plantas usadas en la medicina tradicional: estudios en medios de cultivo, carne cruda y salchicha. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo de Bravo, Hgo., México.
21. Cseke, J. L., Setzer, N. W., Vogler, B., Kirakosyan, A. and Kaufman B. P. (2006). Traditional, Analytical, and Preparative Separations of Natural Product. In: Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, L.S., Duke, A. J. and Brielmann, L. H. (Eds.), *Natural Products from Plants* (263-317). Florida: Taylor & Francis Group, CRC.

22. Cubero, N., Monferrer, A. y Villalta, J. (2002). Aditivos alimentarios. Madrid: Mundi-Prensa.
23. Cutter, C. N., & Hruska, L. (2000). Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63(5), 601–607.
24. Desdémona-Martínez, E., Soto-Simental, S. y Hernández-Chávez, J.F. (2000). Incidencia de patógenos en productos cárnicos y métodos para prevenirlos. *Carnetec*, 7(4), 42- 47.
25. Dussault, Dominic; Vu, Khanh Dang; Lacroix, Monique. (2014). In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Science*, 96, 514–520.
26. Essawi, T. and Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 343–349.
27. Fennema, O.R. (2010), *Química de los alimentos* Acribia Editorial.
28. Fernández-Escartín, E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los Alimentos*. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.
29. Fisher, A. (1994). *Tecnología de la elaboración de productos cárnicos*. En Prändl, O., Fisher, A., Schnidhofer, T. y Jürgen, H. (Eds.), *Tecnología e higiene de la carne* (511-623). Zaragoza: Acribia.
30. Flint, J. A., Van Duynhoven, Y. T., Angulo, F. J., De Long, S. M., Braun P., Kirk, M., Scallan, E., Fitzgerald, M., Adak, G. K., Sockett, P., Ellis, A., Hall, G., Gargouri, N., Walke, H. and Braam, P. (2005). Estimating the Burden of Acute Gastroenteritis, Foodborne Disease, and Pathogens Commonly Transmitted by Food: An International Review. *Clin Infect Dis.*, 41(5), 698-704.
31. Fonnésbech, V. B., Henrik, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. and Gram, L. (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* Contamination Routes in Cold-Smoked Salmon Processing Plants Detected by DNA-Based Typing Methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(6), 2586-2595.
32. Fonseca-Florido, H. A. (2013). Estudio de las propiedades térmicas, estructurales y mecánicas de mezclas de almodones de diferentes fuentes

- botánicas. ( tesis de maestría) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.
33. Fox, M.A. y Whitesell, J.K. (2000). Química orgánica. México: Addison Wesley Longman.
  34. Gálvez-Mariscal, A., Flores Argüello, I. y González Saravia, A.F. (2006). Proteínas. En Badui Dergal, S. (Ed.), Química de los alimentos (pp 119-244) México: Pearson Education.
  35. Garcia-Sanchez, E., Ramirez-Lopez, C.B., Rio-Torres, R.E.N. and Martinez-Pacheco, M.M. (2011). A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacan. *International Journal of experimental Botany*, 80, 139-146.
  36. Geidam, Y.A., Ambali, A.G. and Onyeyili, P.A. (2007). Preliminary Phytochemical and Antibacterial Evaluation of Crude Aqueous Extract of *Psidium guajava* Leaf. *Journal of Applied Sciences*, 7: 511-514. DOI: 10.3923/jas.2007.511.514
  37. Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 83–92.
  38. González-Tenorio, R. y Soto-Simental, S. (2007). Manual de prácticas de tecnología de la carne. Tulancingo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
  39. Gutiérrez-Lugo, M.T., Barrientos-Benítez, T., Luna, B., Ramírez-Gama, R.M., Bye, R., Linares, E. and Mata, R. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican Medicinal Plants. *Phytomedicine*, 2 (4), 341-347.
  40. Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 985-990.
  41. Harris, D.C., (2009). Análisis químico cuantitativo. Córdoba: Reverte.
  42. Henao, J., Muñoz L.J., Ríos, E.V., Padilla, L. y Giraldo, G.A. (2009). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* H.B.K. cultivada en el departamento del Quindío. *Revista de Investigaciones de la Universidad del Quindío* 19:159–164.

43. Heredia-Lobato, J. y Garnica Anguas, R. (1994). Aplicación del análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos en la elaboración de productos cárnicos. Recuperado de [www.cofepris.gob.mx/Documents/BibliotecaVirtual/.../11.pdf](http://www.cofepris.gob.mx/Documents/BibliotecaVirtual/.../11.pdf)
44. Hernández, T., Canales, M., Avila, J.G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A. and Lira, R. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 181–188.
45. Hudson, J. A. (1992). Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Letters Applied Microbiology*, 14, 178–180.
46. INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2012). Información socio demográfica.
47. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. (2009). Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos. Norma aprobada, décima edición. Documento CLSI M02-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
48. Jay, B. y Fox. JR. (1994). Los pigmentos de la carne. En Price, J.F. y Schweigert, B.S. (Eds.), *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos* (175-198). Zaragoza: Acribia.
49. Jay, J.M., Loessner, J. M. and Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology*. New York: Springer.
50. Karabay, O. and Sahin, I. (2005). In vitro activity of sodium-benzoate against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *West Indian med. j.* 54(2): 107-109.
51. Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W. y Gutiérrez, G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. (Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria No.6) Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

52. Larson, A. E., Yu, R. R. Y., Lee, O. A., Price, S., Haas, G. J., and Johnson, E. A. (1996). Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International Journal of Food Microbiology*, 33(2–3), 195–207.
53. Lawrie, R.A. (1998). *Ciencia de la carne*. Zaragoza: Acribia.
54. Leon-Villanueva, G.I. (2000). Estudio químico de *Conyza shiedeana* y determinación de la actividad antibacteriana de *C. shiedeana*, *Gnaphalium liebmannii* y *Verbena menthaefolia* Benth. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo., México.
55. Lien, R. y Velazco, J. (2001). La importancia de los nitritos en la carne procesada. *Carnetec*, 8 (1), 28-35.
56. López-Malo, A.V., Palou, E., Parish, M. E. and Davidson, P. M. (2005). Methods for Activity Assay and Evaluation of Results. In: Davidson, P. M., Sofos J. N. and Brannen, A. L. (Eds.), *Antimicrobials in food* (659-680). Florida: CRC Press.
57. López-Palacios, G. y Valdez-Martínez, S. E. (2000). Factores que favorecen el desarrollo de microorganismos en carne y su efecto sobre la calidad. *Lácteos y cárnicos mexicanos*, 15(2), 47-55.
58. Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Brock, J.P. (2004). *Biología de los Microorganismos*. Madrid: Pearson.
59. Madrid, V. y Madrid, C. (2000). *Los aditivos en los alimentos*. Madrid: Mundi prensa.
60. Martínez- Ángeles, K. (2006). Aislamiento, evaluación y caracterización de fracciones antimicrobianas del jugo de zanahoria fresco y almacenado. (Tesis de Licenciatura en Química). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
61. Martínez-González, N. E., Pérez-Montaña, J. A., Rodríguez-García, M.O. y Peregrina-Gómez, R. (2002). *Bacillus cereus*. En Torres-Vileta, A. y Castillo-Ayala, A. (Eds.), *Agentes patógenos transmitidos por alimentos* (69-86). Guadalajara: Universidad de Guadalajara.
62. Mc Murry, J. (2005). *Química Orgánica*. México: Thomson Learning.
63. Meléndez, P.A. and Capriles, V.A. (2006). Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*, 13, 272–276.

64. Müller, G. (1981). Microbiología de los alimentos vegetales. Zaragoza: Acribia.
65. Muthuvelan B. and Balaji R. (2008). Studies on the efficiency of different extraction procedures on the anti-microbial activity of selected medicinal plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24 (12), 2837-2842.
66. Narváez-Bravo, C.A., Carruyo-Núñez, G., Moreno, M., Rodas-González, A., Hoet A. E. y Wittum T.E. (2007). Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en Muestras de Heces de Ganado Bovino Doble Propósito del Municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. Rev. Cient., 17(3), 239-245.
67. Navarrete, A., Trejo-Miranda, J.L. and Reyes-Trejo, L. (2002). Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. Journal of Ethnopharmacology, 79, 383–388.
68. Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. International journal of food microbiology, 156(1), 7-17.
69. Niven, C.F. (1994). Microbiología y parasitología de la carne. En Price, J.F. y Schweigert, B.S. (Eds.), Ciencia de la carne y de los productos cárnicos (199-237). Zaragoza: Acribia.
70. Norma oficial Mexicana el Nom-158-SCFI-2003. Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba. Secretaria de economía, México.
71. Norma Oficial Mexicana NOM-122-SSA1-1994, Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias. Secretaria de salud, México.
72. Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Secretaria de salud, México.
73. Nostro A., Germanò M.P., D'angelo V., Marino A., Cannatelli M.A. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Letters in Applied Microbiology, 30, 379-384.

74. Nychas, G. J.E. and Skandamis, P. N. (2003). Antimicrobials from herbs and spices. In Roller, S. (Ed.), Natural antimicrobials for the minimal processing of foods (176-200). Florida: CRC Press LLC.
75. Nychas, G. J.E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In Gould G. W. (Ed.), New methods of food Preservation (59-89). London: Champman & Hall.
76. Omar, S., Lemonnier, B., Jones, N., Ficker, C., Smith, M.L., Neema, C., Towers, G.H.N., Goel, K. and Arnason, J.T. (2000). Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 73,161–170.
77. Pérez, E., Aguiar, P., Salvatella, R., Ribetto, A. and Castro, A. (2004). Vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA): su importancia en la caracterización de riesgos. Asociación Argentina de Microbiología.
78. Pérez-Escandón, B. Estela, Villavicencio-Nieto, M. Á. y Ramírez-Aguirre, A. (2003). Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca: México.
79. Prändl, O. (1994). Fundamentos de la conservación de la carne. En Prändl, O., Fisher A., Schmidhofer T. y Jürgen, H. (Eds.), *Tecnología e Higiene de la carne* (236-340). Zaragoza: Acribia.
80. Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (2002). *Microbiology*. Madrid: Mc Graw-Hill.
81. Price, J.F. y Schweigert, B.S. (1994). Introducción. En Price, J.F. y Schweigert, B.S. (Eds.), *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos* (1-9). Zaragoza: Acribia.
82. Proestos, C., Boziaris, I.S., Kapsokefalou, M. and Komaitis, M. (2008). Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. *Food Technol. Biotechnol.*, 46,151-156.
83. Pszczola, D. E. (2002). Antimicrobianos: establecer barreras para asegurar la calidad de los alimentos. *Lácteos cárnicos mexicanos*, 17(5), 33-38.
84. Ray, B., (2004). *Fundamental food microbiology*. CRC press, Florida. USA.

85. Reddy, B.U. (2010). Enumeration of Antibacterial Activity of Few Medicinal Plants by Bioassay Method. *E.J. Chem.*, 7, 1449-1453.
86. Roby, M.H.H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. and Khalel, K. I. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, 44, 437– 445.
87. Rocha, A.E. (2001). Ingredientes que inhiben el crecimiento bacteriano. *Carnetec*, 8 (6), 24-30.
88. Rodríguez-Rebollo, M. (1998). Manual de industrias cárnicas. Publicaciones técnicas Alimentarias, S. A., Madrid.
89. Rodríguez-Ángeles G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex.*, 44(5), 464-475.
90. Rodríguez-Jerez, J.J. (2006). El uso de lactatos en el control de productos cárnicos. *Carnilac*, 20(6), 43-44.
91. Rodríguez-Pérez, G. H., Cárdenas-Ortega, N. C., Díaz-Ruiz M. G. Y. y Jasso-Pineda, Y. (2006). Efecto in vitro de cuatro especies de plantas silvestres sobre microorganismos causantes de infecciones gastrointestinales. *Bioquímica*, 31 (SA), 87.
92. Roller, S. (2003). Introduction. In Roller, S. (Ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods* (1-10). Florida: CRC Press LLC.
93. Roncalés Rabinal, P. (2010). Optimización de los sistemas de envasado y de la conservación de alimentos. Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza, Zaragoza, España.
94. Sahin, S. and Sumnu, S.G. 2007. *Physical Properties of Foods*. New York: Springer.
95. Salvat, A., Antonnacci, L., Fortunato, R.H., Suarez, E.Y. and Godoy, H.M. (2001). Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.*, 32, 293-297.
96. Sánchez-Rodríguez J. A., Serrano-Jiménez S. y Marfil-Navarro R. (2009). Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino: fundamentos de seguridad alimentaria. España: Díaz de Santos.

97. Schweigert, B.S. (1994). Contenido de nutrientes y valor nutritivo de la carne y los productos cárnicos. En Price, J.F. y Schweigert, B.S. (Eds.), Ciencia de la carne y de los productos cárnicos, (249-277). Zaragoza: Acribia.
98. Shagal, M.H., Modibbo, U.U. and Liman, A.B. (2012). Pharmacological justification for the ethnomedical use of *Datura Stramonium* stem bark extract in treatment of diseases caused by some pathogenic bacteria. Int. Res. Pharm. Pharmacol., 2: 16-19.
99. Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Ed. R. Pinzón CAB-CYTED. Bogotá, Colombia, 247pp.
100. Silva, F.G., Oliveira, C.B.A., Pinto, J.E.B.P., Nascimento, V.E., Santos, S.C., Seraphin, J.C. and Ferri, P.H. (2007). Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. J. Braz Chem. Soc., 18: 990-997.
101. Sinell, H.J. (1994). Microbiología de la carne. En Prändl, O., Fisher, A., Schnidhofer, T. (Eds.), Tecnología e higiene de la carne (854). Zaragoza: Acribia.
102. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. y Crouch, S.R. (2001). Química Analítica. México: Mc Graw-Hill.
103. Sonali, J. and Shekhawat, G.S. (2010). Phytochemical analysis and antibacterial Screening of in vivo and in vitro Extracts of Indian Medicinal Herb: *Anethum graveolens*. Research Journal of Medicinal Plant, 4, 206-212.
104. Stanojevic, D., Comic, L., Stefanovic O. and Solujic-Sukdolac, S.I. (2009). Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action *in vitro*. Bulg. J. Agric. Sci., 15: 307-311.
105. Stryer, L., Berg J.M. y Tymoczko J.L. (2004). Bioquímica. Editorial: reverté
106. Suriñach, S., Baro, M.D., Bordas, S., Clavaguera, N. y Clavaguera-Mora, M. T. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de los materiales. Bol. See. Bsp. Ceram. Vidr., 31(1), 11-17.
107. Tajkarimi, M. M., Ibrahim S. A., Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21(9), 1199-1218.

108. Townsend, W.E. y Olson, D.G. (1994). Las carnes curadas y su procesado. En Price, J.F. y Schweigert, B.S. (Eds.), Ciencia de la carne y de los productos cárnicos (393-414). Zaragoza: Acribia.
109. Uhart, M., Maks, N. and Ravishankar, S., (2006). Effect of spices on growth and survival of *Salmonella typhimurium* DT 104 in ground beef stored at 4 and 8 °C. Journal of Food Safety 26, 115–125.
110. Valdés-Martínez, S. E. (2006). Hidratos de carbono. En Badui Dergal, S. (Ed.), Química de los alimentos (pp 29-117) México: Pearson Education.
111. Vanden D.A. and Vlietinck A.J. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey P.M., Harborne J.B. and Hostettman K. (eds), Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity (47–69). London: Academic Press.
112. Varnam A. H., Sutherland, J.P. (1998). Carne y Productos Cárnicos: Tecnología, Química y Microbiología. Zaragoza: Acribia.
113. Velasco, J. (1996). La verdad acerca de la carne. Carnetec, 3 (5), 20-24.
114. Velazco, J. (2001). Avances en descontaminación de la carne. Carnetec, 8 (6), 20-26.
115. Villar del Fresno, A. M. (1999). Farmacognosia general. Madrid: Síntesis.
116. Villavicencio-Nieto, M.A. y Pérez Escandón, B. E. (2006). Plantas útiles del estado de Hidalgo, Volumen 3. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca: México.
117. Villavicencio-Nieto, M.A. y Pérez-Escandón, B.E. (2006). Plantas útiles del estado de Hidalgo III. Pachuca: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
118. Vogler B. and Setzer, W. N. (2006). Characterization of Natural Products. In: Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, L.S., Duke, A. J. and Brielmann, L. H. (Eds.), Natural Products from Plants (320-387). Florida: Taylor & Francis Group, CRC.
119. Yurkanis, B.P. (2008). Química orgánica. Edo. de México: Pearson educación.

120. Zamudio-Maya, M. (2010). Microorganismos patógenos y alterantes. En Hui, Y.H., Guerrero, I. y Rosmini, M. (Eds.), Ciencia y tecnología de carnes (634). México: Limusa.
121. Zavala, M.A., Pérez, S., Pérez, C., Vargas, R. and Pérez, R.M. (1998). Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 61, 41–47.
122. Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L., & Sun, X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat science*, 81(4), 686-692.