



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

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE
JAMAICA Y SU APLICACIÓN EN FRIJOLES PREPARADOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Ricardo Rosas Jiménez

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Esmeralda Rangel Vargas

Dra. Eva María Santos López

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

Enero, 2019



Mineral de la Reforma, Hgo., a 10 de enero de 2019

Número de control: ICBI-D/027/2019
Asunto: Autorización de impresión.

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

Por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de Licenciatura en Química de Alimentos Ricardo Rosas Jiménez, quien presenta el trabajo de titulación "Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de jamaica y su aplicación en frijoles preparados" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

- PRESIDENTE: Dra. María Elena Páez Hernández
- PRIMER VOCAL: Dra. Esmeralda Rangel Vargas
- SEGUNDO VOCAL: Dr. Javier Castro Rosas
- TERCER VOCAL: Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
- SECRETARIO: Dra. Eva María Santos López
- PRIMER SUPLENTE: Dra. Irais Sánchez Ortega
- SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Reyna Nallely Fallán Cortés

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

Atentamente
"Amar, Orden y Progreso"

Dr. Oscar Rodolfo Suárez Ocasio
Director de ICBI

DIRECCIÓN

ORSC/SEPC



Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras Mineral de la Reforma, Hidalgo
México, C.P. 42184
Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2231
Fax 2109
direccion_icbi@uah.edu.mx

www.uah.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Esmeralda Rangel Vargas, por creer en mí y guiarme paso a paso en este proyecto y por su conocimiento, tiempo y esfuerzo compartido.

Al Dr. Javier Castro Rosas y al Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa por el apoyo y facilidades recibidas al permitirme trabajar en sus laboratorios para que este proyecto se realizara.

A las Doctoras Eva María Santos López, María Elena Páez Hernández, Iraís Sánchez Ortega y Reyna Nallely Falfán Cortés por su tiempo, apoyo y conocimiento compartido para que este trabajo se llevara a cabo.

A mis padres Emilio Rosas Flores y Elvia Jiménez Cruz por su confianza, apoyo, amor y esfuerzo que me brindaron en cada momento y en cada paso de esta etapa.

A mis amigos Ana Karen, Angélica, Elizabeth, Dayana, Jazmín, Estefani, Eduardo, Néstor y Javier por ser parte de esta etapa de mi vida, por todos y cada uno de los momentos que compartimos. Gracias por el tiempo, apoyo y amistad que cada uno de ustedes me han brindado. Y por haber hecho de la universidad una de las mejores etapas en mi vida.

A CONACYT por la beca otorgada.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, Emilio Rosas Flores y Elvia Jiménez Cruz, por apoyarme incondicionalmente en cada etapa de mi vida, por su amor, esfuerzo, trabajo y sacrificio y confianza a través de estos años para ver forjado un sueño y una meta y sobre todo por creer en mí en todo momento.

Gracias por que este logro también es suyo.

Ricardo Rosas Jiménez

Contenido

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Marco teórico.....	4
3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos	4
3.2 Procesamiento y conservación de alimentos.....	6
3.3 Beneficios del procesamiento de los alimentos.....	11
3.4 Desventajas del procesamiento de los alimentos	12
3.5 Conservadores artificiales.....	13
3.6 Conservadores naturales	16
3.7 Mecanismo de acción de los antimicrobianos naturales	21
3.8 Antimicrobianos naturales empleados en alimentos.....	23
3.9 Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	25
3.9.1 Cultivo.....	25
3.9.2 Producción en México y el mundo.....	25
3.9.3 Uso en alimentos y medicinas locales y tradicionales.....	26
3.9.4 Composición química y propiedades de la Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) ...	27
3.10 Propiedad antimicrobiana y antioxidante de los cálices de Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	34
4. Justificación.....	36
5. Objetivo general.....	37
6. Objetivos específicos	37
7. Metodología.....	38
7.1 Muestra	38
7.2 Obtención de cepas deterioradoras de frijoles y cepas patógenas.....	38
7.3 Caracterización de las dos cepas de bacterias deterioradoras aisladas de frijol. 38	
7.4 Obtención de extractos de <i>Hibiscus Sabdariffa</i>	39
7.5 Preparación de solución de los extractos <i>Hibiscus sabdariffa</i>	39
7.6 Actividad antimicrobiana.....	39
7.7 Evaluación del deterioro de frijoles adicionados con extracto acetónico al 2% y 10% de <i>Hibiscus sabdariffa</i> , evaluado durante 72 horas a 37°C	40

7.8	Efecto del extracto acetónico al 10% sobre la vida útil de frijoles refritos almacenados a temperatura ambiente.....	40
7.9	Estudio estadístico	41
8.	Resultados y discusión.....	42
8.1	Aislamiento y caracterización de cepas deterioradoras de frijoles.....	42
8.2	Evaluación de los extractos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> frente a bacterias patógenas 49	
8.3	Evaluación de los extractos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> al 2% y 10% frente a bacterias deterioradoras de frijol.....	53
8.4	Evaluación del deterioro de frijoles cocidos adicionados con extracto acetónico al 2% y 10%, evaluado durante un periodo de 72 horas.....	56
8.5	Evaluación del efecto del extracto acetónico al 10% sobre la vida útil de frijoles refritos almacenados a temperatura ambiente a las 0, 8, 24, 48 y 72 horas	58
9.	Conclusiones.....	60
10.	Bibliografía.....	61

1. Resumen

Se evaluó el efecto antimicrobiano de cuatro extractos de *Hibiscus sabdariffa* ante el desarrollo de bacterias patógenas (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*) y bacterias deterioradoras de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su caracterización. El efecto antimicrobiano de los extractos de *H. sabdariffa* se evaluó mediante la técnica de difusión en placa con discos, mientras que la caracterización de las cepas deterioradoras se evaluó mediante pruebas bioquímicas y tinción de Gram. Para la caracterización de las bacterias deterioradoras de frijol se aislaron las cepas en agar métodos estándar, obteniendo dos tipos de cepas de bacterias, las cuales se evaluaron mediante la técnica de tinción de Gram, resultando la presencia de bacterias Gram negativas, posteriormente se aislaron en Agar Rojo Violeta Bilis, Agar Eosina y Azul de Metileno y Agar Mac Conkey mediante la técnica de estría cruzada, y de estas se realizaron las pruebas bioquímicas en Agar Citrato de Simmons, Agar de Hierro lisina y Agar Hierro y triple azúcar. Para el caso del efecto antimicrobiano de los extractos de *H. sabdariffa* frente a bacterias patógenas y las bacterias deterioradoras de frijol (*Phaseolus vulgaris*), el extracto acetónico fue quien presentó mayor efecto inhibitorio con halos de inhibición de 21.84 ± 0.36 mm para *S. typhimurium*, 23.42 ± 1.11 mm para *E. coli*, 24.72 ± 0.81 mm para *S. aureus* y 24.42 ± 2.83 mm para *L. monocytogenes*, 8.11 ± 0.60 mm para la cepa blanca y 9.11 ± 3.35 mm para la cepa cristalina. Por otra parte se realizó la evaluación del deterioro de frijoles cocidos adicionados con extracto acetónico al 2% y 10%, observándose un mejor resultado de conservación con el extracto acetónico al 10%. Por último se evaluó el efecto del extracto acetónico de *H. sabdariffa* al 10% en frijol refrito almacenado a temperatura ambiente, en el cual se observó que las muestras no presentaron crecimiento microbiano, sin embargo se observaron modificaciones en el sabor y color de los frijoles al ser adicionados con los extractos de *H. sabdariffa*.

2. Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) pertenece a la familia *Fabacea*, subfamilia *Papilionoideae* y especie *Phaseolus vulgaris* L. (Lara-Flores 2015). Es una de las fuentes más importantes de proteína (20-25%), vitaminas como la tiamina y ácido fólico y minerales como el magnesio, zinc, hierro y fósforo, además, es una excelente fuente de carbohidratos y de fibra tanto soluble como insoluble (Rodríguez-González and Fernández-Rojas 2015).

El frijol es considerado un “alimento funcional”; es decir, un alimento que además de aportar nutrientes, aporta otras sustancias que tienen un efecto benéfico sobre la salud del consumidor. Esto es debido a que en su composición se ha determinado la presencia de fitatos, flavonoides, cumarinas, triterpenos, lignanos, fenoles y oligosacáridos que han sido identificados como elementos protectores contra factores que estimulan el crecimiento de tumores y, además, ayudan a reducir el riesgo de padecer otras enfermedades crónico-degenerativas (Rodríguez-González and Fernández-Rojas 2015).

El frijol en México es considerado un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país (Secretaría de Economía 2012). Es el segundo producto más importante en el sector agroalimentario, no sólo por ser una fuente de ingresos para miles de productores, sino también por ocupar un lugar importante dentro de la dieta de la población, principalmente la de los estratos sociales de menores ingresos (Rodríguez-Licea et al. 2010). El consumo per cápita de frijol en México es de 9.9 kg y la producción nacional cubre casi la totalidad de los requerimientos de consumo de los mexicanos, siendo parte de la canasta básica (SAGARPA 2017). Es cultivado en sistemas, regiones y ambientes tan diversos como América Latina, África, el Medio Oriente, China, Europa, los Estados Unidos, y Canadá (Secretaría de Economía 2012).

De acuerdo a las características nutricionales que presenta el frijol, se trata de un alimento muy susceptible a la descomposición, la cual es una consecuencia del desarrollo de microorganismos en el alimento, los cuales causan modificaciones

en las propiedades y características de los alimentos como son cambios de color, olor y textura, formación de lama, acumulación de gas o espuma y acumulación de líquido exudado (Bibek and Arun 2010).

Es por ello, que se han desarrollado tecnologías y métodos de conservación de alimentos, con la finalidad de contrarrestar la acción de microorganismos tanto patógenos como deterioradores con el objetivo de prolongar la vida útil de estos y evitar la intoxicación por su ingesta (Pisoschi et al. 2018).

Uno de ellos es el procesamiento térmico de los alimentos, el cual implica someterlos a temperaturas comprendidas entre 60-100 °C por varios minutos. Durante este tratamiento, la energía térmica se transfiere a los alimentos en grandes cantidades que pueden tener efectos organolépticos y nutricionales no deseados. Otro es el uso de conservantes químicos, los cuales tienen la finalidad es prevenir el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias (Badui Dergal, 2006) como los nitratos, benzoatos, sulfitos, sorbatos y formaldehído, los cuales son conocidos por sus efectos adversos en la salud del consumidor (Pisoschi et al. 2018).

No obstante, las preocupaciones sobre los riesgos para la salud por el uso de conservantes sintéticos y el uso de procesos de conservación térmicos, que conllevan a la modificación de las características nutricionales y sensoriales de los alimentos, actualmente se está abogando por la aplicación de conservantes naturales, como alternativa a estos procesos, para garantizar la inocuidad de los alimentos sin afectar los estándares de calidad alimentaria (nutricional y sensorial-sabor, olor, color, textura) (Pisoschi et al. 2018). Es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano de extracto metanólico, acetónico, etanólico y acuoso de *H. sabdariffa* ante el desarrollo de microorganismos deterioradores de frijoles y microorganismos patógenos, y su uso como conservadores en frijoles preparados.

3. Marco teórico

3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etcétera (González Flores and Rojas Herrera 2005).

Los microorganismos pueden llegar a los alimentos en cualquier momento, desde que son producidos en el campo hasta que son servidos. Cuando aquéllos sobreviven y se multiplican pueden causar enfermedades en los consumidores. La contaminación es difícil de detectar, ya que generalmente no se altera el sabor, el color o el aspecto de los alimentos (Organización Mundial de la Salud (OMS) 2015).

En los países en vías de desarrollo es frecuente la incidencia de diversas enfermedades causadas por la ingesta de alimentos que no reúnen la calidad e inocuidad apropiada. Esto puede ocurrir en los alimentos de consumo popular, como en la venta de alimentos en las calles o negocios públicos, así como también a nivel de la preparación de los alimentos en el hogar (Kopper et al. 2009).

Las ETA pueden presentarse de dos formas: 1) como intoxicaciones o 2) como infecciones causadas por distintos microorganismos patógenos como se muestra en la tabla 1. Las infecciones transmitidas por alimentos, se producen por la ingestión de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales para la salud, como virus, bacterias y parásitos, por ejemplo, *Salmonella*, virus de la hepatitis A, *Triquinella spirallis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sp.*, *Listeria monocytogenes*, entre otros (Organización Mundial de la Salud (OMS) 2015).

Por otra parte, la intoxicación causada por alimentos, se produce por la ingestión de toxinas o venenos que se encuentran presentes en el alimento ingerido, y que han sido producidas por hongos o bacterias, aunque éstos ya no se hallen en el alimento, por ejemplo, la toxina botulínica, la enterotoxina de *Staphylococcus*, entre otros (Organización Mundial de la Salud (OMS) 2015).

Tabla 1. Enfermedades microbianas de origen alimentario y patógenos causantes.

Tipo	Enfermedad	Microorganismos causantes	Grupo microbiano	Tipo de síntoma principal
Intoxicación	Envenenamiento por <i>Staphylococcus</i>	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria Gram positiva	Vómito y diarrea
	Botulismo	Cepas de <i>Clostridium botulinum</i>	Bacteria Gram positiva	Neurológico
	Envenenamiento por micotoxinas	Cepas productoras de micotoxinas como <i>Aspergillus flavus</i>	Mohos	Carcinogénico, hepatotóxico
Infección	Salmonelosis	Más de 2000 serovares de <i>Salmonella</i> entérica	Bacteria Gram negativa	Diarrea
	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>E. coli</i> O26:H11	Bacteria Gram negativa	Diarrea hemorrágica
	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	<i>E. coli</i> O111:H12	Bacteria Gram negativa	Diarrea hemorrágica
	Shigelosis	Cuatro especies de <i>Shigella</i> (p.ej. <i>Shigella dysenterae</i>)	Bacteria Gram negativa	Diarrea con moco y sangre
	Gastroenteritis por <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cepas patógenas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Bacteria Gram negativa	Diarrea, hepatitis
	Brucelosis	<i>Brucella abortus</i>	Bacteria Gram negativa	Gástrica y no gástrica
	Listeriosis	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacteria Gram positiva	Fiebre, meningitis, aborto, diarrea
Toxicoinfección	Gastroenteritis por <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Bacteria Gram positiva	Diarrea, vómito
	Gastroenteritis por <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Bacteria Gram positiva	Diarrea, vómito
	Gastroenteritis por <i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> enterocitogénica serotipo O15:H11	Bacteria Gram negativa	Diarrea del viajero
	Cólera	<i>Vibrio Cholerae</i>	Bacteria Gram negativa	Diarrea

Fuente: Bibek and Arun 2010.

Las ETA constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan (González Flores and Rojas Herrera 2005).

Existen grupos como los niños, los ancianos y las mujeres embarazadas que, por su baja resistencia a las enfermedades, son altamente vulnerables a las ETA. En estos casos las precauciones deben extremarse, pues las consecuencias de las ETA pueden ser severas, dejando secuelas o incluso hasta provocando la muerte (Organización Mundial de la Salud (OMS) 2015). Por esta razón el procesamiento así como la conservación de los alimentos se han convertido en un punto importante no solo para minimizar las ETA mediante la aplicación de tecnologías encargadas de prolongar la vida útil y disponibilidad de los alimentos para el consumo humano, protegiéndolos de microorganismos patógenos y otros agentes responsables de su deterioro y así permitir su consumo futuro, siempre tomando en cuenta que las propiedades organolépticas y nutricionales del alimento se vean modificadas lo mínimamente posible (Aguilar Morales 2012).

3.2 Procesamiento y conservación de alimentos

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud, los productos alimenticios procesados provienen de la elaboración industrial, en la cual se añade sal, azúcar u otros ingredientes culinarios a alimentos sin procesar o mínimamente procesados, o sometidos a tratamientos térmicos o no térmicos con el fin de preservarlos o mejorar sus propiedades organolépticas. Por el contrario, los productos ultra procesados se definen como productos listos para consumir que se componen de sustancias extraídas de los alimentos como aceites, grasas, azúcar y proteínas, derivados de constituyentes de los alimentos como grasas hidrogenadas, almidones modificados o sintetizados de materiales orgánicos como los aromatizantes, potenciadores del sabor y otros aditivos utilizados para alterar las propiedades sensoriales del alimento (Nieto-Orozco et al. 2017).

En la actualidad existen diversos procesos que son empleados para la conservación de alimentos como lo son el enfriamiento, la congelación, reducción de la actividad de agua, restricción de nutrientes, acidificación, fermentación, pasteurización o conservadores sintéticos, así como también, la aplicación de nuevas tecnologías para evitar o retrasar el crecimiento microbiano, como el envasado en atmósfera controlada, películas activadas, tratamientos no térmicos, irradiación, envasado en atmósfera modificada, etc. Sin embargo, la mayoría de estos procedimientos pueden causar la pérdida de las propiedades organolépticas de los alimentos y reducir la aceptación del consumidor. Por lo tanto, las demandas de los consumidores se centran cada vez más en productos alimentarios mínimamente procesados, con menos uso de aditivos sintéticos y al mismo tiempo sin comprometer la seguridad alimentaria (Negi 2012).

Dentro de los tratamientos para la conservación de los alimentos se encuentran los tratamientos térmicos como la pasteurización y esterilización térmica, las cuales son las dos operaciones unitarias más comunes utilizadas para procesar y conservar los alimentos en el mundo (Barbosa and Bermúdez 2010).

El propósito de la pasteurización es eliminar al máximo los riesgos de bacterias patógenas que causan daño a la salud del consumidor y microorganismos deterioradores de los alimentos. La pasteurización debe ser acompañada de un rápido enfriamiento para eliminar los microorganismos patógenos; se trata de un tratamiento relativamente suave, ya que maneja temperaturas inferiores a los 100°C. Se utiliza para prolongar la vida útil de los alimentos durante varios días o meses. Se emplean temperaturas de 60°C-65°C por tiempos prolongados (de 3 a 4 horas) o de 75°C-90°C y tiempos muy cortos (2-5 min.). El proceso de pasteurización requiere que los alimentos se mantengan a bajas temperaturas, en promedio de 4°C (Aguilar Morales 2012).

Por otra parte, la esterilización es la operación unitaria en la que los alimentos son calentados a una temperatura suficientemente elevada y durante un tiempo suficientemente largo, alrededor de 121°C durante 15 minutos, y es utilizada para

los productos alimenticios de baja acidez ($\text{pH} > 4.6$), la cual inactiva esporas y extiende la vida útil del producto por varios meses (Fellows 1994).

El objetivo primordial del tratamiento térmico de los alimentos es asegurar la destrucción de todos los organismos vivos capaces de deteriorarlos o de perjudicar la salud del consumidor, además de que se debe tener en cuenta que durante el tratamiento térmico es necesario conservar las cualidades organolépticas y nutritivas del alimento cuanto más sea posible (Fellows 1994). Sin embargo, a pesar de los beneficios del tratamiento térmico, una serie de cambios tienen lugar en el producto que altera su calidad final, por ejemplo, sabor, color, textura y aspecto general (Barbosa and Bermúdez 2010). Esto se debe a que la temperatura trabaja como un catalizador en algunas reacciones químicas actuando en los pigmentos, sales minerales, proteínas, vitaminas, aminoácidos, grasas y otros productos químicos que se encuentran en los alimentos promoviendo una serie de cambios físicos y químicos. Pardeamiento, oxidación, desnaturalización de las proteínas, coagulación o precipitación, cambios en la microestructura y textura final, gelificación, pérdida de color y sabor, pérdida de funcionalidad, retrogradación del almidón, y procesos químicos relacionados se producen en los componentes del alimento durante el tratamiento térmico (Barbosa and Bermúdez 2010).

Otro de los métodos de conservación y procesamiento de alimentos más utilizados es la adición de aditivos alimentarios, los cuales de acuerdo con la norma CODEX STAN 192-1995 se entiende como aditivo alimentario cualquier sustancia que en como tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en las etapas de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye “contaminantes” o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las

calidades nutricionales (Stan 2011). Algunos ejemplos de aditivos alimentarios se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Aditivos alimentarios utilizados en la industria alimentaria.

Aditivo alimentario	Acción
Antiespumantes	Previenen o reducen la formación de espuma.
Antihumectantes / Antiaglutinantes	Reducen las características higroscópicas de los alimentos y disminuyen la tendencia de las partículas individuales a adherirse unas a las otras.
Antioxidantes	Retardan la aparición de alteración oxidativa del alimento.
Colorantes	Confieren, intensifican o restauran el color del alimento.
Conservadores	Impiden o retardan la alteración de los alimentos provocada por microorganismos o enzimas.
Edulcorantes	Aportan sabor dulce al alimento sin ser azúcares.
Espesantes	Aumentan la viscosidad de los alimentos.
Gelificantes	Dan textura a través de la formación de un gel.
Estabilizantes	Hacen posible el mantenimiento de una dispersión uniforme de dos o más sustancias inmiscibles en un alimento.
Aromatizantes/ Saborizantes	Refuerzan el aroma, y/o el sabor de los alimentos.
Reguladores de la acidez	Alteran o controlan la acidez o alcalinidad de los alimentos.
Acidulantes	Aumentan la acidez y/o dan un sabor ácido a los alimentos.
Emulsionantes/ Emulsificantes	Hacen posible la formación o mantenimiento de una mezcla uniforme de dos o más fases inmiscibles en el alimento.
Mejoradores de la harina	Agregadas a la harina, mejoran su calidad tecnológica.
Potenciadores del sabor	Resaltan o realzan el sabor y/o el aroma de un alimento.
Leudantes químicos	Aumentan el volumen de la masa por liberación de gas.
Agentes de firmeza o endurecedores o texturizantes	Vuelven o mantienen los tejidos de frutas u hortalizas firmes o crocantes, o interactúan con agentes gelificantes para producir o fortalecer un gel.
Secuestrantes	Forman complejos químicos con los iones metálicos.
Espumantes	Posibilitan la formación o mantenimiento de una dispersión de una fase gaseosa en un alimento líquido o sólido.

Fuente: (Stan 2011)

Por otra parte, la aplicación de nuevas tecnologías en el ámbito de la conservación de alimentos pretende dar respuesta al incremento de la demanda, por parte de los consumidores, de alimentos más parecidos a los frescos o naturales, más nutritivos y de fácil y rápida preparación, pero a la vez microbiológicamente seguros y estables. Las tecnologías más estudiadas en la actualidad se basan en el empleo de sistemas de destrucción o inactivación bacteriana sin necesidad de emplear un tratamiento térmico intenso (Marco-Molés et al. 2009).

Durante el procesamiento no térmico de los alimentos, la temperatura se mantiene por debajo de las temperaturas utilizadas con los tratamientos térmicos, con ello se pretende que la degradación de la calidad del alimento sea menor, así como también que las vitaminas, nutrientes esenciales y aromas no experimenten cambios o que estos sean mínimos (Calderón Miranda et al. 1998).

Dentro de las nuevas tecnologías utilizadas para la conservación de alimentos se encuentran: las altas presiones hidrostáticas, altas presiones de homogeneización, campos eléctricos pulsados, campos magnéticos, irradiación, ultrasonidos, campos magnéticos oscilantes, tecnologías de barrera, entre otras, así como tratamientos combinados y nuevas tendencias de envasado (Marco-Molés 2011). Aunque en algunos casos, la temperatura podría ser utilizada en combinación con algunas de estas nuevas tecnologías de conservación para mejorar la eficacia del proceso, la mayor parte de la investigación se ha realizado a temperatura ambiente, y debido a los tiempos de procesamiento extremadamente cortos, las propiedades y características de los alimentos se ven modificadas mínimamente (Barbosa and Bermúdez 2010).

La industria alimentaria se encuentra en una nueva etapa de desarrollo e implementación de nuevos métodos de procesamiento de alimentos, desarrollando así nuevos ingredientes, mejorando de forma continua los procesos de elaboración e implementando nuevas tecnologías de procesado, alternativas a los tratamientos térmicos convencionales, que permitan conseguir alimentos seguros pero que conserven las propiedades nutritivas y organolépticas de los alimentos frescos, adaptándose mejor así al tipo de alimentos demandados actualmente por

el consumidor, es por ello que en las últimas décadas, se ha despertado un creciente interés en las técnicas de preservación no térmicas capaces de inactivar microorganismos y enzimas causantes del deterioro de los alimentos (Marco-Molés 2011).

3.3 Beneficios del procesamiento de los alimentos

La industria alimentaria ha evolucionado a lo largo de los años desarrollando técnicas modernas de producción y procesamiento de alimentos, los cuales ofrecen beneficios al consumidor, entre ellos: la obtención de productos lo más parecido al alimento fresco permitiéndole al consumidor tener alimentos con una vida de anaquel amplia mediante una combinación de factores de conservación, debido a que en la actualidad, los consumidores demandan alimentos de mayor calidad, más frescos, más naturales, nutrimentalmente saludables y seguros y con menos aditivos artificiales, lo que ha generado el desarrollo de lo que se conoce como alimentos mínimamente procesados (AMP) (Aguilar Morales 2012).

Por otra parte, la conservación de alimentos, en particular de frutas y hortalizas, permite disponer de ellos fuera de su temporada, distribuirlos a diferentes mercados, tanto nacionales como extranjeros, pero lo más importante, permite reducir las pérdidas que se generan debido a su carácter altamente perecedero (Aguilar Morales 2012).

Así también, las tecnologías de procesamiento y envasado les permiten a los fabricantes ofrecer opciones más prácticas y a menudo más accesibles en comparación con los productos frescos, además de que aumenta la vida de anaquel de estos, el uso de empaques u otros medios de contención facilita la manipulación y transporte los alimentos, lo que redundará en la posibilidad de grandes volúmenes de distribución y venta de los alimentos. Por otra parte, el procesamiento permite la modificación de sabores y características de los alimentos para mejorar su palatabilidad, lo que favorece su aceptación ante los consumidores (González-Castell et al. 2007).

3.4 Desventajas del procesamiento de los alimentos

Por otra parte, existen efectos negativos generados por el procesamiento de los alimentos, entre los cuales se encuentran: los cambios tanto en la composición nutricional como en las características sensoriales del alimento, como lo es el caso del uso la pasteurización, esterilización y otros procesos térmicos utilizados (Torres Carmona 2018).

El refinado es un proceso común para muchos alimentos procesados, en el cual se desechan ciertas partes del alimento para mejorar su aspecto físico, la palatabilidad entre otras, es por ello que se toma como un inconveniente, debido a que reduce el contenido total de nutrientes al ser eliminadas algunas de las partes del alimento (Torres Carmona 2018).

La conservación de los alimentos implica la adición de aditivos, los cuales pueden ser nocivos para la salud del consumidor, como es el caso del uso de nitritos y nitratos en la conservación de embutidos, carnes, verduras, pescado, entre otros productos, los cuales son muy favorables para evitar posibles casos de botulismo, además de favorecer al aspecto de los alimentos como en el caso del jamón y las salchichas, sin embargo su consumo en exceso, puede fomentar procesos cancerígenos en el cuerpo, al transformarse en nitrosaminas en el estómago (Torres Carmona 2018).

Otro caso similar es la utilización de los sulfitos, los cuales son utilizados para la conservación de vinos, evitando así el desarrollo de bacterias y alargando la vida útil de estos, sin embargo, el consumo de sulfitos en exceso puede provocar dolores de cabeza, náuseas y una menor absorción de vitaminas del grupo B (Torres Carmona 2018).

Por otra parte, se han relacionado muchas de las enfermedades crónicas que afligen a la sociedad hoy en día con el consumo de alimentos procesados, como el cáncer, la hipertensión y los trastornos cardiovasculares. Un ejemplo de ello es la depresión, la cual, de acuerdo con un estudio realizado por la Universidad de

Londres, revelaron que las personas que consumían más alimentos procesados, tenían un 58% de probabilidad de desarrollar depresión, así también el consumo de carne procesada ha demostrado un alto porcentaje de incidencia con el desarrollo de cáncer (Hernández-Hernández 2015).

3.5 Conservadores artificiales

Los conservadores alimentarios son compuestos químicos o sustancias que pueden retrasar el crecimiento microbiano o causar la muerte microbiana en una matriz alimentaria. Los principales objetivos para estos conservadores son los microorganismos o agentes infecciosos y productores de toxinas y los microorganismos causantes de deterioro de los alimentos, cuyos productos finales metabólicos o enzimas causan olores desagradables, sabores no deseados, problemas de textura y decoloración (Negi 2012).

En esta clasificación se prefiere excluir el azúcar, alcohol, vinagre y especias, a pesar de que se han usado desde la antigüedad para este fin, tal vez porque su función sea más importante respecto al sabor que imparten. También se excluyen plaguicidas ya que estos son agentes que no se añaden intencionadamente, siendo entonces contaminantes si es que se encuentran presentes en alimentos (Valle Vega and Lucas Florentino 2000).

Un conservador ideal sería aquel que inhibe hongos, levaduras y bacterias, que no sea tóxico para el ser humano, fácilmente biotransformable por el hígado, no acumulable en el medio ambiente, o en organismos vivos, soluble en agua, estable, que no imparta sabor, ni olor y que sea de bajo costo. Es por demás mencionar que tal compuesto no existe; sin embargo, hay que recordar que el uso de conservadores no debe de ser un sustituto de las "Buenas Prácticas de Manufactura", no deben ser usados para ocultar los defectos de proceso o hacer pasar por buenos, alimentos descompuestos (Valle Vega and Lucas Florentino 2000). En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de conservadores químicos usados en la industria alimentaria.

Tabla 2. Conservadores químicos usados en la industria alimentaria.

Conservador	Características	Usos	Enfermedades
Benzoatos	Son las sales del ácido benzoico. El pH óptimo para tener actividad antimicrobiana es de 2.5 a 4.0. Se encuentran naturalmente en arándanos, ciruela pasa, clavo y canela (Badui 2006).	Se emplean como aditivos en productos grasos como margarina, mayonesa y productos elaborados a base de huevo. También se usan en frutas, verduras y bebidas (Fuentes, García, and Fernández 2012).	En personas sensibles a estas sustancias se manifiestan síntomas típicos de una alergia, principalmente en forma de urticaria. También se les ha asociado a la irritación de la mucosa gástrica (Fuentes et al. 2012).
Parabenos	Su acción antimicrobiana es directamente proporcional a la longitud de la cadena, pero la solubilidad decrece al aumentar ésta. Comúnmente se emplean como una mezcla de ellos mismos (ésteres de metilo y los de propilo) (Valle Vega and Lucas Florentino 2000).	Se usan en relleno de pasteles, refrescos, jugos, aderezos, ensaladas, jaleas con edulcorantes artificiales (Valle Vega and Lucas Florentino 2000).	La concentración normal de uso es de 0.1%. Sin embargo, esta concentración también puede ejercer un efecto de anestesia local, se consideran vasodilatadores y espasmolíticos (Valle Vega and Lucas Florentino 2000).
Propionatos	Los propionatos fueron los primeros ácidos grasos monocarboxílicos usados como agentes antimicrobianos en alimentos y son fácilmente biotransformados por el organismo por ser un ácido graso (Valle Vega and Lucas Florentino 2000).	Su acción principal es contra hongos, pero no se recomiendan para levaduras o bacterias. Se usan para evitar descomposición de panadería por <i>Bacillus subtilis</i> o <i>Bacillus mesentericus</i> (Valle Vega and Lucas Florentino 2000).	Se les considera como "GRAS" (Valle Vega and Lucas Florentino 2000).
Sorbatos	Pertencen a los ácidos grasos monocarboxílicos, siendo el ácido y la sal de potasio los más usados (Valle Vega and Lucas Florentino 2000). El ácido sórbico y sus sales (sorbatos) son ampliamente utilizados por su baja toxicidad y por no poseer olor ni sabor a las concentraciones a las que se utiliza como aditivo alimentario (Fuentes et al. 2012).	Se emplean principalmente en productos de panadería, lácteos, zumos de frutas, mermeladas, frutos secos, pescado, salsas y vino (Fuentes et al. 2012). Son usados como fungicidas en alimentos y empaques. Se usan contra levaduras y hongos como <i>Clostridium botulium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella</i> (Valle Vega and Lucas Florentino 2000). El sorbato de potasio se puede utilizar para la conservación de frijoles procesados, para inhibir el crecimiento de hongos, levaduras y	Se consideran "GRAS", ya que se biotransforman a CO ₂ , agua y energía (Valle Vega and Lucas Florentino 2000).

		algunas bacterias (De la Cruz Recinos 2010).	
Acido acético y acetatos	<p>El ácido acético es producido debido a la capacidad de <i>Acetobacter</i> para oxidar el etanol a ácido acético (Badui 2006).</p> <p>Comercialmente se obtiene por fermentación del azúcar, melazas o por síntesis química del acetaldehído (Villeda Moreno 2010).</p>	<p>Se usa para controlar el desarrollo de bacterias y levaduras, y en menor grado de hongos, en productos cárnicos que se almacenan por corto tiempo (Badui 2006).</p> <p>Se emplea en ensaladas, mayonesas, aderezos, salsas, encurtidos, carnes, pescados y muchos otros (Badui 2006).</p>	Este ácido no es tóxico en las concentraciones generalmente empleadas (muy variables, pero no mayor de 3%). Sin embargo, a concentraciones muy elevadas causa en humanos irritación de ojos y de las vías respiratorias (INSHT 2010)
Sulfitos y dióxido de azufre	Los sulfitos agrupan compuestos muy hidrosolubles en los que destacan los sulfitos de sodio y de potasio (Na_2SO_3 y K_2SO_3), los bisulfitos (NaHSO_3 y KHSO_3) y los metabisulfitos ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$). El dióxido de azufre o anhídrido sulfuroso (SO_2), es un gas incoloro de fuerte olor que se genera por la combustión del azufre. Inhiben el oscurecimiento enzimático y no enzimático en alimentos (Badui 2006).	Ejercen una acción antimicrobiana en hongos, levaduras y bacterias. Se suelen utilizar en vinagre, vinos, cerveza, refrescos, conservas de vegetales, encurtidos, carne picada, legumbres, mariscos, congelados, galletas, entre otros (Badui 2006).	A concentraciones bajas menores a 5 ppm se han descrito ligeras irritaciones y molestias del tubo digestivo e inactivar a la vitamina B. A dosis elevadas puede provocar dolores de cabeza, náuseas, vómitos y asma (INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo) 2006).
Nitritos y nitratos	Se les emplean como sales de curación en la elaboración de embutidos, ya que permiten la formación y estabilización del color rojo característico de la carne curada (Badui 2006).	Inhiben el crecimiento de bacterias patógenas como <i>Clostridium botulinum</i> , contribuyen al desarrollo del aroma típico de la carne curada y ejercen un efecto antioxidante, retardando el desarrollo de la rancidez y evitando la aparición de alteraciones de las características sensoriales de las carnes curadas (Ventanas et al. 2004).	El consumo excesivo produce cianosis en los niños debido a la metahemoglobina sintetizada en la sangre. Por otra parte, en sistemas modelo, se ha observado que estos aditivos reaccionan con aminos secundarias y terciarias y producen nitrosaminas, agentes considerados mutagénicos y cancerígenos (Badui 2006).
Epóxidos	Los epóxidos más usados como conservadores, son los óxidos de etileno y de propileno, los cuales son bacteriostáticos y bactericidas. Al tratamiento con epóxidos también se le llama "esterilización en frío", debido a que puede lograrse una esterilización comercial del producto sin emplear temperaturas elevadas (Badui 2006).	Se usan en alimentos de baja humedad o deshidratados, especias, condimentos, entre otros. Su acción es muy amplia y variada, ya que destruyen toda clase de microorganismos, incluso esporas y virus (Badui 2006).	

En el caso particular del procesamiento de frijoles preparados industrialmente, se suelen utilizar métodos de conservación como la esterilización y el empacado a vacío, sin embargo de acuerdo con De la Cruz Recinos (2010) se puede implementar el uso de sorbato de potasio como conservador para inhibir el crecimiento de hongos, levaduras y algunas bacterias. Normalmente las dosis recomendadas para sorbato de potasio varían en el rango de 200 ppm a 1000 ppm que es la máximo permitido (De la Cruz Recinos 2010).

3.6 Conservadores naturales

Además de los conservadores químicos, los cuales son los más empleados en la industria alimentaria, existen muchos compuestos que igualmente restringen el crecimiento microbiano mediante diferentes mecanismos. Algunos de ellos se encuentran en forma natural en diversos productos, como aceites esenciales, plantas y especias (Badui 2006).

Durante la búsqueda de nuevos conservadores, se han encontrado agentes antimicrobianos de origen natural, algunos de estos agentes antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias (Ximhai, Nereyda, and Saucedo 2011), los cuales poseen una excelente actividad antimicrobiana como el ajo, orégano, mostaza, canela, albahaca, tomillo, pimienta, mejorana, chile, achiote, cebolla, cilantro, té, limón y naranja (Trujillo Hernández 2015).

La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de plantas superiores ha sido de gran interés en las últimas décadas. Esta área de investigación se enfrenta a muchos problemas debido a diversas metodologías utilizadas en la preparación de extractos de plantas y ensayos antimicrobianos. La propiedad de solubilidad de los metabolitos vegetales extraídos con solventes de diferente polaridad también parece contribuir al resultado de los ensayos antimicrobianos empleados (Othman et al. 2011).

Los antimicrobianos alimentarios generalmente se clasifican en sustancias tradicionales o naturales y sintéticas dependiendo de su origen. Los antimicrobianos se llaman tradicionales cuando se han utilizado durante muchos años y muchos países los aprueban para su inclusión en los alimentos. Aunque muchos antimicrobianos sintéticos se encuentran naturalmente (ácido benzoico en arándanos, ácido cítrico en limones, ácido málico en manzanas, ácido tartárico en uvas, etc.), la percepción de natural se ha vuelto importante para muchos consumidores (Negi 2012).

La biopreservación de los alimentos, se centra en la utilización de conservantes naturales de fuentes como bacterias, hongos, plantas y animales, que tienen la capacidad de garantizar la seguridad alimentaria debido a sus actividades antimicrobianas ejercidas contra un amplio espectro de patógenos transmitidos por los alimentos (Pisoschi et al. 2018).

Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen:

1. Origen animal, los cuales incluyen proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosán (Ximhai et al. 2011).
2. Origen vegetal, los cuales incluyen compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides), terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, saponinas, tiosulfatos y glucosinolatos (Pisoschi et al. 2018) provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Ximhai et al. 2011).
3. Origen microbiano, que incluye compuestos producidos por microorganismos (Ximhai et al. 2011).

En general, se ha demostrado que las plantas ejercen una mejor inhibición sobre bacterias Gram positivas que sobre bacterias Gram negativas. Las características antimicrobianas de productos derivados de planta, generalmente se acompaña de la capacidad antioxidante, la cual es impartida por compuestos fenólicos como el ácido cafeico, flavonoides y glucósidos de flavona, cumarinas, terpenoides, lignanos, polisacáridos, que completa los beneficios farmacológicos de tales extractos. Los extractos de plantas comestibles, hierbas y/o especias como el orégano, canela, clavo de olor, citral, ajo, cilantro, perejil, romero, hierba de limón, salvia y vainillina, se han empleado solos o combinados con otras técnicas de conservación para la preservación de alimentos (Pisoschi et al. 2018). Algunos ejemplos de agentes conservantes de origen natural se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Ejemplo de conservadores naturales utilizados en alimentos.

Conservador	Características y propiedades	Usos
<p>Aceites esenciales</p>	<p>Los aceites esenciales son mezclas naturales de hidrocarburos (terpenos), que contienen alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, lactonas y sustancias orgánicas que contienen azufre como los sulfuros, disulfuros, trisulfuros. Se obtienen principalmente de plantas por destilación a vapor (Pisoschi et al. 2018).</p> <p>La susceptibilidad bacteriana a los aceites esenciales aumenta con la reducción del pH del alimento, ya que a pH bajo aumenta la hidrofobicidad del aceite, lo que permite que se disuelva más fácilmente en los lípidos de la membrana celular de las bacterias (Negi 2012).</p>	<p>Algunos aceites esenciales de amplio espectro de inhibición usados en alimentos son: el timol presente en tomillo y orégano; el aldehído cinámico de canela; el eugenol de clavos, los cuales presentan actividad inhibitoria a partir de un nivel de 5 g/g (Badui 2006).</p> <p>Estos compuestos tienen una función más prominente como sabor/olor (“flavor”), que como bacteriostáticos, bactericidas o antibióticos; sin embargo esta nueva orientación podría ampliar el uso de químicos que brinden una mayor seguridad al consumidor (Badui 2006).</p>
<p>Ácidos orgánicos</p>	<p>La inhibición del crecimiento microbiano por ácidos orgánicos parece estar relacionado con el mantenimiento del equilibrio ácido-base, la donación de protones y la producción de energía por las células. La célula microbiana normalmente refleja este equilibrio atendiendo al mantenimiento de un pH interno cercano a la neutralidad (Ximhai et al. 2011).</p> <p>Su principal efecto es en la ionización, disociación y permeabilidad de las membranas; inhiben al funcionamiento normal del NADH (Badui 2006).</p>	<p>Algunos ácidos orgánicos utilizados en la conservación de alimentos son: el ácido cítrico, el cual inhibe el crecimiento de <i>Salmonella</i> y <i>Cl. Botulinum</i>, el ácido succínico que disminuye la carga microbiana en pollos, el ácido málico que inhibe el desarrollo de levaduras, el ácido tartárico el cual es usado como regulador de la acidez, el ácido benzoico el cual inhibe el transporte del azufre y la fosforilación oxidativa en las bacterias, el ácido láctico que inhibe el desarrollo de las bacterias esporuladas, pero no el crecimiento de hongos y levadura y el ácido propiónico el cual actúa contra hongos y bacterias (Badui 2006).</p>

Ácidos grasos	Los ácidos grasos de cadena de 12 a 18 carbonos tienen una acción por lo general poco específica ya que aparentemente actúan a nivel de absorción de nutrimentos en la membrana microbiana y alterando su permeabilidad (Badui 2006).	El ácido laurico, mirístico y palmítico actúan contra bacterias; mientras que el ácido cáprico y laurico actúan contra levaduras (Badui 2006).
Oleuropeína	La oleuropeína es un potente antioxidante que ayuda a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares porque inhibe la oxidación de los lípidos en la sangre. Se encuentra presente en la aceituna verde (Badui 2006).	La oleuropeína es activa contra <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y hongos (<i>Geotrichum canlidum</i> , <i>Rhizopus sp</i>) además puede inhibir la producción de aflatoxinas (Badui 2006).
Cafeína	La cafeína es un compuesto químico que se encuentra de forma natural en componentes vegetales como los granos de cacao y café, las hojas de té, las bayas de guaraná y la nuez de cola, cuyo consumo se remonta a muchos años atrás (European Food Safety Authority 2014).	Presenta actividad antimicótica contra <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> a concentraciones de 1 mg/ml, disminuyendo la producción de micotoxinas como las aflatoxinas, ocratoxina y esterigmatocistina, también afecta citrina y patulina (Badui 2006).
Fitoalexinas	Son antimicrobianos sintetizados por las plantas ante un daño físico. Algunos ejemplos de fitoalexinas son: kiertone, genesteína y otros isoflavonoides (Badui 2006).	La zanahoria presenta la fitoalexina 6-metoximellina la cual inhibe hongos y bacterias. La faseolina presente en chícharo es efectiva contra los hongos, pero no para las bacterias (Badui 2006).

3.7 Mecanismo de acción de los antimicrobianos naturales

La mayor parte de los antimicrobianos alimentarios solamente son bacteriostáticos (sistemas de conservación que impiden el desarrollo de gérmenes) o fungistáticos, en lugar de bactericidas (sistemas de conservación que destruyen los gérmenes) o fungicidas, por lo que su efectividad sobre los alimentos es limitada. Por otra parte, debido a que algunos microorganismos pueden no verse inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de antimicrobianos utilizados individualmente, puede ser preferible utilizar una combinación de ellos, ampliando así el espectro de cobertura en la preservación de frutas o alimentos en general (Trujillo Hernández 2015).

El mecanismo de acción para la actividad antimicrobiana de los conservantes naturales no se conoce completamente, sin embargo, diferentes estudios han demostrado la efectividad de estos para controlar o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro, ya que pueden causar la degradación de la pared celular, daño a la membrana citoplásmica y proteínas de membrana, filtración de contenido intracelular, coagulación del citoplasma, entre otros, los cuales pueden causar la muerte celular (Negi 2012).

Los compuestos fenólicos derivados de plantas actúan alterando de la permeabilidad de la membrana celular microbiana, lo que permite la pérdida de biomoléculas del interior de las células (por ejemplo, ribosa y glutamato de sodio) (Pisoschi et al. 2018). Las funciones de membrana afectadas están relacionadas con el transporte de electrones, la absorción de nutrientes, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, y la actividad enzimática (Pisoschi et al. 2018).

Con respecto a la influencia de la estructura fenólica sobre la actividad antimicrobiana, se ha demostrado que los grupos funcionales tales como los grupos hidroxilo promueven la deslocalización de electrones y pueden actuar como intercambiadores de protones, disminuyendo el gradiente de pH a través de la membrana citoplásmica de las células bacterianas. Esto provoca el agotamiento de la reserva de ATP y la muerte celular (Pisoschi et al. 2018).

Los lípidos inactivan los microorganismos principalmente al alterar la membrana celular bacteriana, dificultando la replicación del ADN o inhibiendo otros objetivos intracelulares. En un estudio realizado por Pisoschi *et al* en 2018 describieron que los ácidos grasos con cadenas largas de carbono tienen un efecto inhibitor más poderoso que los ácidos grasos de cadena corta. Y que existe un mayor efecto inhibitor en los ácidos grasos insaturados que los ácidos grasos saturados (Pisoschi *et al.* 2018).

Se ha estudiado el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos, y aunque la membrana celular se considera un objetivo principal, estudios recientes también han identificado objetivos intracelulares. Los péptidos antimicrobianos adoptan estructuras anfipáticas, que interactúan con la membrana celular microbiana. La ruptura de la membrana en algunos lugares da como resultado la lixiviación de biocomponentes celulares esenciales. La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se basa en la generación de poros en la membrana citoplásmica del microorganismo objetivo. El resultado es la pérdida de componentes y iones intracelulares de baja masa molecular (Pisoschi *et al.* 2018).

La eficacia de un compuesto antimicrobiano depende del tipo, género, especie y cepa del microorganismo objetivo, además de los factores ambientales como el pH, la actividad del agua, la temperatura, la composición atmosférica y la carga microbiana inicial del sustrato alimentario (Negi 2012). La naturaleza antimicrobiana de la fitoquímica está determinada por sus propiedades químicas, como el valor de pKa, las relaciones de hidrofobicidad / lipofilicidad, la solubilidad y la volatilidad (Negi 2012). La temperatura de almacenamiento también puede influir en la efectividad del antimicrobiano ya que la difusibilidad de los compuestos está relacionada con la temperatura (Negi 2012).

El pH y la polaridad son los factores más destacados que influyen en la efectividad de un alimento antimicrobiano. La polaridad está relacionada tanto con la ionización de la molécula como con la contribución de cualquier grupo lateral de alquilo o moléculas parentales hidrofóbicas; por lo tanto, es muy importante conocer las características específicas del sistema alimentario que deben

preservarse ya que una gran proporción de lípidos podría limitar la efectividad de algunos agentes antimicrobianos (Negi 2012).

En lo que respecta al uso de antimicrobianos naturales en los alimentos, la falta de reproducibilidad de su actividad es uno de los principales obstáculos, a pesar de la gran diversidad de compuestos que contienen. Las variaciones cualitativas y cuantitativas en el contenido de fitoquímicos bioactivos en extractos de plantas dan como resultado su efectividad variable (Negi 2012).

3.8 Antimicrobianos naturales empleados en alimentos

Las plantas comestibles, medicinales, herbales y sus correspondientes aceites esenciales y subproductos como los hidrosoles, así como los metabolitos secundarios, son capaces de retrasar o inhibir el desarrollo de bacterias, levaduras y mohos (Pisoschi et al. 2018). En la Tabla 4 se presentan algunas aplicaciones de antimicrobianos naturales utilizados en la preservación de alimentos.

Los principales compuestos presentes en los aceites esenciales, que imparten propiedades antimicrobianas de plantas, incluyendo hierbas y especias son compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides), terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, saponinas, tiosulfatos, glucosinolatos (Pisoschi et al. 2018).

Las actividades antimicrobianas de los extractos de plantas pueden residir en la variedad de componentes fitoquímicos que contienen. La actividad antibacteriana probablemente se deba a los efectos combinados de la adsorción de polifenoles a las membranas bacterianas con disrupción de la membrana y la posterior filtración de contenido celular y la generación de hidroperóxidos a partir de polifenoles. Los extractos de plantas también mostraron actividad antifúngica contra una amplia gama de hongos, actividades antioxidantes e inhibieron la oxidación de lípidos en alimentos (Negi 2012).

Las hierbas y las especias alimentarias se han utilizado tradicionalmente como aditivos alimentarios en todo el mundo no solo para mejorar las características sensoriales de los alimentos, sino también para prolongar su vida útil al reducir o eliminar la supervivencia de las bacterias patógenas, esto es debido a que las hierbas y especias son ricas en compuestos fenólicos y, además de ejercer un efecto antimicrobiano, pueden preservar los alimentos al reducir la oxidación de los lípidos ya que tienen una actividad antioxidante significativa (Negi 2012).

Tabla 4. Antimicrobianos naturales usados en la preservación de alimentos.

Producto	Actividad	Uso
Cebolla	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Contra bacterias Gram positivas pertenecientes al género <i>Bacillus</i>, <i>Micrococcus</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Streptococcus</i>, así como bacterias Gram negativas, como <i>Salmonella enteridis</i> y cepas de <i>E. coli</i>. ✓ La actividad contra levaduras y antifúngica se le ha atribuido a la presencia de compuestos con organosulfuro que inhiben el crecimiento de levaduras y hongos, tales como <i>Candida albicans</i>, <i>Aspergillus niger</i>, <i>Penicillium cyclopium</i> o <i>Fusarium oxysporum</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ingrediente en alimentos procesados o cocidos. ✓ Retardar el deterioro de los productos cárnicos. ✓ Agente antibrowning que evitan que las verduras y frutas se deterioren debido al proceso posterior a la cosecha.
Ajo fresco, ajo en polvo, aceite de ajo.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Efectos antioxidantes y antimicrobianos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Conservación de productos cárnicos.
Extracto de romero	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Contra <i>Campylobacter jejuni</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Carne de pollo.
Aceite esencial de canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Propiedades antimicrobianas contra la bacteria <i>Escherichia coli</i> y <i>Clostridium perfringens</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Salchicha cocida.
Aceites esenciales de <i>Ocimum basilicum</i> y <i>Origanum vulgare</i> .	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Actividad antimicrobiana contra <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Salchicha de pollo.
Aceites esenciales de albahaca, laurel, pimienta negra, canela, comino, ajo, limón, nuez moscada, naranja, orégano, perejil, romero, estragón y tomillo.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Efecto antimicrobiano contra <i>Salmonella spp.</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Salchichas secas curadas, pero con limitaciones sensoriales.
Aceites esenciales de canela, orégano y tomillo.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ - Actividad antimicrobiana contra: coliformes totales, <i>E.coli</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Carne y pescado.

Fuente: Pisoschi et al. 2018.

3.9 Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

3.9.1 Cultivo

Desde el punto de vista morfológico, la Jamaica (*H. sabdariffa*) es una planta arbustiva semileñosa anual o bianual que pertenece a la familia Malvácea y alcanza una altura entre uno y tres metros. Sus tallos son abundantes, muy ramificados y de corteza roja, con hojas alternas de bordes irregulares aserrados. Estas plantas son frecuentes en las regiones tropicales y subtropicales, y poseen cáliz de color verde o rojo (Ortega-Cid and Beltrán Guerrero 2012).

A nivel internacional se distinguen seis variedades (diferenciadas por el color, forma, apariencia y tamaño de la planta) destacándose: Sudán, china o morada, roja, negra gigante, morada gigante y lo no ácida (Ortega-Cid and Beltrán Guerrero 2012). En México, las principales variedades que se cultivan son: criolla (variedad roja, larga), china, jerzy y Sudán (Ortega-Cid and Beltrán Guerrero 2012).

Los cálices frescos o secos de *H. sabdariffa* se utilizan en la preparación de bebidas a base de hierbas, bebidas frías y calientes, bebidas fermentadas, vino, mermeladas, dulces en gelatina, helados, chocolates, aromatizantes, pudines y pasteles. En Egipto, los cálices carnosos se usan para hacer té de 'cacody' y bebidas fermentadas, mientras que, en Sudán y Nigeria, los cálices se hierven con azúcar para producir una bebida conocida como "Karkade " o "Zoborodo". En México, esta bebida se llama Jamaica o " agua de Jamaica " o " té de Jamaica " (Ortega-Cid and Beltrán Guerrero 2012).

3.9.2 Producción en México y el mundo

La flor de Jamaica en México se agrupa en el sector de especias y plantas medicinales, siendo un cultivo no tradicional, el cual predomina en regiones con clima cálido seco. La producción a nivel mundial lo encabeza china con el 27.76% de la producción, seguido de sudan (9.1%), Uganda (8.40%), Indonesia (6.23%),

Malasia (5.53%) y en séptimo lugar se encuentra México con el 5.14% (Ortega-Cid and Beltrán Guerrero 2012).

En México, de acuerdo con lo reportado por la fundación Produce de Guerrero en 2012, la principal producción de Jamaica se centra en los estados de Guerrero con el 77.52%, Oaxaca con el 12.61%, Michoacán con 3.60%, Nayarit con el 2.68%, Puebla con el 1.89%, y el 1.7% restante se centra en los estados de Campeche, Colima, Jalisco y Veracruz (Ortega-Cid and Beltrán Guerrero 2012).

3.9.3 Uso en alimentos y medicinas locales y tradicionales

Hibiscus sabdariffa ha sido ampliamente utilizado en medicinas locales. En la India, África y México, las infusiones de hojas o cálices se utilizan tradicionalmente por sus efectos diuréticos, colécticos, febríficos e hipotensivos, disminuyendo la viscosidad de la sangre y estimulando el peristaltismo intestinal (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

En Egipto, las preparaciones de los cálices se han usado para tratar enfermedades cardíacas y nerviosas y también para aumentar la producción de orina (diuresis) (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

En el norte de África, los preparados de cálices se utilizan para tratar el dolor de garganta y la tos, así como los problemas genitales, mientras que la pulpa de la hoja emoliente se usa para tratar heridas y abscesos externos (Da Costa Rocha, Bonnlaender, Sievers, Pischel, & Heinrich, 2014). En la medicina popular china, se usa para tratar trastornos hepáticos y presión arterial alta (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

Por otro lado, las hojas de *H. sabdariffa* se usan para forraje y fibra animal. Las semillas se pueden usar para alimentar a las aves de corral, así como a las ovejas y el residuo de la extracción de aceite de las semillas también se puede usar para alimentar ganado y polluelos (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

3.9.4 Composición química y propiedades de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

La composición nutricional de los cálices de *Hibiscus* frescas varía entre los estudios, probablemente debido a las diferentes variedades genéticas, ambientales, ecológicas y condiciones de cosecha de la planta (Ortega-Cid and Beltrán Guerrero 2012). En la tabla 5 y 6 se muestran la composición química de los cálices y hojas de *H. sabdariffa*.

Tabla 5. Composición química de los cálices y hojas de *H. sabdariffa*.

Componente	Cáliz (g/100g)	Hoja (g/100g)
Proteína	1.9	3.3
Grasa	0.1	0.3
Carbohidratos	12.3	9.2
Fibra	2.3	-
Vitaminas C	0.014	-
β-caroteno	0.3	4.135
Calcio	0.00172	-
Fósforo	-	0.214
Tiamina	-	0.00045
Rivaflavina	-	0.00045
Ácido ascórbico	-	0.054
Hierro	0.057	0.0048
Potasio	-	-
Sodio	-	-

Fuente: Da-Costa-Rocha et al. 2014.

Respecto al contenido de aminoácidos, los cálices de *H. sabdariffa* aportan la mayoría de los aminoácidos esenciales, a excepción del triptófano, tal y como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Contenido de aminoácidos (mg/g de materia seca) en los cálices de *H. sabdariffa*.

Aminoácidos	Morton (1987)	Glew et al (1997)
Ácido aspártico	16.30	10.50
Ácido glutámico	7.20	8.85
Prolina	5.60	5.82
Leucina	5.00	4.21
Lisina	3.90	2.77
Glicina	3.80	2.47
Valina	3.80	3.33
Alanina	3.70	3.46
Arginina	3.60	4.48
Serina	3.50	2.65
Isoleucina	3.00	2.70
Treonina	3.00	2.36
Tirosina	2.20	1.44
Histidina	1.50	1.19
Cisteína	1.30	0.87
Metionina	1.00	0.65
Fenilalanina	1.00	2.32

Fuente: Ortega-Cid and Beltrán Guerrero 2012.

Los principales componentes que se encuentran en los cálices de *Hibiscus sabdariffa* son antocianinas en un 1.5 % (delfinidina-3- sambubiósido o hibiscina, cianidina 3- sambubiósido, cianidina 3- monoglucósido, delfinidina 3- monoglucósido), ácidos orgánicos en un 15-30% que estabilizan las antocianinas (principalmente ácido cítrico, málico, protocatéquico, tartárico y ascórbico), polisacáridos mucílaginosos en un 50% (ácidos urónicos en forma de sal y el resto ramnosa, arabinosa y pequeñas cantidades de glucosa, xilosa y manosa), flavonoides (principalmente quercetina, gossipitrina, gosipetina, hibiscitrina y su aglicona hibiscetina), saponinas (β -sitosterol- β -Dgalactopiranosido), fitosteroles (β -sitosterol, camposterol, ergosterol, estigmasterol), pectina y fibra (Castañeda and Cáceres 2014). Dichos componentes se describen a continuación:

3.9.4.1 Ácidos orgánicos

Dentro de los ácidos orgánicos presentes en los extractos de *H. sabdariffa* se encuentra el ácido cítrico, ácido hidroxicítrico, ácido hibiscus, ácidos málico y

tartárico como compuestos principales, y ácido oxálico y ascórbico como compuestos menores. El ácido hidroxicítrico, ácido hibiscus y sus derivados son los principales ácidos orgánicos en las hojas y extractos de cálices de *H. sabdariffa* (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

3.9.4.2 Ácido hidroxicítrico

El ácido hidroxicítrico tiene un grupo hidroxilo adicional en el segundo carbono del ácido cítrico (figura 1). El ácido orgánico principal que se encuentra en los cálices de *H. sabdariffa* es el ácido hidroxicítrico cuya estructura se muestra en la figura 2 (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

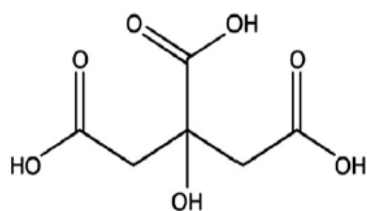


Figura 1. Ácido cítrico (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

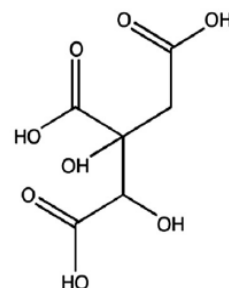


Figura 2. Ácido Hidroxicítrico (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

3.9.4.3 Ácido Hibiscus

El ácido hibiscus (figura 3) es la forma de lactona del ácido hidroxicítrico, constituido de una parte de ácido cítrico con un grupo hidroxilo adicional en el segundo carbono (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

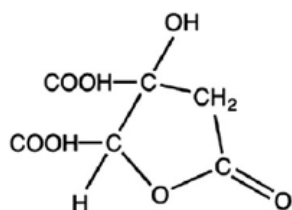


Figura 3. Ácido Hibiscus (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

3.9.4.4 Antocianinas

Las antocianinas son un grupo de derivados de flavonoides y pigmentos naturales presentes en las flores secas de *H. sabdariffa* y su color varía dependiendo del pH. Entre las antocianinas se encuentra la delphinidina y antocianinas basadas en cianidina, como lo es la delphinidina-3-sambubiósido (hibiscina), cianidina-3-sambubiósido (gospicanina), cianidina-3,5-diglucósido, delphinidina (antocianidina) entre otros (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

La primera antocianina que se aisló de los cálices de *H. sabdariffa* fue la "hibiscina" denominada delphinidina-3-sambubiósido. A partir de los pigmentos de los cálices de *H. sabdariffa*, se aislaron tres antocianinas diferentes las cuales son:

- 1) delphinidina-3-sambubiósido (hibiscina)
- 2) delphinidina-3-glucósido
- 3) cianidina-3-glucósido (crisantenina)

Las estructuras de estas tres antocianinas aisladas de *H. sabdariffa* se observan en la figura 4.

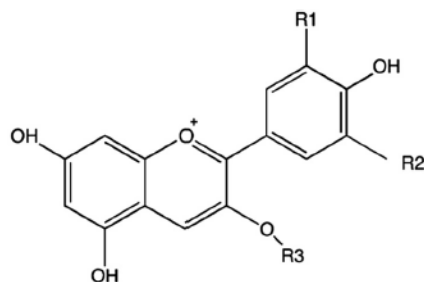


Figura 4. Antocianinas presentes en *H. sabdariffa* (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

Cianidina-3-sambubiósido (R1=OH; R2=H; R3= sambubiósido)

Delphinidina-3-sambubiósido (R1=OH; R2=OH; R3= sambubiósido)

Cianidina-3-glucósido (R1=OH; R2=H; R3=glucosa)

Delphinidina-3-glucósido (R1=OH; R2=OH; R3=glucosa)

Un estudio realizado por Khafaga et al (1980) utilizando cinco cepas diferentes de *H. sabdariffa* reportó que el contenido de antocianinas presentes en los cálices oscila entre el 1.7% al 2.5% del peso seco en todas las cepas, entre las cuales se encuentran la cianidin-3-sambubiósido y cianidin-3-glucósido como los principales compuestos presentes en esta planta (Khafaga et al. 1980).

Del mismo modo, en un estudio realizado por Du & Francis (1973) reportaron que la cantidad de antocianinas presente en lo cálices de *H. sabdariffa* es de aproximadamente 1.5 g por 100 g de peso seco, en términos de delfinidina-3-sambubiósido (Du and Francis 1973).

3.9.4.5 Flavonoides

H. sabdariffa contienen polifenoles del tipo flavonol y flavanol en forma simple o polimerizada. Dentro de los flavonoides que se han reportado en extractos de *H. sabdariffa*, se encuentra la hibiscitrina (hibiscetin-3-glucósido), sabdaritrina, gospitrina, y otros glucósidos, quercetina y luteolina; así como ácido clorogénico, ácido protocatecúico, ácido pelargonídico, eugenol, quercetina, luteolina y los esteroides b-sitosterol y ergosterol (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

El extracto metanólico de los cálices de *H. sabdariffa* contienen quercetina, luteolina y su glucósido. Un estudio informó que la cantidad de quercetina presente en los cálices de *H. sabdariffa* en peso seco fue de 3.2 mg / g mientras que la rutina (quercetina-3-rutinósido) fue de 2.1 mg / g (Alarcón-Alonso et al. 2012). La quercetina y sus glucósidos conjugados (quercetina-3-glucósido), así como la rutina (quercetina-3-rutinósido (figura 5)) se identificaron con frecuencia en los cálices de *H. sabdariffa* en peso seco, junto con el kaempferol (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

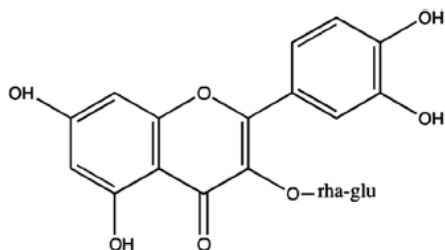


Figura 5. Quercetina-3-rutinósido (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

El extracto acuoso de las hojas secas de *H. sabdariffa* mostró la presencia de catequina (4.25%) y ácido elágico (28.20%), mientras que los cálices de *H. sabdariffa* en peso seco mostraron la presencia de ácido protocatéquico (24.24%), catequina (2.67%), galocatequina (2.44%), ácido cafeico (19.85%) y galato de galocatequina (27.98%) (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

El ácido protocatéquico (PCA) es un ácido fenólico importante presente en el extracto de *H. sabdariffa* (Figura 6). Se aisló de los cálices secos de *H. sabdariffa* y se le asignó la estructura del ácido 3,4-dihidrobenczoico (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

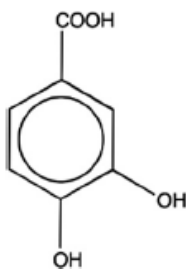


Figura 6. Ácido protocatéquico (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

El ácido clorogénico es otro ácido fenólico presente en extractos de hojas y cálices de *H. sabdariffa* y pertenece a una familia de ésteres formados entre ciertos ácidos trans-cinámicos (ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico) y ácido quínico. En un estudio realizado por Alarcón- Alonso et al (2012), se informó que

la cantidad de ácido clorogénico en el extracto era de 2.7 mg / g (Alarcón-Alonso et al. 2012).

3.9.4.6 Polisacáridos

Los polisacáridos son otro grupo clave de compuestos presentes en grandes cantidades en los cálices secos de *H. sabdariffa*. En un estudio realizado por Muëller and Franz en 1989, identificaron la presencia de los siguientes compuestos en el extracto acuoso de *H. sabdariffa* en dos fracciones diferentes, arabinosa, galactosa, glucosa, ramnosa y cantidades más pequeñas de ácido galacturónico, ácido glucurónico, manosa y xilosa (Müller and Franz 1989).

El contenido de mucílago se determinó en los cálices de cinco cepas de *H. sabdariffa*, alcanzando el 24-28% en cepas de América Central y Egipto, pero solo el 15% en una cepa india. El contenido de pectina solo representó 2-4% mientras que los azúcares alcanzaron un máximo de 3-5%. El mucílago y la pectina consistían en 60-80% de ácido anhidrouónico (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

3.9.4.7 Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles son responsables del aroma de *H. sabdariffa*. En un estudio realizado en 1992, se informaron más de veinticinco compuestos volátiles (que representan menos del 8% de la composición total de semillas de *H. sabdariffa*) en aceite de semilla de *H. sabdariffa*. Eran principalmente hidrocarburos insaturados, alcoholes y aldehídos de C8 a C13 (Jirovetz et al. 1992). Posteriormente, se caracterizaron treinta y siete compuestos volátiles de cinco grupos diferentes de los cálices secos de *H. sabdariffa*. Estos compuestos incluyen derivados de ácidos grasos (como 2-etilfuran y hexanal), derivados de azúcar (furfural y 5-metil-2-furaldehído), derivados fenólicos (eugenol), terpenos (como 1,4-cineol, limoneno) y varios compuestos (por ejemplo, ácido acético) (Da-Costa-Rocha et al. 2014).

En otro estudio realizado en 2011, se identificó el perfil volátil en cuatro extractos acuosos de cálices frescos y secos de *H. sabdariffa*, por medio de cromatografía

de gases acoplado a masas (GC-MS). Se identificaron un total de treinta y dos compuestos que se pueden dividir en cinco grupos químicos: aldehídos (catorce compuestos), alcoholes (diez compuestos), cetonas (cinco compuestos), terpenos (dos compuestos) y ácidos (un compuesto) (Ramírez-Rodríguez et al. 2011).

3.10 Propiedad antimicrobiana y antioxidante de los cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

La propiedad antimicrobiana de la jamaica (*H. sabdariffa*) ha sido comparada con la del ajo (*Allium sativum* L.) y el jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), en el combate de especies bacterianas resistentes a antibióticos en infecciones urinarias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, donde la jamaica demostró ser un potente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de las especies bacterianas mediante concentraciones de 25 hasta 200 mg/mL (Nahuatt et al. 2017).

En los cálices de *Hibiscus sabdariffa* se han identificado una apreciable cantidad de compuestos bioactivos, los cuales son componentes minoritarios de los alimentos, considerados no nutrientes, parcialmente biodisponibles en el organismo y que han demostrado tener diversos efectos positivos en la salud del consumidor. Entre ellos se encuentran los polifenoles y carotenoides, los cuales ejercen su principal acción biológica de antioxidantes y secuestradores de radicales libres, mientras que los fitoesteroles inhiben la absorción intestinal de colesterol (Sáyago- Ayerdi and Goñi 2010).

Por otra parte, en los últimos años, el estudio de los antioxidantes ha recibido un mayor interés debido a las acciones de éstos sobre los radicales libres y otros agentes oxidantes en el cuerpo. Los radicales libres son especies químicas con uno o dos electrones no apareados en su orbital más externo, que se pueden crear de múltiples maneras: exógena (por ejemplo, la radiación ultravioleta) o endógena (Nahuatt et al. 2017).

La actividad antioxidante asociada a los extractos acuosos de los cálices de jamaica se atribuye a los fenoles, de los que destacan las antocianinas y los ácidos fenólicos. De estos últimos, el ácido clorogénico y sus derivados son los más importantes (Nahuatt et al. 2017).

El contenido fenólico en *Hibiscus sabdariffa*, está principalmente compuesto por antocianinas como la delfindin-3-glucósido, sambubiósido y cianidin-3-sambubiósido y otros flavonoides como el gossipetin hibiscetín y sus respectivos glucósidos, así como el ácido protocateico. Todos ellos se caracterizan por presentar actividad antioxidante (Sáyago- Ayerdi and Goñi 2010).

4. Justificación

El frijol es un alimento básico de la dieta de los mexicanos, se trata de un alimento rico en fibra y proteínas, el cual se le ha considerado como alimento funcional. De acuerdo con sus propiedades, se trata de un alimento muy susceptible al deterioro, por tanto se deben de tomar las medidas necesarias de conservación ya que de lo contrario puede descomponerse en muy poco tiempo. Cabe mencionar que en la actualidad el consumo de frijol en las zonas urbanas se trata de la adquisición de los frijoles industrializados o adquiridos de forma fresca en establecimientos públicos como lo son cocinas económicas, tiendas, tiendas autoservicios, entre otros. Las principales técnicas de conservación aplicadas en casa en frijoles preparados para incrementar su vida útil son la congelación y el calentamiento, siendo el calentamiento el más utilizado. Por otra parte a nivel industrial se suelen utilizar como métodos de conservación de frijoles preparados el empacado a vacío, la esterilización y/o la adición de conservadores químicos como el sorbato de potasio, el cual inhibe el crecimiento de hongos, levaduras y algunas bacterias. Sin embargo, la aplicación del tratamiento térmico después de la cocción en los frijoles genera modificaciones en sus propiedades organolépticas y nutricionales. Es por ello que en la actualidad, se ha acrecentado la demanda del estudio de nuevas alternativas de conservación que sean seguras y naturales para su aplicación en productos alimentarios, que ayuden a disminuir la aplicación métodos de conservación con procesamientos térmicos drásticos o el uso de conservadores químicos en los alimentos. Una de estas alternativas se ve descrita en este proyecto, el cual pretende promover la aplicación de extractos de jamaica como agentes antimicrobianos para prolongar la vida útil de frijoles preparados.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano de extracto metanólico, acetónico, etanólico y acuoso de *H. sabdariffa* ante el desarrollo de microorganismos patógenos y deterioradores de frijol, y su aplicación como conservadores en frijoles preparados.

6. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar la microbiota deterioradora de los frijoles.
- Obtener los extractos metanólico, etanólico, acetónico y acuoso de *H. sabdariffa*.
- Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos de *H. sabdariffa* sobre el desarrollo de microorganismos patógenos.
- Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos de *H. sabdariffa* sobre el desarrollo de microorganismos deterioradores de los frijoles preparados.
- Determinar el efecto de los extractos de *H. sabdariffa* en la vida útil de frijoles preparados.

7. Metodología

7.1 Muestra

Se obtuvieron 3 muestras de frijoles cocidos en una cocina económica ubicada en el fraccionamiento Villas del Álamo, Mineral de la Reforma, Hidalgo, utilizando recipientes desechables de 500 mL en condiciones asépticas.

7.2 Obtención de cepas deterioradoras de frijoles y cepas patógenas

Para la obtención de las bacterias deterioradoras se colocó una muestra de frijoles en incubación a 37 °C por 24 h, transcurrido este tiempo se tomó una asada de la muestra de frijol y se sembró sobre placas Petri con agar métodos estándar mediante la técnica de estría cruzada, con la finalidad de aislar las cepas.

Para el caso de las cepas patógenas, se utilizaron cepas de colección del laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, las cuales fueron *Salmonella typhimurium* ATCC 14020, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

7.3 Caracterización de las dos cepas de bacterias deterioradoras aisladas de frijol

Para la caracterización de las bacterias deterioradoras se realizó una tinción de Gram, primero se realizó un frotis, tomando una colonia de la bacteria a analizar colocándose sobre un portaobjetos. Posteriormente se adicionó una gota de agua destilada y se frotó hasta que secó, después se realizó una tinción de Gram y se prosiguió a la observación del frotis al microscopio (López et al. 2014).

Para la realización de las pruebas bioquímicas, primero se reactivaron las dos cepas deterioradoras aisladas de frijoles en caldo soya tripticaseína, posteriormente se realizó la siembra de ellas en cajas Petri con agar bilis rojo violeta, agar de eosina y azul de metileno y agar Mac Conkey mediante la técnica de estría cruzada y por duplicado; y por último se incubaron a 37 °C por 24 h.

Posteriormente se prepararon tubos inclinados con 3 mL de agar hierro y triple azúcar (TSI), agar citrato de Simmons y agar de hierro y lisina (LIA) y en cada uno de ellos se sembraron las cepas aisladas en las cajas Petri con agar bilis rojo violeta, agar de eosina y azul de metileno y agar Mac Conkey, por duplicado, siguiendo la técnica de estría en la superficie y una picadura vertical y profunda en el centro del tubo como lo marcan las fichas técnicas de estos medios de cultivo. Por último, se incubaron los tubos a 37 °C por 24 h, transcurrido este tiempo se observaron los cambios presentes en los medios de cultivo (MacFaddin 2003).

7.4 Obtención de extractos de *Hibiscus Sabdariffa*

Para la obtención de los extractos, se colocó en un matraz Erlenmeyer con tapón de rosca, 80 gr de *H. sabdariffa* y 800 mL de cada uno de los solventes (metanol, etanol y acetona) respectivamente. Los matraces fueron almacenados a temperatura ambiente durante 7 días con agitación manual (cada 24 horas) (Cruz-Gálvez et al. 2013). Para el caso del extracto acuoso, se colocó en un matraz Erlenmeyer en una proporción de 1:10 p/v de *H. sabdariffa* y agua destilada y se llevó a ebullición por 20 min (Cruz-Gálvez et al. 2013).

Transcurrido el tiempo de la maceración, los extractos se obtuvieron con ayuda de un evaporador rotatorio (BUCHI MODE, Suiza) a 40 °C y 200 rpm, con el objeto de separar el solvente de los extractos.

7.5 Preparación de solución de los extractos *Hibiscus sabdariffa*

Una vez obtenidos los extractos, se preparó una solución de estos al 2% y 10% en agua destilada adicionados con tween 80 al 20% y se llevaron a esterilización a 121 °C por 15 min (Cruz-Gálvez et al. 2013).

7.6 Actividad antimicrobiana

Primero se activaron las cepas de los microorganismos tanto los deterioradores como los patógenos (*S. typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*), en caldo soya tripticaseína. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de la cepa

reactivada sobre cajas Petri con agar métodos estándar mediante la técnica de extensión en placa, posteriormente se dividió la placa en tres partes y en cada una de ellas se colocó un pequeño disco de papel filtro sobre el cual se adicionaron 10 μ L de cada una de las soluciones de los extractos (Cruz-Gálvez et al. 2013). Cada uno de los extractos fue evaluado por duplicado.

Posteriormente se incubaron las cajas Petri a 37 °C por 24 h. Transcurrido este tiempo de incubación, se observó el efecto de los extractos mediante halos de inhibición y se midió su diámetro con ayuda de un vernier (Cruz-Gálvez et al. 2013).

7.7 Evaluación del deterioro de frijoles adicionados con extracto acetónico al 2% y 10% de *Hibiscus sabdariffa*, evaluado durante 72 horas a 37°C

Para la evaluación del deterioro de los frijoles cocidos, se prepararon tres muestras de 150 g de frijoles cocidos, y se colocaron en bolsas de sellado fácil, a dos de ellas se les adicionaron los extractos acetónico de *H. sabdariffa* al 2% y 10% respecto al peso de la muestra, la tercera muestra no contenía ningún extracto y se tomó como muestra control. Una vez inoculadas las muestras con los extractos de *H. sabdariffa* se llevaron a incubación por 72 h a 37 °C; se tomaron 3 muestras de los frijoles a las 24, 48 y 72 h de incubación y se realizaron ocho diluciones decimales de cada muestra, tomando 1 mL del caldo de los frijoles y adicionándolo a un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada al 1%. Una vez realizadas las diluciones, se sembraron las diluciones 7 y 8 en agar métodos estándar, siguiendo la técnica de vaciado en placa, posteriormente se llevaron a incubación por 24 h 37 °C, y, por último, transcurridas las 24 h se realizó el conteo de colonias.

7.8 Efecto del extracto acetónico al 10% sobre la vida útil de frijoles refritos almacenados a temperatura ambiente

Se preparó una muestra de frijoles refritos colocando 100 g de frijoles cocidos en una cacerola con 5 mL de aceite y se dejaron a cocción por 3 min, de estos se

tomaron cinco muestras de 2 g cada una y se colocaron en bolsas Whirl pak® en condiciones estériles, posteriormente se les adicionó 0.2 g del extracto acetónico (10%), se sellaron las bolsas y se almacenaron a temperatura ambiente. Cada una de las muestras se analizó a las 0, 8, 24, 48 y 72 h. Para el análisis microbiológico a cada una de las muestras se le adicionó 18 mL de peptona de caseína al 1%, la muestra de las 0 y 8 h de almacenamiento se sembró de forma directa sin realizar diluciones, el resto de las muestras se les realizó tres diluciones y se sembró la tercera dilución por triplicado mediante la técnica de vaciado en placa, colocando 1 mL de la muestra dentro de la caja Petri y adicionando 20 mL de agar métodos estándar. Todas las muestras fueron incubadas por 24 h a 37°C, transcurrido este tiempo, se realizó el conteo de las cepas que crecieron.

7.9 Estudio estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza de una sola vía y la comparación de medias por la prueba de Tukey con un nivel de significancia de ($P=0.05$). Se utilizó el programa estadístico XLSTAT 2018.

8. Resultados y discusión

8.1 Aislamiento y caracterización de cepas deterioradoras de frijoles

Para este estudio, primero se llevó a cabo el aislamiento y caracterización de las cepas deterioradoras de frijol, en la cual se encontraron dos tipos de cepas de bacterias, una de ellas de color blanco, la cual para fines de este estudio se codificó como B1 y la otra cepa incolora y cristalina codificada como C1 (figura 7 y 8 respectivamente).



Figura 7. Cepa blanca (B1).



Figura 8. Cepa cristalina (C1).

Posteriormente se realizó la caracterización de las bacterias deterioradoras de frijoles mediante la técnica de tinción de Gram, obteniendo como resultado la presencia de bacterias Gram negativas con forma de cocos y bacilos aglomerados en ambas cepas (B1 y C1). Dichas bacterias poseen una pared celular la cual está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, cuyo componente estructural único son los lipopolisacáridos, por lo tanto no son capaces de retener el cristal-violeta después de la decoloración y son teñidas de rojo con safranina (López et al. 2014).

Posteriormente se realizó la identificación de las dos cepas de bacterias aisladas de frijol, por medio de tres medios de cultivo selectivos (Agar Bilis Rojo Violeta, Agar de eosina y azul de metileno (E.M.B.) y Agar Mac Conkey). En la tabla 7 se muestra el resultado del crecimiento de las dos cepas evaluadas en estos medios

de cultivo selectivos, con la finalidad de conocer qué tipo de bacterias están involucradas en el deterioro de frijol.

La primera prueba fue en el medio de cultivo bilis rojo violeta, el cual se trata de un medio selectivo utilizado para el recuento de coliformes en alimentos, productos lácteos y otros materiales de importancia sanitaria (Britania 2010). Para el caso de la cepa B1, se apreció el crecimiento de colonias cremosas de color rosa tenue, como se indica en la tabla 7. Para el caso de la cepa C1, se observó el crecimiento de cepas cremosas, con centro color naranja y con un cambio de color del medio de cultivo, el cual se a la presencia de bacterias fermentadoras de lactosa, las cuales acidifican el medio y esto produce un viraje del indicador de pH (rojo neutro) al color rojo intenso, debido a esto, se observan como colonias de color rojo púrpura, rodeadas generalmente, de una zona rojiza de bilis precipitada (Britania 2010).

Tabla 7. Aislamiento de las cepas deterioradoras de frijoles en medios selectivos.

Agar	Color del medio	Cepa blanca		Cepa cristalina	
		1	2	1	2
Agar Rojo Violeta Bilis	Rojo claro	Crecimiento de cepas cremosas, color rosa tenue.	Crecimiento de cepas cremosas, color rosa tenue.	Crecimiento de cepas cremosas, con centro de color naranja y el agar cambio de color a rosa mexicano.	Crecimiento de cepas cremosas, con centro de color naranja y el agar cambio de color a rosa mexicano.
Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB)	Café oscuro	Crecimiento de colonias de color verde esmeralda con brillo metálico.	Crecimiento de colonias de color verde esmeralda con brillo metálico.	Crecimiento de colonias de color verde esmeralda y centro negro.	Crecimiento de colonias de color verde esmeralda y centro negro.
Agar Mc Conkey	Rojo	Crecimiento de colonias de color morado y con apariencia cremosa.	Crecimiento de colonias de color morado y con apariencia cremosa.	Crecimiento de colonias de color morado y con apariencia cremosa y presencia de decoloración del medio de rojo a amarillo.	Crecimiento de colonias de color morado y con apariencia cremosa y presencia de decoloración del medio de rojo a amarillo.

Por otra parte, el medio de cultivo eosina y azul de metileno (EMB) es un medio utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales a partir de muestras clínicas, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria (Britania 2015a). Dentro de los resultados obtenidos con este medio de cultivo, se observó que la cepa B1 presentó el crecimiento de colonias color verde esmeralda con brillo metálico. Del mismo modo, la cepa C1 presentó un crecimiento de colonias de color verde esmeralda brillante con un centro negro, típica de bacterias como *E. coli* (Britania 2015a). Esto es debido a que el agar EMB permite el desarrollo de especies de la familia *Enterobacteriaceae*, ya que combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine (Holt-Harris and Oscar Teague 1916), para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas (Britania 2015a).

El medio de cultivo Mac Conkey es un medio utilizado para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios facultativos a partir de muestras clínicas, agua y alimentos (Britania Lab. 2008). En este caso, para la cepa B1 se observó el crecimiento de colonias color moradas con apariencia cremosa, tal como se muestra en la tabla 7. En el caso de la cepa C1, se observó el desarrollo de colonias color morado con apariencia cremosa y con una decoloración del medio de cultivo a color amarillo, lo cual, es debido a la fermentación de la lactosa por los microorganismos, lo que ocasiona que disminuya el pH alrededor de la colonia y exista un vire del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares y por el contrario los microorganismos que no fermentan la lactosa desarrollan colonias incoloras (Britania Lab. 2008).

Por otra parte, en la tabla 8 se observan los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de bacterias obtenidas del crecimiento en los medios

selectivos utilizados (Agar Bilis Rojo Violeta, Agar de eosina y azul de metileno (E.M.B.) y Agar Mac Conkey). El primer medio de cultivo utilizado para las pruebas bioquímicas fue Citrato de Simmons, el cual es un medio utilizado para la diferenciación de Enterobacterias en base a su capacidad para utilizar el citrato como única fuente de carbono y energía, y la consiguiente producción de alcalinidad (Britania 2015b) . Para este medio se obtuvo como resultado un cambio de coloración del medio de cultivo de un color verde a color azul en las cepas aisladas del medio de cultivo EMB, Agar Bilis Rojo Violeta, y Mac Conkey, provenientes de la cepa B1 y la cepa C1 aisladas de frijol, tal como se muestra en la tabla 8, este resultado se trata de un crecimiento positivo, el cual se debe al desarrollo de microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, lo cual se representa con un crecimiento bacteriano en el medio de cultivo y un intenso color azul en el pico de la flauta, esto es debido a que el método de acción del medio, se fundamenta en que los microorganismos utilizan las sales de amonio como única fuente de nitrógeno y el citrato como única fuente de carbono y a la presencia de azul de bromotimol que funciona como indicador de pH, el cual vira a azul en medio alcalino (Britania 2015b). El desdoblamiento del citrato genera progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira a azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa (Britania 2015b).

En el caso de las cepas aisladas del agar bilis rojo violeta provenientes de la cepa C1, no presentaron cambio de coloración en uno de los tubos, esto indica un crecimiento negativo, el cual consiste en no presentar cambio de coloración del medio (Britania 2015b).

Por otra parte, el medio de cultivo LIA es un medio de cultivo ampliamente utilizado para la diferenciación de bacilos Gram negativos entéricos, con capacidad de fermentación de lactosa, sobre la base de la producción de H₂S y la actividad de la enzima Lisina decarboxilasa (Valtek S.A. 2009). De acuerdo con los

datos observados en la tabla 8, para el medio de cultivo agar de hierro y lisina (LIA), se observó que los tubos que contenían tanto a las cepas B1 como las cepas C1 provenientes de los medios de cultivo agar eosina y azul de metileno, agar rojo violeta bilis y agar Mac Conkey, presentaron un cambio de color del medio LIA, observándose una coloración entre café y morado, lo cual se debe a la actividad de la enzima lisina decarboxilasa, la cual se manifiesta mediante un viraje hacia el color púrpura en todo el medio de cultivo, o bien como medio de cultivo sin cambio (neutro) en la columna de agar, en tanto que la ausencia de esta enzima produce un viraje hacia el color amarillo en la columna y neutro en la zona inclinada (Valtek S.A. 2009).

Así también, en cada uno de los seis tubos se presentó una prueba negativa en cuanto a la producción de H₂S, ya que en ninguno de ellos hubo la presencia de una coloración negra, la cual está dada por el citrato de amonio férrico y el tiosulfato de sodio, los cuales actúan como marcadores de la producción de H₂S produciendo sulfuro de hierro el cual presenta un color negro en el tubo (Valtek S.A. 2009).

El medio de cultivo agar de hierro y triple azúcar (TSI) es un medio utilizado para la diferenciación de *Enterobacteriaceae* basado en la producción de sulfuro de hidrógeno y a la fermentación de lactosa, sacarosa y dextrosa (Mast Group 2016). El agar triple azúcar hierro contiene tres carbohidratos (glucosa, lactosa y sacarosa), cuando dichos carbohidratos se fermentan, la producción resultante de ácido es detectada por el indicador rojo fenol. Se producen cambios de color: amarillo para la producción de ácido y rojo para la alcalinización. Dado que la lactosa y la sacarosa se encuentran presentes en concentraciones mucho más elevadas que la glucosa, la formación de ácido en la base del tubo se debe a dichos azúcares, mientras que la formación de ácido a partir de la glucosa es suprimida por la rápida oxidación de una pequeña cantidad de ácido en el área inclinada del tubo, lo que genera una reacción de pH neutro o alcalino cuando se fermenta sólo glucosa (Becton Dickinson 2003).

Como se puede observar en la tabla 8, para el medio de cultivo agar de hierro y triple azúcar (TSI), se observó que en los tubos que contenían tanto a la cepa B1 provenientes de los medios de cultivo agar eosina y azul de metileno y agar rojo violeta bilis y en los tubos que contenían a la cepa C1 provenientes de los medios de cultivo agar eosina y azul de metileno y agar Mac Conkey, no presentaron cambio de coloración del medio TSI, conservando una coloración amarilla en todo el tubo, con crecimiento de cepas color amarillo sobre la superficie de estos. De acuerdo con la ficha técnica del medio de cultivo, se trata de una reacción en la inclinación de la cepa ácida (amarillo/amarillo), indicando la fermentación de dextrosa, lactosa y sacarosa (Mast Group 2016). Por otra parte, en el tubo con agar TSI que contenía a la cepa B1 y el tubo que contenía a la cepa C1, ambas provenientes del agar rojo violeta bilis, se observó un cambio de coloración en la flauta de la inclinación, observándose una coloración rojiza, mientras que la base del tubo se conservó de color amarillo. Esto se trata de una reacción alcalina en la inclinación de la cepa ácida (rojo/amarillo), indicando solo la fermentación de dextrosa (Mast Group 2016). Por otra parte, cabe mencionar que en los seis tubos que contenían tanto a la cepa B1 como a la cepa C1, se observó un deslizamiento del medio de cultivo, lo que indica la producción de gas, pero en ninguno se observó la producción de sulfuro de hidrógeno.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar la presencia de bacterias Gram negativas, con forma de bacilos y fermentadores de lactosa, por otra parte de acuerdo con las especificaciones de los medios de cultivo utilizados en este estudio se trata de bacterias pertenecientes al grupo de las enterobacterias, principalmente de coliformes, los cuales son un grupo de bacterias Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, no formadoras de esporas, fermentadoras de la lactosa a 37 °C en 48 horas, que poseen la enzima β -galactosidasa, son oxidasa negativas y su forma celular es de bacilos cortos. Se les suele denominar microorganismos indicadores de la calidad microbiana de los alimentos o indicadores de la durabilidad de los mismos (Environment Agency 2002).

Tabla 8. Pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas aisladas de los medios selectivos.

Cepa	Agar Citrato de Simmons		Agar de Hierro lisina (LIA)		Agar Hierro y triple azúcar (TSI)	
	Coloración inicial del medio	Coloración final del medio	Coloración inicial del medio	Coloración final del medio	Coloración inicial del medio	Coloración final del medio
Cepa B1 aislada del Agar EMB	Verde bandera	Azul	Café rojizo	Café/morado	Amarillo	Amarillo con desplazamiento del medio
		Azul		Café/morado		Amarillo con desplazamiento del medio
Cepa B1 aislada del Agar Bilis Rojo Violeta	Verde bandera	Azul	Café rojizo	Café/morado	Amarillo	Amarillo con desplazamiento del medio
		Verde con una ligera coloración azul		Café/morado		Amarillo con coloración rojiza en el pico del agar
Cepa B1 aislada del Agar Mc Conkey	Verde bandera	Azul	Café rojizo	Café/morado	Amarillo	Amarillo con desplazamiento del medio
		Verde con una ligera coloración azul		Café/morado		Amarillo con desplazamiento del medio
Cepa C1 aislada del agar EMB	Verde bandera	Azul	Café rojizo	Café/morado	Amarillo	Amarillo
		Azul		Café/morado		Amarillo con desplazamiento del medio
Cepa C1 aislada del Agar Bilis Rojo Violeta	Verde bandera	Azul	Café rojizo	Café/morado	Amarillo	Amarillo
		Verde		Café/morado		Amarillo con coloración rojiza en el pico del agar
Cepa C1 aislada del Agar Mc Conkey	Verde bandera	Azul	Café rojizo	Café/morado	Amarillo	Amarillo
		Azul con una coloración ligeramente verde		Café/morado		Amarillo con desplazamiento del medio

Al igual que en este trabajo, en un estudio realizado por Orozco Estrada et al en 2007, se determinó la presencia de microorganismos mesófilos, hongos, levaduras, coliformes, *S. aureus* y *Salmonella* en 41 muestras de tres diferentes alimentos preparados, como son; arroz cocido (11 muestras), frijoles cocidos (16 muestras) y salsa roja (14 muestras), los cuales se almacenaron a temperatura ambiente. De los tres alimentos analizados, el de mayor carga microbiana fue el frijol, presentando valores más altos en bacterias mesófilas, *salmonella* y coliformes (Orozco Estrada E. et al. 2007).

Sin embargo, no se debe olvidar que los frijoles refritos han recibido un tratamiento térmico durante su preparación, por lo tanto, la descomposición de los alimentos que han sido tratados con calor, es posible que se deba a la sobrevivencia de ciertos microorganismos termoresistentes, o bien, que otros entren en ellos después del calentamiento, como es el caso de las enterobacterias como los coliformes y coliformes fecales (Bibek and Arun 2010). O bien, la descomposición de los alimentos tratados térmicamente, se puede deber a enzimas microbianas estables al calor, procedentes de microorganismos presentes en el alimento antes del tratamiento térmico (Bibek and Arun 2010).

8.2 Evaluación de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* frente a bacterias patógenas

En la tabla 9 se observan los halos de inhibición obtenidos durante la evaluación de los cuatro extractos de *H. sabdariffa* a una concentración del 2% frente a *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, observándose mayor efecto inhibitorio para el extracto acetónico, el cual presentó un halo de inhibición de 21.84 ± 0.36 mm para *S. typhimurium*, 23.42 ± 1.11 mm para *E. coli*, 24.72 ± 0.81 mm para *S. aureus* y un halo de inhibición 24.42 ± 2.83 mm para *L. monocytogenes*, seguido del extracto metanólico, el cual presentó halos de inhibición de 15.89 ± 1.54 , 13.97 ± 0.07 , 13.99 ± 2.62 y 12.31 ± 3.50 mm respectivamente, mientras que el extracto acuoso fue quien presentó menor inhibición para las cuatro cepas de bacterias patógenas evaluadas.

Cabe mencionar que no se realizó algún estudio de inhibición con los solventes utilizados para la obtención de los extractos de *H. sabdariffa*, sin embargo, de acuerdo a un estudio realizado por Suárez Semour en 1979 se puede inferir que el método utilizado para la eliminación de los solventes de la matriz de los extractos fue un método eficiente. En dicho estudio, se evaluó el efecto antimicrobiano de diferentes alcoholes ante el desarrollo de *E. coli* y *S. aureus*, entre ellos el alcohol etílico y el alcohol metílico, cada ensayo partió de una concentración inicial de 9 Log UFC de cada microorganismo y se evaluó el efecto de los diferentes alcoholes primarios a diferentes concentraciones en un tiempo de 15 min. Para el caso del etanol se observó una reducción total de *E. coli* con una concentración de 4 M de etanol y una reducción máxima de 3 Log UFC de *S. aureus* a una concentración de 7 M del etanol. Por otra parte para el metanol, se alcanzó una reducción máxima de 5 log UFC para *E.coli* a una concentración de 9 M del metanol, mientras que para *S. aureus* se redujeron 3 Log UFC a una concentración de 9 M, observándose mayor efecto inhibitorio con el alcohol etílico que con el alcohol metílico (Suárez Semour 1979).

Por otra parte, cabe mencionar que para la obtención de los extractos de *H. sabdariffa* se usaron los solventes grado reactivo y no soluciones de ellos, además de que de los cuatro solventes utilizados para la obtención de los extractos de *H. sabdariffa* el de mayor efecto antimicrobiano es el etanol, por tanto si existiera solvente en los extractos, el efecto mostrado ante los microorganismos evaluados durante este estudio hubiese sido mayor para el extracto etanólico o al menos mayor que el extracto metanólico y el extracto acuoso, pero como se puede observar en la tabla 9, tanto el extracto metanólico como el etanólico presentaron halos de inhibición muy similares, por tanto podemos inferir que el método de eliminación de solvente en los extractos *H. sabdariffa* fue eficiente, y que la acción antimicrobiana observada en este estudio se debe al extracto y no a la presencia de solvente en el extracto de *H. sabdariffa*.

Tabla 9. Halos de inhibición de los extractos de *H. sabdariffa* al 2% frente a bacterias patógenas.

Extracto/ microorganismo	Acetónico (mm)	Etanólico (mm)	Metanólico (mm)	Acuoso (mm)
<i>S. typhimurium</i>	21.84±0.36 ^a	12.27±0.91 ^b	15.89±1.54 ^b	8.81±0.43 ^c
<i>E. coli</i>	23.42±1.11 ^a	12.05±1.89 ^b	13.97±0.07 ^b	10.39±1.09 ^c
<i>S. aureus</i>	24.72±0.81 ^a	13.04±3.51 ^b	13.99±2.62 ^b	10.09±1.45 ^c
<i>L. monocytogenes</i>	24.42±2.83 ^a	12.31±0.32 ^b	12.31±3.50 ^b	10.39±1.90 ^c

^{a,b,c} valores con letras diferentes en la misma fila por patógeno expresan diferencias significativas con $\alpha=0.05$, prueba de Tukey.

La actividad antimicrobiana de extractos de *H. sabdariffa* ha sido comparada con las del ajo (*Allium sativum* L.) y el jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), ante el desarrollo de especies de bacterianas resistentes a antibióticos como *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, donde *H. sabdariffa* demostró ser un potente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de las especies bacterianas mediante concentraciones de 25 hasta 200 mg/mL (Nahuatt et al. 2017).

Al igual que en este estudio, recientemente se ha demostrado el efecto antimicrobiano de los cálices de *H. sabdariffa* ante microorganismos patógenos. Jaroni y Ravishankar (2012) reportaron que los cálices de jamaica tienen efecto antimicrobiano sobre bacterias patógenas (Nahuatt et al. 2017). Del mismo modo Rangel-Vargas et al (2017) compararon el efecto antimicrobiano de extractos de cálices de jamaica en agua, acetato de etilo, metanol y acetona contra desinfectantes de uso común en la industria y los hogares mexicanos, como la plata coloidal, ácido acético e hipoclorito de sodio, los cuales se experimentaron contra *S. typhimurium*, *S. typhi* y *S. montevideo* aisladas de cilantro, los cuales presentaban resistencia a antibióticos como amoxicilina, ampicilina, kanamicina, neomicina, entre otros. Los extractos de jamaica fueron más efectivos: redujeron en promedio de 2 a 2.5 log UFC en relación a la reducción de los desinfectantes de uso común (aproximadamente 1 log UFC) (Rangel-Vargas et al. 2017).

Por otra parte, Gutiérrez-Alcántara et al (2016), comprobaron el efecto antimicrobiano de los extractos acuoso, acetónico, metanólico y acetato de etilo de

H. sabdariffa frente a cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos aisladas de zanahorias y comparando su efecto antimicrobiano con hipoclorito de sodio, ácido acético y plata coloidal, en el cual se observaron halos de inhibición de 10 mm para el extracto acuoso, halos de entre 10 y 12 mm para el extracto de acetato de etilo, 10 a 13 mm para el extracto de metanol y 13 a 15 mm para el extracto acetónico de *H. sabdariffa*, demostrando que el efecto de los extractos de *H. sabdariffa* era mayor pues presentaron una mayor reducción (2 log) en la concentración de *Salmonella* resistente a antibióticos, mientras que el hipoclorito de sodio y el ácido acético mostraron una reducción de 1 log de la concentración de *Salmonella* y la plata coloidal una reducción de 0.1–0.5 log de la concentración inicial de *Salmonella* (Gutiérrez-Alcántara et al. 2016). De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio se puede observar que se obtuvieron halos de inhibición semejantes a los reportados por Gutiérrez Alcántara et al (2015) para el extracto acuoso de *H. sabdariffa*, mientras que para el extracto metanólico y acetónico de *H. sabdariffa* se obtuvieron mayores halos de inhibición que los reportados por (Gutiérrez-Alcántara et al. 2016).

Gracias a los estudios que se han realizado a los cálices de *H. sabdariffa*, en los últimos años, han tenido un uso potencial en el área farmacológica debido a los beneficios que se han aportado, como propiedades antipiréticas, antibacterianas, diuréticas, entre otras; las cuales se han asociado a la presencia de moléculas con actividad antioxidante tales como polifenoles, quercetina, ácido L-ascórbico y antocianinas (Morales, Herrera, and Mónica 2014). De acuerdo a estas propiedades que se le han atribuido a *H. sabdariffa* y a los resultados obtenidos durante este análisis, se puede atribuir a que dependiendo del tipo de solvente del cual se trate, se pueden extraer diferentes compuestos de los cálices de *H. sabdariffa* y que de estos dependerá su poder antimicrobiano, así como también de la especie de planta de la cual se trate.

En un estudio citado por Da Costa Rocha et al en 2014 reportan que el extracto acuoso de *H. sabdariffa* presenta compuestos tales como ácidos orgánicos entre los cuales se encuentra el ácido hidroxycítrico, ácido hibiscus y derivados de ácido

hibiscus; antocianinas como la delfinidina-3 sambubiósido y la cianidina-3-sambubiósido, flavonoides y ácidos fenólicos como el ácido gálico, ácido clorogénico, ácido protocatéquico y derivados de él, quercetina-3-sambubiósido, quercetina-3-rutinósido, entre otros compuestos.

Por otra parte en un estudio realizado por Camelo Méndez en (2013) en 4 variedades de cálices de *H. sabdariffa*, reportó la presencia de compuestos similares a los referenciados por Da-Costa-Rocha et al en 2014 en el extracto acuoso de *H. sabdariffa*. Entre los compuestos reportados por Camelo Méndez en 2013 se encuentra el ácido hibiscus (1.97-3.18 mg/100g), ácido protocatéquico (65.04-134.20 mg/100 g), ácido clorogénico (0.3-0.52 mg/100g), derivados del ácido hibiscus (5.64-7.54 mg/100g), antocianinas como la quercetina-3-sambubiósido, quercetina-3-rutinósido, delfinidina-3-sambubiósido entre otros compuestos. Del mismo modo reporta compuestos similares en el extracto metanólico de *H. sabdariffa* pero con mayor contenido de ellos, como el ácido hibiscus (10-16 mg/100g) , ácido protocatéquico(134-302 mg/100g), ácido clorogénico (2.07-7.52 mg/100g), derivados del ácido hibiscus (16.94-29.89 mg/100 g), antocianinas como la quercetina-3-sambubiósido, quercetina-3-rutinósido, delfinidina-3-sambubiósido entre otros compuestos (Camelo Méndez 2013).

8.3 Evaluación de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* al 2% y 10% frente a bacterias deterioradoras de frijol

Se llevó a cabo la evaluación de los extractos acetónico, acuoso, metanólico y etanólico de *H. sabdariffa* frente a bacterias deterioradoras aisladas de frijol, a una concentración del 2% y 10%. Se observó que los cuatro extractos de *H. sabdariffa* evaluados al 2% no presentaron efecto inhibitorio frente a las dos cepas de bacterias deterioradoras evaluadas, sin embargo, los extractos de *H. sabdariffa* al 10%, sí presentaron efecto inhibitorio frente a las dos cepas de bacterias deterioradoras de frijol, tal y como se muestra en la tabla 10, en la cual se observa que el extracto acetónico fue el que presentó mayor efecto inhibitorio obteniendo un halo de inhibición de 8.11 ± 0.60 mm para la cepa B1 y 9.11 ± 3.35 mm para la

cepa C1, seguido del extracto acuoso y por último los extractos metanólico y etanólico, los cuales solo presentaron actividad antimicrobiana para la cepa B1 con 7.08 ± 1.47 mm y 7.37 ± 0.76 mm respectivamente pero no presentaron ningún efecto inhibitorio para la cepa C1.

Tabla 10. Halos de inhibición de los extractos de *H. sabdariffa* al 10% frente a bacterias deterioradores aisladas de frijoles refritos.

Cepa	Extracto Acetónico (mm)	Extracto Etanólico (mm)	Extracto Metanólico (mm)	Extracto Acuoso (mm)
Cepa B1	8.11 ± 0.60^a	7.37 ± 0.76^a	7.08 ± 1.47^a	6.47 ± 0.86^a
Cepa C1	9.11 ± 3.35^a	S/A	S/A	2.78 ± 3.92^b

*S/A (sin actividad inhibitoria)

^{a,b,c} valores con letras diferentes en la misma fila por patógeno expresan diferencias significativas con $\alpha=0.05$, prueba de Tukey.

Dentro de los cuatro extractos de *H. sabdariffa* evaluados en este estudio, se observó que el extracto acetónico fue quien presentó mayor efecto antimicrobiano tanto con las bacterias patógenas (tabla 9) como con las cepas de bacterias deterioradoras aisladas de frijol (tabla 10). Del mismo modo, en un estudio realizado por Gómez-Aldapa *et al* en 2018 se observó un mayor efecto antimicrobiano del extracto acetónico de *H. sabdariffa* evaluado ante el desarrollo de bacterias patógenas. En dicho estudio se evaluó el efecto de cuatro extractos de cálices de *H. sabdariffa* (agua, metanol, acetona y acetato de etilo) comparado con hipoclorito de sodio, plata coloidal y ácido acético ante el desarrollo de 13 cepas de bacterias patógenas transmitidas por los alimentos (*L. monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *S. Typhi*, *S. Montevideo*, *V. cholerae* O1 y seis patotipos de *Escherichia coli*) inoculadas en fresas, en la cual, la plata coloidal no mostró ningún efecto significativo en cuanto a la reducción de las bacterias patógenas, mientras que el hipoclorito de sodio y el ácido acético mostraron reducciones entre 0.8 y 1.4 \log_{10} UFC / g en la concentración de bacterias patógenas, mientras que los extractos acuoso y de acetato de etilo mostraron resultados similares al hipoclorito de sodio y ácido acético y el extracto

metanólico y acetónico presentaron reducciones de entre 1.8 y 3.8 log₁₀ CFU/g en la concentración de bacterias patógenas (Gómez-Aldapa et al. 2018).

Por otra parte, otro de las evaluaciones realizadas en este trabajo, fue la evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos de *H. sabdariffa* adicionados con ácido láctico. En la industria alimentaria se suele utilizar el ácido láctico como acidulante y conservante (Serna and Rodríguez 2005), debido a que reduce el pH del medio, produciendo un efecto inhibitorio de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Ramirez et al. 2011) . Es por ello que en este estudio, se utilizó el ácido láctico para observar si existe sinergismo con los extractos de *H. sabdariffa* para inhibir el desarrollo de las bacterias deterioradores de frijol. En la tabla 11, se observan los halos de inhibición obtenidos durante la evaluación de los extractos de *H. sabdariffa* a una concentración del 10% y adicionados con ácido láctico al 0.5%, frente a bacterias deterioradoras de frijol, observándose los mejores resultados de inhibición para el extracto acetónico frente a las bacterias deterioradoras evaluadas, con un halo de inhibición de 13.3±0.29 mm para la cepa B1 y 12.88±0.57 mm para la cepa C1, seguido del extracto etanólico con halos de inhibición de 10.98±0.33 mm y 5.77±8.16 mm respectivamente y del extracto acuoso, el cual presentó un halo de inhibición de 5.11±7.22 mm para la cepa B1 y 5.11±7.22 mm para la cepa C1, mientras que para el extracto metanólico solo se observó efecto inhibitorio para la cepa B1.

Tabla 11. Halos de inhibición de los extractos de *H. sabdariffa* al 10% adicionado con 0.5% de ácido láctico frente a bacterias deterioradores aisladas de frijoles refritos.

Cepa	Extracto Acetónico (mm)	Extracto Etanólico (mm)	Extracto Metanólico (mm)	Extracto Acuoso (mm)
Cepa B1	13.3 ±0.29 ^a	10.98 ±0.33 ^b	3.97 ±5.60 ^c	5.11 ±7.22 ^d
Cepa C1	12.88 ±0.57 ^a	5.77 ±8.16 ^b	S/A ^c	5.11 ±7.22 ^b

*S/A (sin actividad inhibitoria)

a,b,c,d valores con letras diferentes en la misma fila por patógeno expresan diferencias significativas con a=0.05, prueba de Tukey.

Como se puede observar en la tabla 11, los halos de inhibición obtenidos para el extracto acetónico al 10% adicionado con ácido láctico a una concentración de 0.5% presentaron valores significativamente mayores que los obtenidos con el extracto acetónico al 10% sin adición de ácido láctico como se muestra en la tabla 10, presentando halos de inhibición de 13.3 ± 0.29 mm para la cepa B1 y 12.88 ± 0.57 mm para la cepa C1. Por otra parte, el extracto acuoso y el extracto etanólico al 10% y adicionados con ácido láctico al 0.5% presentaron halos de inhibición mayores para la cepa cristalina aislada de frijol con 5.11 ± 7.22 mm y 5.77 ± 8.16 mm respectivamente que los obtenidos con los extractos de *H. sabdariffa* al 10% sin adición de ácido láctico, pero presentaron halos de inhibición menores para la cepa B1 que los obtenidos con los extractos de *H. sabdariffa* sin adición de ácido láctico.

El mecanismo de acción del ácido láctico, es que la forma no disociada del ácido láctico penetra con mayor facilidad la pared celular de las bacterias, donde el pH del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y el anión correspondiente, de modo que, ambos iones interfieren en el metabolismo celular e inhiben el crecimiento microbiano (Ramirez et al. 2011). Es por ello que la adición de ácido láctico a los extractos de *H. sabdariffa* mostró un aumento significativo en el potencial antimicrobiano de *H. sabdariffa* ejercido contra los microorganismos deterioradores de frijol.

8.4 Evaluación del deterioro de frijoles cocidos adicionados con extracto acetónico al 2% y 10%, evaluado durante un periodo de 72 horas

En la tabla 12 se observan las UFC obtenidas durante la evaluación del deterioro de frijoles cocidos adicionados con extractos acetónico al 2% y 10% durante 72 horas de incubación a 37°C, en la cual se puede observar que el extracto acetónico al 10% presentó un mejor efecto antimicrobiano en los frijoles refritos, debido a que al tercer día de incubación, la muestra de frijoles con el extracto acetónico al 2%, presentó signos de deterioro como producción de gas y formación de película blanca en la superficie, mientras que la muestra con frijoles

refritos adicionado con extracto acetónico al 10% no presento muestra de descomposición.

Tabla 12. Recuento de UFC/g de bacterias en frijoles cocidos adicionados con extracto acetónico de *H. sabdariffa* al 2% y 10% evaluado por 3 días a 37°C.

Día de almacenamiento	Concentración del extracto	UFC/g
1	Control	Incontable
	E. Acetónico al 2%	4.9X10 ⁹
	E. Acetónico al 10%	2.4X10 ⁹
2	Control	Incontable
	E. Acetónico al 2%	1.3X10 ⁹ valor estimado
	E. Acetónico al 10%	NA
3	Control	Incontable
	E. Acetónico al 2%	Incontable
	E. Acetónico al 10%	2.8X10 ⁹

NA: no aplica, control: muestra de frijol sin adición de extracto de *H. sabdariffa*.

Los extractos obtenidos de los cálices de *H. sabdariffa* han demostrado efectos antibacterianos frente a bacterias Gram positivas y negativas, como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, esto es dependiente de los compuestos activos que se encuentran presentes en los cálices de la flor de *H. sabdariffa* (Vivas-Leguizamón 2014) como lo son algunos ácidos fenólicos como el ácido protocateico, ácido pelargonídico, eugenol, catequina, ácido cafeico, rutina, ácido gálico y algunos esteroides como el β -sitosterol, y ergosterol, también se ha reportado la presencia de compuestos fitoquímicos como el ácido ascórbico, β -caroteno, compuestos fenólicos y antocianinas y algunos ácidos orgánicos como ácidos succínico, oxálico, tartárico y málico (Morales-Ángel 2005).

En un estudio realizado por Rodríguez-González and Fernández Rojas en 2015, observaron que los métodos de conservación más utilizados para frijoles cocidos en zonas rurales y urbanas era el hervido diario, la refrigeración y la congelación de estos. Los resultados mostraron que existe relación entre el método utilizado para la conservación y la duración de los frijoles. En las familias que utilizaban el hervido frecuente de los frijoles, la duración en promedio era de entre cuatro y cinco días, mientras que en las familias que utilizaban la congelación como

método de conservación, la duración de los frijoles era de entre seis y ocho días y el método de conservación en refrigeración, la duración en promedio era de 5.5 días.

Si bien, la conservación en refrigeración y congelación son prácticas adecuadas, ya que permite mantener a los frijoles en buenas condiciones y la retención de los nutrientes es muy alta, un proceso de descongelamiento y recalentamiento inadecuado puede ocasionar pérdidas en el contenido de nutrientes. Por el contrario, conservar los frijoles utilizando el hervido diario va en contra de la calidad nutricional de los frijoles, ya que están expuestos al calor por más tiempo, al menos dos veces al día, por el periodo de duración de los mismos, además de ser un método que las personas realizaban solo por costumbre y por desconocer los efectos adversos que tiene este método en relación con la calidad nutricional del frijol (Rodríguez-González and Fernández-Rojas 2015).

Es por ello y de acuerdo con estos resultados obtenidos, se puede observar que la utilización de extractos de *H. sabdariffa*, en especial el extracto acetónico a una concentración del 10% muestran un gran potencial para la conservación de frijoles. Esto es un hecho de gran importancia, ya que, en la actualidad, se están investigando nuevas tecnologías o alternativas de conservación no térmica de alimentos, en las cuales se trata de mantener las propiedades naturales del alimento sin tener modificaciones en su composición. Sin embargo, aunque algunas de estas tecnologías son eficaces para inactivar los microorganismos más comunes relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), no son eficaces contra las esporas que algunos de ellos producen (Nahuatt et al. 2017).

8.5 Evaluación del efecto del extracto acetónico al 10% sobre la vida útil de frijoles refritos almacenados a temperatura ambiente a las 0, 8, 24, 48 y 72 horas

Posterior a la evaluación del extracto acetónico a una concentración del 10% en frijoles refritos almacenados a temperatura ambiente, no se mostró crecimiento

microbiano a las 0, 8 y 24 horas de almacenamiento, mientras que a las 48 y 72 horas de almacenamiento solo se mostró el crecimiento de 1 cepa de bacterias, sin en cambio de acuerdo con la NOM-092-SSA1-1994 este dato no es representativo ya que, después de la incubación, se deben de contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias (NOM-092 1995).

El resultado obtenido en este estudio mostró un gran efecto del extracto acetónico sobre la vida útil de los frijoles preparados, ya que cabe mencionar que para que se produzcan cambios durante el deterioro del alimento, tanto en el color, olor y textura en los alimentos, así como la formación de lama o gas y la acumulación de exudados, los microorganismos deterioradores deben haberse multiplicado hasta alcanzar concentraciones elevadas de ellos, que oscila entre 10^6 y 10^8 UFC/g, mL o cm^2 . Aunque esta concentración varía dependiendo del alimento del cual se trate y del tipo de microorganismo, las bacterias y levaduras tienen que proliferar desde un nivel normal, hasta alcanzar una concentración de alrededor de 10^7 UFC/g, mL o cm^2 . Sin embargo, la descomposición asociada a la formación de H_2S , algunas aminos y formación de H_2O_2 , se pueden detectar a concentraciones menores (Bibek and Arun 2010).

Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes de la adición de los extractos de *H. sabdariffa* a las muestras de frijoles preparados, es que modifican tanto el color como sabor de los frijoles tomando una apariencia rojiza, lo cual puede deberse a la presencia de antocianinas en los extractos como la delfinidina y antocianinas basadas en cianidina, como lo es la delfinidina-3-sambubiósido (hibiscina), cianidina-3-sambubiósido (gospicanina), cianidina-3,5-diglucósido, delfinidina (antocianidina) y otros (Da-Costa-Rocha et al. 2014). Por otra parte, los frijoles refritos toman un sabor ácido, lo cual puede deberse a la presencia de ácidos orgánicos en los cálices de *H. sabdariffa*, entre los cuales se encuentran el ácido cítrico, málico, tartárico e hibisco (Morales et al. 2014).

9. Conclusiones

Los extractos de *Hibiscus sabdariffa* mostraron actividad antimicrobiana contra microorganismos deterioradores de frijol refrito mostrando halos de inhibición comparados a los observados contra microorganismos patógenos.

El extracto acetónico mostró una mayor actividad antimicrobiana contra los microorganismos deterioradores de los frijoles preparados.

La adición de ácido láctico a los extractos de *H. sabdariffa* incrementa de manera significativa la actividad antimicrobiana de los extractos contra las cepas deterioradoras obtenidas.

El extracto acetónico de *H. sabdariffa* incrementan el tiempo de conservación de los frijoles preparados, aun en condiciones de temperatura ambiente (3 días).

10. Bibliografía

Agency, Environment. 2002. "The Microbiology of Drinking Water. Part 1. Water Quality and Public Health. Methods for the Examination of Waters and Associated Materials." *ENVIRONMENT AGENCY*.

Aguilar Morales, Jessica. 2012. "Métodos de Conservación de Alimentos." *RED TERCER MILENIO*.

Alarcón-Alonso, Javier, Alejandro Zamilpa, Francisco Alarcón Aguilar, Maribel Herrera-Ruiz, Jaime Tortoriello, and Enrique Jimenez-Ferrer. 2012. "Pharmacological Characterization of the Diuretic Effect of Hibiscus Sabdariffa Linn (Malvaceae) Extract." *Journal of Ethnopharmacology*.

Badui, Dergal Salvador; 2006. *Química de Los Alimentos*. PEARSON.

Barbosa, Gustavo V. Cánovas and Daniela Aguirre Bermúdez. 2010. "Nonthermal Processing of Food." *Scientia Agropecuaria* 1(1):81–93.

Becton Dickinson. 2003. "BD Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)." *BD Diagnostic Systems* 1–4.

Bibek, Ray and Bhunia Arun. 2010. *Fundamentos de Microbiología de Los Alimentos*. Cuarta Edi.

Britania Lab.- S.A. 2008. "Mac Conkey Agar." *Laboratorio Britania* 1–2.

Britania, Laboratorios. 2010. "Violeta Rojo y Bilis Glucosa Agar." *Laboratorios Britania* 1–2.

Britania, Laboratorios. 2015a. "E.M.B (Con Eosina y Azul de Metileno)." *Laboratorios Britania* 10–11.

Britania, Laboratorios. 2015b. "Simmons Citrato Agar." *Laboratorios Britania* 84(3):178.

Calderón Miranda, M., M. Gonzalez San Martin, G. Barbosa Cánovas, and B.

- Swanson. 1998. "Métodos No Térmicos Para Procesamiento de Alimentos: Variables e Inactivación Microbiana." *Brazilian Journal of Food and Technology* 1:3–11.
- Camelo Méndez, Gustavo Adolfo. 2013. "Caracterization Química y Colorimétrica de Cultivares de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.)." *Instituto Politécnico Nacional*.
- Castañeda, R. and A. Cáceres. 2014. "Compuestos Bioactivos y Propiedades Terapéuticas de Los Cálices de Rosa de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* Linn)." *Revista Científica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas*.
- Cruz-Gálvez, Andrés M., Carlos A. Gómez-Aldapa, José R. Villagómez-Ibarra, Norberto Chavarría-Hernández, Julio Rodríguez-Baños, Esmeralda Rangel-Vargas, and Javier Castro-Rosas. 2013. "Antibacterial Effect against Foodborne Bacteria of Plants Used in Traditional Medicine in Central Mexico: Studies in Vitro and in Raw Beef." *Food Control*.
- Da-Costa-Rocha, Inês, Bernd Bonnlaender, Hartwig Sievers, Ivo Pischel, and Michael Heinrich. 2014. "Hibiscus Sabdariffa L. - A Phytochemical and Pharmacological Review." *Food Chemistry*.
- DU, C. T. and F. J. FRANCIS. 1973. "Anthocyanins of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*, L.)." *Journal of Food Science*.
- European Food Safety Authority. 2014. "La Cafeína." *European Food Safety Authority*.
- Fellows, Peter J. 1994. "Tecnologías Del Procesado de Los Alimentos: Principios y Prácticas." *ACRIBIA, S.A.*
- Fuentes, A., E. García, and I. Fernández. 2012. "Determinación de Sorbato Potásico y Benzoato Sódico En Alimentos Por HPLC." *Universidad Politécnica de Valencia* 1–8.

- Gómez-Aldapa, Carlos A., Lizbeth A. Portillo-Torres, José R. Villagómez-Ibarra, Esmeralda Rangel-Vargas, Alejandro Téllez-Jurado, Andrés M. Cruz-Gálvez, and Javier Castro-Rosas. 2018. "Survival of Foodborne Bacteria on Strawberries and Antibacterial Activities of Hibiscus Sabdariffa Extracts and Chemical Sanitizers on Strawberries." *Journal of Food Safety* 38(1).
- González-Castell, Dinorah, Teresa González-Cossío, Simón Barquera, and Juan A. Rivera. 2007. "Alimentos Industrializados En La Dieta de Los Preescolares Mexicanos." *Salud Publica de Mexico*.
- González Flores, Tania and Rafael Antonio Rojas Herrera. 2005. "Enfermedades Transmitidas Por Alimentos y PCR: Prevención y Diagnóstico." *Salud Pública de México* 47(5):388–90.
- Gutiérrez-Alcántara, Eduardo J., Carlos A. Gómez-Aldapa, Alma D. Román-Gutiérrez, Esmeralda Rangel-Vargas, Luis G. González-Olivares, and Javier Castro-Rosas. 2016. "Antimicrobial Activity of Roselle Hibiscus Sabdariffa Calyx Extracts on Culture Media and Carrots Against Multidrug-Resistant Salmonella Strains Isolated from Raw Carrots." *Journal of Food Safety*.
- Hernández-Hernández, Mariana. 2015. "Consumo de Alimentos Procesados y Su Relación Con Enfermedades." Retrieved October 10, 2018 (<https://es.scribd.com/document/270242861/Consumo-de-Alimentos-Procesados>).
- Holt-Harris and Oscar Teague. 1916. "A New Culture Medium for the Isolation of Bacillus Typhosus from Stools." *Oxford University Press Stable* 18(6):596–600.
- INSHT. 2010. "Ácido Acético." *Documentación Toxicológica Para La Actualización Del Límita de Exposición Profesional Del Ácido Acético* 1–10.
- INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo). 2006. "Dióxido de Azufre." *Fichas Internacionales de Seguridad Química*. 1–5.

- Jirovetz, Leopold, Walter Jäger, Gerd Remberg, Jaime Espinosa-Gonzalez, Rodolfo Morales, Alexander Woidich, and Alexej Nikiforov. 1992. "Analysis of the Volatiles in the Seed Oil of Hibiscus Sabdariffa (Malvaceae) by Means of GC-MS and GC-FTIR." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Khafaga, E. R., H. Koch, M. F. El Afry, and D. Prinz. 1980. "Stage of Maturity and Quality of Karkadeh (Hibiscus Sabdariffa L. Var. Sabdariffa)." *Angewandte Botanik* 287-318.
- Kopper, G., G. Calderón, Sheryl Schneider, Wilfredo Domínguez, and Guillermo Gutiérrez. 2009. "Enfermedades Transmitidas Por Alimentos y Su Impacto Socioeconómico." in *Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria*.
- De la Cruz Recinos, Mayra Lorena. 2010. *Modernización y Actualización de Controles Eléctricos y Neumáticos Del Procesamiento Industrial En El Área de Frijol*. Guatemala.
- Lara-Flores, Miguel. 2015. "El Cultivo de Frijol En México." *Revista Digital Universitaria* 1-11.
- López, L., M. Hernández, C. Colín, S. Ortega, G. Cerón, and R. Cendejas. 2014. "Las Tinciones Básicas En El Laboratorio de Microbiología." *Investigación En Discapacidades*.
- MacFaddin, Jean F. 2003. *Pruebas Bioquímicas Para La Identificación de de Bacterias de Importancia Clínica*. Tercera Ed.
- Marco-Molés, R., I. Hernando, E. Llorca, and I. Pérez-Munuera. 2009. "Main Chemical Changes in Proteins and Structure of Egg Treated with High Pressure Homogenisation." *Czech Journal of Food Sciences* 27(SPEC. ISS.).
- Marco-Molés, Raquel. 2011. "Impacto de Nuevas Tecnologías de Conservación Sobre La Estructura y Los Principales Componentes Químicos de Alimentos Fluidos." *Universidad Politécnica de Valencia*.

- Mast Group. 2016. "Triple Sugar Iron Agar (T . S . I .)." *Mast Group* 1.
- Morales-Ángel, Gabriela Del Carmen. 2005. "Evaluación de La Actividad Antioxidante de Extractos de Flor de Jamaica (Hibiscus Sabdariffa) Contra La Oxidación in Vitro de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL)." *Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (Ldl)*.
- Morales, Balois, Sánchez Herrera, and Leticia Mónica. 2014. "Potential of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L .) in the Development of Functional Foods with Antioxidant Activity." *Revista Mexicana de Agronegocios*.
- Müller, B. and G. Franz. 1989. "Polysaccharides from Hibiscus Sabdariffa Structural Investigation and Biological Activity." *Planta Médica*.
- Nahuatt, Gibran López, María Teresa Sumaya Martínez, Edgar Iván Jiménez Ruiz, Rosendo Balois Morales, Raquel Enedina Medina Carrillo, and Juan Guzmán Ceferino. 2017. "Propiedades Antimicrobianas y Antioxidantes de Jamaica." *Acta Agrícola y Pecuaria* 3(3):61–69.
- Negi, Pradeep Singh. 2012. "Plant Extracts for the Control of Bacterial Growth: Efficacy, Stability and Safety Issues for Food Application." *International Journal of Food Microbiology*.
- Nieto-Orozco, Claudia, Alik Chanin Sangochian, Natalia Tamborrel Signoret, Eloín Vidal González, Lizbeth Tolentino-Mayo, and Arely Vergara-Castañeda. 2017. "Percepción Sobre El Consumo de Alimentos Procesados y Productos Ultraprocesados En Estudiantes de Posgrado de La Ciudad de México." *Journal of Behavior, Health & Social Issues*.
- NOM-092, Diario Oficial. 1995. "Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios, Método Para La Cuenta de Bacterias Aerobias En Placa." *Diario Oficial de La Federación*.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. "Enfermedades Transmitidas Por Alimentos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología

Médica.” *Departamento de Vigilancia Alimentaria Del INAL- ANMAT* 1–4.

Orozco Estrada E., Méndez Gómez-Humarán M.C., Elton Puente E., and O. Martínez González. 2007. “Prevalencia de Contaminación Microbiologica de Los Alimentos Preparados Que Se Venden En Las Tortillerias de La Ciudad de Queretaro.” *Universidad Autónoma de Querétaro*. 1(20):4.

Ortega-Cid, S. and J. A. Beltrán Guerrero. 2012. “Propiedades Funcionales de La Jamaica (Hibiscus Sabdariffa L .).” *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 2(6):47–63.

Othman, Mukhrizah, Hwei San Loh, Christophe Wiart, Teng Jin Khoo, Kuan Hon Lim, and Kang Nee Ting. 2011. “Optimal Methods for Evaluating Antimicrobial Activities from Plant Extracts.” *Journal of Microbiological Methods*.

Pisoschi, Aurelia Magdalena, Aneta Pop, Cecilia Georgescu, Violeta Turcuş, Neli Kinga Olah, and Endre Mathe. 2018. “An Overview of Natural Antimicrobials Role in Food.” *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Ramírez-Rodríguez, Milena M., Maria L. Plaza, Alberto Azeredo, Murat O. Balaban, and Maurice R. Marshall. 2011. “Physicochemical and Phytochemical Properties of Cold and Hot Water Extraction from Hibiscus Sabdariffa.” *Journal of Food Science*.

Ramirez, Jose, Petra Rosas, Martha Velazquez, Jose Ulloa, and Francisco Arce. 2011. “Bacterias Lácticas: Importancia En Alimentos y Sus Efectos En La Salud.” *Revista Fuente*.

Rangel-Vargas, Esmeralda, Eduardo J. Gutiérrez-Alcántara, Carlos A. Gómez-Aldapa, Reyna N. Falfán-Cortés, Jesús A. Segovia-Cruz, Laura P. Salas-Rangel, and Javier Castro-Rosas. 2017. “Antibacterial Activity of Roselle Calyx Extracts, Sodium Hypochlorite, Colloidal Silver and Acetic Acid against Multidrug-Resistant Salmonella Serotypes Isolated from Coriander.” *Journal of Food Safety* 37(2):1–8.

- Rodríguez-González, Shirley and Xinia Elena Fernández-Rojas. 2015. "Prácticas de Preparación y Conservación de Frijoles En Familias Costarricenses." *Agronomía Mesoamericana* 26(1):153.
- Rodríguez-Licea, Gabriela, José Alberto García-Salazar, Samuel Rebollar-Rebollar, and Andrés Cuautémoc Cruz-Contreras. 2010. "Preferencias Del Consumidor de Frijol (*Phaseolus Vulgaris* L.) En México: Factores y Características Que Influyen En La Decisión de Compra Diferenciada Por Tipo y Variedad." *Paradigma Económico* 2(1):121–45.
- SAGARPA. 2017. "Agrícola Nacional FRIJOL." *Secretaría De Agricultura* 191.
- Sáyago- Ayerdi, Sonia G. and Isabel Goñi. 2010. "Hibiscus Sabdariffa L: Fuente de Fibra Antioxidante." *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 60(10):79–84.
- Secretaría de Economía. 2012. "Análisis de La Cadena de Valor Del Frijol. Secretaría de Economía. Dirección General de Industrias Básicas." *Secretaría de Economía* 1–41.
- Serna, L. and A. Rodríguez. 2005. "Producción Biotecnológica de Ácido Láctico: Estado Del Arte." *Ciencia y Tecnología Alimentaria*.
- Stan, Codex. 2011. "CODEX STAN 192-1995 Página 1 de 297."
- Suárez Semour, Alicia. 1979. "Estudio Sobre El Efecto de Diferentes Concentraciones de Alcoholes Primarios Sobre La Viabilidad de *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia Coli* y La Integridad de Sus Respective Esferoplastos." *Universidad Autónoma de Nuevo León*.
- Torres Carmona, Sergio. 2018. "Los Contrastes de Los Alimentos Procesados."
- Trujillo Hernández, Juan Carlos. 2015. "Evaluación de Conservadores Naturales (Ácido Cítrico, Vinagre de Manzana y Aceite Esencial de Orégano) En Panes Tipo Muffins." *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*.

- Valle Vega, Pedro and Bernardo Lucas Florentino. 2000. *Toxicología- Libro*. México, D.F.
- Valtek S.A. 2009. "Medio L.I.A. (Lysine-Iron-Agar)." *Valtek Diagnostics* (562).
- Ventanas, Sonia, Diana Martín, Mario Estévez, and Jorge Ruiz. 2004. "Nitratos , Nitritos y Nitrosaminas En Productos Cárnicos (I)." *Eurocarne* 129:1–15.
- Villeda Moreno, José Juan. 2010. "„ Conservadores Químicos Utilizados En La Industria Alimentaria ."" *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro* 67.
- Vivas-Leguizamón, Laura Vanessa. 2014. "Control de Calidad de Hibiscus Sabdariffa L. (Malvaceae): Estudio Farmacobotánico, Análisis de Polifenoles y Actividad Antioxidante Aplicables En Un Laboratorio de Baja." *Universidad de Buenos Aires* 1–135.
- Ximhai, Ra, Elvia Nereyda, and Rodríguez Saucedo. 2011. "Natural Antimicrobial Agent Use in the Preservation of Fruits and Vegetables." *Ra Ximhai* 7(1):153–70.