



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Área Académica de Química

Licenciatura en Química en Alimentos

Tesis:

**EFFECTO DEL MÉTODO Y LA TEMPERATURA DE
EXTRACCIÓN SOBRE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA
DEL EXTRACTO ACUOSO DE UNA PLANTA**

Que para obtener el título de:

Licenciada en Química en Alimentos

Presenta:

Enaim Aída Vargas León

Bajo la dirección de:

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Dr. Javier Castro Rosas



QUÍMICA EN ALIMENTOS

Mineral de la Reforma, Hidalgo, Febrero de 2011

*A los que tienen paciencia,
las pérdidas se les convierten en ganancias,
y los trabajos en merecimientos,
y las batallas en coronas.*

Fray Luis de Granada

*A todas aquellas personas que han creído en mí,
& que saben lo mucho que me ha costado este logro...*

Doy gracias:

A Dios por darme, la vida, la fuerza, la fe, la esperanza y la confianza para llegar a este gran logro, de tan difícil camino, ya que todo esto me permitió derribar barreras, esquivar obstáculos y levantarme de las duras caídas. Por la vida, la dicha y la alegría de ser quien soy con virtudes y defectos, con fuerzas y debilidades, con errores y aciertos, por permitirme disfrutar todos y cada uno de los momentos especiales y únicos, así como aprender de aquellos momentos difíciles y dolorosos. Por la maravillosa familia que tengo y por todas aquellas grandes amistades que han estado a mi lado durante esta aventura.

A mi mamá (Aída León) por su incondicional apoyo, paciencia, confianza y amor, por todas sus enseñanzas y su formación, por ser tan fuerte y capaz de guiarnos en todo momento por el camino correcto, por su lucha constante, por sus sacrificios y esfuerzos para que en ningún momento nos faltara nada, y sobre todo por estar a mi lado, "sin ti esto no sería posible, te amo".

A don Silvano Martínez por hacer feliz a mi mamá y estar con nosotros cuando lo hemos necesitado, apoyándonos incondicionalmente.

A Urin (mi hermana) por su apoyo en todo momentos y en varias tareas, por su cariño, paciencia, comprensión y su carácter complicado, por todas sus ocurrencias, pláticas divertidas e interesantes, por estar a mi lado, "te adoro".

A Damna (mi pequeña hermana) que siempre está a mi lado con una sonrisa, una palabra de ánimo, con sus ocurrencias y por todo el cariño y admiración que me tiene y que siempre me demuestra, "te adoro princesa".

A mi papá (Miguel Ángel Vargas) que a pesar de muchas complicaciones, peleas y batallas, me ha apoyado y ha tenido paciencia y confianza para que yo cumpla con esta meta, esperando que esto no cambie, pero si mejore su comprensión, "Te quiero mucho"

A Araceli Valencia por estar a lado mi papá, apoyándolo e impulsarlo, por su hospitalidad, apoyo, cariño y comprensión.

A mi abuelito Jesús León †, que con su carácter, enseñanza y ejemplo forjó una familia fuerte y con ganas de salir adelante en todo momento. A mi abuelita Elizabeth Guerara, que con su cariño, ejemplo, enseñanzas, comprensión y apoyo, siempre ha estado a mi lado.

A mis tíos Ariel León y Rossy Mendoza, Jesús León y Carmen Dineda, por su infinito apoyo, por su cariño, bromas y enseñanzas que cada uno me ha brindado.

A mis abuelitos Juan Vargas y Flavia Oaxaca, así como a mi tía Isabel Vargas, por su cariño, apoyo y confianza, por impulsar a mi papá a continuar y apoyarnos a pesar de las complicaciones de la vida.

A la familia Mata Muñoz por todo su apoyo y hospitalidad brindada por cada uno de sus miembros. Por permitirme entrar a su familia y conocerlos, por permitirme ser parte de tantos momentos especiales y uno que otro difícil. Por su buen humor y su carácter. Por todas sus atenciones, su confianza y su cariño. Fabián "gracias por estar a mi lado y por todo lo que hemos vivido juntos".

A mis grandes amigas Aracely, Judith y Alma Rocío, con quienes he compartido maravillosos momentos, experiencias, llanto y una que otra locura, porque cada una me ha escuchado y a compartido conmigo una parte de sus vidas.

A los costalitos por sus grandes amistades, la convivencia y sobre todo por permitirme ser parte de ellos y de sus vidas

A Mariacruz, Edith y Socorro, quienes han sido mis amigas desde el bachillerato y continúan a mi lado a pesar del tiempo y la distancia, con sus amistades únicas, he incondicionales.

A F. G. S. por su presencia y apoyo en aquella etapa tan complicada de mi vida, por sus enseñanzas, consejos y palabras de aliento. Por todos sus detalles y aquellos libros donados para la causa. Por todo su cariño, paciencia y comprensión. Por su madurez y su locura. En fin gracias por estar a mi lado en aquellos días y que a pesar de la distancia, los años, los obstáculos y las diferencias, su presencia en mi vida es parte de este logro.

Al Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa, por todas sus enseñanzas, sus conocimientos y experiencias. Por su confianza y su incondicional apoyo, por cada palabra de aliento, por cada consejo, por cada regaño, por cada palabra oportuna y por escucharme compartiendo sonrisas y una que otra lagrimea. Por la convivencia y por su gran amistad. Y sobre todo por creer en mí e impulsarme a continuar.

Al Dr. Javier Castro Rosas, por todos sus conocimientos y enseñanzas dentro del laboratorio y las aulas, por su apoyo y uno que otro regaño, por enseñarme a aplicar lo teórico en lo práctico (hacerme pensar). Por su amistad y confianza.

Y a todas aquellas personas que han sido parte de este logro de forma directa o indirecta, ya que sus palabras, enseñanzas, convivencia, amistad o presencia en mi vida, me han dado fortaleza y ganas de continuar...

GRACIAS

El presente trabajo forma parte de un estudio complejo, cuyo objetivo es desarrollar un agente antimicrobiano o conservador para alimentos a partir de los extractos obtenidos. Se ha iniciado el trámite de patente para registrar los productos desarrollados, en consecuencia, por cuestiones de confidencialidad, el nombre de la planta de estudio, así como parte de la información referente a ella ha quedado restringida en este trabajo.

The logo features a large, stylized golden number '50' that overlaps a faint architectural drawing of a building. Below the '50' is the word 'ANIVERSARIO' in a bold, serif font. Underneath that is the text 'UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO' in a smaller, all-caps serif font. At the bottom, the years '1961 - 2011' are displayed in a large, bold, serif font.

ANIVERSARIO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
1961 - 2011



Este trabajo, fue realizado dentro en los laboratorios de Fisicoquímica de Alimentos 1 y de Microbiología de Alimentos, del edificio de Química en Alimentos, así como dentro de algunos de los laboratorios del Centro de Investigaciones Químicas, del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, agradeciendo el apoyo, recomendaciones y conocimientos compartidos por parte de los responsables de cada uno de estos.



ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
I.INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Agentes antimicrobianos	3
2.1.1 Agentes antimicrobianos sintéticos	5
2.1.1.1 Ácido benzoico y benzoatos	6
2.1.1.2 Ácido sórbico y sorbatos	7
2.1.1.3 Ácido acético y acetatos	8
2.1.1.4 Ácido propiónico y propionatos	9
2.1.1.5 Ácido fórmico y formiatos	9
2.1.1.6 Parabenos	10
2.1.1.7 Sulfitos	10
2.1.1.8 Nitritos y nitratos	12
2.1.1.9 Hexametilentetramina	13
2.1.1.10 Formaldehido	14
2.1.1.11 Anhídrido carbónico	14
2.1.1.12 Cloruro de sodio (sal común)	15
2.1.1.13 Antibióticos	15

	Página
2.1.1.14 Agua oxigenada	16
2.1.1.15 Ácido bórico	17
2.1.1.16 Cloro	17
2.1.2 Agentes antimicrobianos de origen natural	18
2.1.2.1 Clasificación de los compuestos antimicrobianos de origen vegetal	19
2.1.2.1.1 Fenoles y derivados	21
2.1.2.1.1.1 Compuestos fenólicos simples	21
2.1.2.1.1.2 Quinonas	22
2.1.2.1.1.3 Taninos	22
2.1.2.1.1.4 Cumarinas	23
2.1.2.1.1.5 Flavonas y compuestos relacionados	23
2.1.2.1.2 Ácidos orgánicos	24
2.1.2.1.3 Aldehídos	25
2.1.2.1.4 Alcaloides	25
2.1.2.1.5 Terpenos y aceites esenciales	25
2.1.2.1.6 Lectinas y polipéptidos	27
2.1.2.1.7 Cromenos y benzofuranos	29
2.1.2.2 Principales fuentes de fitoquímicos vegetales	29
2.1.2.2.1 Especies	30
2.1.2.2.2 Hierbas y plantas	31
2.1.2.3 Modo de acción de los compuestos antimicrobianos de origen vegetal	32

	Página
2.1.2.4 Eficacia de los compuestos antimicrobianos de origen vegetal	33
2.2 Efectos de los antimicrobianos sobre la Salud	34
2.3 Microorganismos de interés en la industria alimentaria	37
2.3.1 Microorganismos deterioradores de alimentos	38
2.3.2 Microorganismos patógenos en alimentos	39
2.3.2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)	39
2.4 Métodos de prueba para determinar el efecto de los compuestos antimicrobianos	42
2.5 Estudio previo	44
III. OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo general	45
3.2 Objetivos específicos	45
IV. METODOLOGÍA	46
4.1 Materiales	46
4.1.1 Medios de cultivo	46
4.1.2 Reactivos	46
4.1.3 Cepas	46
4.1.4 Material de uso común	46
4.1.5 Aparatos e instrumentos	47
4.2 Obtención de extractos a diferentes temperaturas	47
4.2.1 Extracciones sucesivas	47
4.2.2 Extracción simple	48

	Página
4.2.3 Concentración del extracto	48
4.3 Evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos	49
4.3.1 Preparación de cepas	49
4.3.2 Preparación del inóculo	49
4.3.3 Evaluación por halos de inhibición	49
4.3.4 Evaluación por vertido en placa	51
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	53
5.1 Lectura de halos de inhibición	53
5.2 Vertido en placa	63
VI. CONCLUSIONES	75
VII. BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas.	21
Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias de aceites esenciales probados “ <i>in vitro</i> ” contra microorganismos patógenos transmitidos por alimentos.	28
Tabla 3. Sustancias antimicrobianas contenidas en algunas especias.	31
Tabla 4. Lista de FDA de algunas especias, aromatizantes y saborizantes naturales considerados GRAS.	36
Tabla 5. Enfermedades comunes transmitidas a través de los alimentos, causadas por bacterias.	41
Tabla 6. Métodos para evaluar la eficacia de antimicrobianos para alimentos.	43
Tabla 7. Diámetro de los halos de inhibición generados por los extractos concentrados, obtenidos por extracción sucesiva y extracción simple a las tres temperaturas de estudio.	55
Tabla 8. Diámetro de los halos de inhibición de los extractos diluidos 1:5, obtenidos mediante extracciones sucesivas y extracción simple a las tres temperaturas de estudio.	59
Tabla 9. Diámetro de los halos de inhibición de los extractos diluidos 1:10, obtenidos mediante extracciones sucesivas y extracción simple a las temperaturas de estudio.	61
Tabla 10. Promedio de los porcentajes de inhibición por vertido en placa para T_0 y T_{20} , con su correspondiente desviación estándar.	65
Tabla 11. Análisis estadístico de los porcentajes de inhibición a T_0 .	67
Tabla 12. Análisis estadístico de los porcentajes de inhibición al T_{20} .	71

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras químicas de compuestos antimicrobianos presentes en plantas.	20
Figura 2. Halos de inhibición generados por los extractos concentrados, obtenidos vía extracción simple sobre <i>P. auruginosa</i> .	53
Figura 3. Halos generados por los extractos concentrados, obtenidos por los dos métodos, sobre <i>L. monocytogenes</i> .	54
Figura 4. Comparación del efecto de los extractos concentrados y en dilución 1:10 sobre <i>S. choleraesuis</i> , obtenidos por extracción simple.	62
Figura 5. Efecto de la metodología de extracción sobre el porcentaje de inhibición al T ₀ .	68
Figura 6. Efecto de la temperatura de extracción sobre el porcentaje de inhibición al T ₀ .	69
Figura 7. Influencia de las bacterias en el porcentaje de inhibición.	70
Figura 8. Efecto de la metodología de extracción sobre el porcentaje de inhibición al T ₂₀ .	72
Figura 9. Efecto de la temperatura de extracción sobre el porcentaje de inhibición al T ₂₀ .	73
Figura 10. Porcentajes de inhibición para cada una de las bacterias probadas a T ₂₀ .	73

I.INTRODUCCIÓN

La principal causa de deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes como para distribuidores y consumidores. Se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos. Por otra parte, los alimentos alterados pueden resultar muy perjudiciales para la salud del consumidor, principalmente por la presencia de bacterias como *Salmonella*, *Pseudomona*, *Shigella*, *Escherichia coli O157:H7*, *Staphylococcus* o *Listeria monocytogenes*, conocidas como agentes toxiinfecciosos, las cuales conforman los principales agentes invasores, con alta patogenicidad. Evitar su desarrollo y propagación constituye la base de la investigación en microbiología de alimentos.

Esto ha generado que la demanda de alimentos seguros por parte de la población se haya incrementado con el tiempo y con el crecimiento de la misma, por lo cual se han desarrollado un gran número de técnicas de conservación, para inhibir las alteraciones de alimentos por microorganismos, sin embargo, es un tema complejo, con un gran número de variables a considerar. El uso de agentes químicos es uno de los métodos de conservación más antiguos y tradicionales que existe, sin embargo, en la actualidad no cumplen con el concepto de natural o seguro que los consumidores demandan, ya que algunos de estos aditivos son sospechosos de poseer cierto grado de toxicidad

Es así, como los investigadores y productores se han visto forzados a tratar de disminuir o remover totalmente el uso de antimicrobianos químicos o adoptar alternativas naturales para el mantenimiento o extensión de la vida útil de los productos. Las nuevas tendencias de investigación persiguen garantizar la conservación e inocuidad de los alimentos a través de la adición de agentes antimicrobianos extraídos de fuentes naturales, que contienen compuestos con la capacidad de inhibir el desarrollo o crecimiento de dichos patógenos.

Los antimicrobianos de origen natural son compuestos con capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, incluyendo bacterias, virus y hongos, constituyen una nueva forma de garantizar alimentos seguros, manteniendo inalterable la calidad del alimento. Dichos compuestos son

principalmente metabolitos secundarios o fitoquímicos producidos por las plantas o en alguna parte de ellas como lo son las flores o los frutos.

Las plantas, hierbas y especies, así como sus aceites esenciales, contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos. Wilkins y Board (1989) reportan más de 1340 plantas como potenciales fuentes de antimicrobianos. Los compuestos antimicrobianos de las plantas, se encuentran generalmente en el aceite esencial obtenido a partir de hojas, flores, bulbos, rizomas y frutos. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de ciertos metabolitos. La mayoría de estos, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides.

Por estas razones la extracción y estudio de compuestos con capacidad antimicrobiana, obtenidos de plantas, se ha convertido en un amplio campo de estudio, teniendo un gran impacto en la industria alimenticia. Considerando dichos aspectos el presente trabajo parte de un estudio complejo que tiene como objetivo el desarrollo de un aditivo antimicrobiano derivado de una planta, que por fines de patente, su nombre no es revelado. En esta etapa se prueba el efecto de la metodología y la temperatura de extracción en medio acuoso del extracto fitoquímico, sobre su capacidad antimicrobiana, con el fin de determinar las condiciones de extracción óptimas para la obtención de dicho compuesto, sin alterar o modificar su capacidad antimicrobiana, optimizando de esta forma la metodología de obtención del compuesto para estudios posteriores que le dan continuidad al desarrollo del aditivo antimicrobiano.

II. ANTECEDENTES

2.1 Agentes antimicrobianos

La principal causa de deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo). Se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos. Por otra parte, los alimentos alterados o contaminados por microorganismos pueden resultar perjudiciales para la salud del consumidor, por ejemplo la toxina botulínica, producida por la bacteria *Clostridium botulinum*, en las conservas mal esterilizadas, embutidos y en otros productos, es una de las sustancias más venenosas que se conocen (miles de veces más tóxica que el cianuro), así mismo las aflatoxinas, sustancias producidas por el crecimiento de ciertos mohos, son potentes agentes cancerígenos.

Dichas razones han sido la base de investigación durante muchos años, donde se ha buscado la aplicación de diversas tecnologías con el fin de evitar el deterioro y contaminación de los alimentos por microorganismos. Los métodos más utilizados en su mayoría son físicos, como tratamientos térmicos (pasteurización, esterilización, etc.), congelación, reducción de la actividad de agua (secado, deshidratación, liofilización, etc.), irradiación (no tan utilizada por los prejuicios existentes en los consumidores), altas presiones, etc. (Fernández, 2000). Siguiendo los métodos químicos (agentes antimicrobianos, utilizados como aditivos), el uso de dichos agentes en la industria de alimentos es una práctica comúnmente utilizada para alargar la vida de anaquel de muchos productos, en combinación con los métodos físicos, generando así la tecnología de barreras múltiples, que en la actualidad se está aplicando ampliamente, por sus ventajas y beneficios que ha mostrado tener en todos los productos donde se ha aplicado.

Los agentes antimicrobianos son compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos que retardan el crecimiento o causan la muerte de los microorganismos, aumentando así la resistencia a la alteración de la calidad y seguridad. Los principales blancos de los agentes antimicrobianos son los microorganismos productores de intoxicaciones alimentarias (agentes infecciosos y productores

de toxinas) y los que alteran los alimentos, cuyos productos metabólicos finales (catabolitos) o enzimas causan malos olores, sabores desagradables, problemas de textura, cambios de coloración o riesgo sanitario (Davidson y Zivanovic, 2003).

La mayor parte de los antimicrobianos solamente son bacteriostáticos o fungistáticos, en lugar de bactericidas 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 (legalmente aprobadas y/o sensorialmente aceptables), puede ser preferible utilizar una combinación de ellos, ampliando así el espectro de cobertura en la preservación de alimentos (Raybaudi *et al.*, 2006).

Los antimicrobianos generalmente tienen múltiples blancos con umbrales de concentración para la inactivación o inhibición, pudiendo actuar sobre la pared celular, la membrana celular, las enzimas metabólicas, así como la síntesis de proteínas y sistemas genéticos. Es muy difícil dar en el blanco más crítico cuando tienen lugar simultáneamente muchas reacciones interactivas. Los mecanismos de acción exactos de los antimicrobianos frecuentemente no se conocen o no están bien definidos. Esto se debe principalmente a que los investigadores usualmente se centran en un blanco único como una enzima o la membrana celular, sin determinar el efecto sobre otras funciones celulares (Davidson, 2001).

La eficacia de los antimicrobianos alimentarios depende de muchos factores, entre los que se incluyen: pH, capacidad amortiguadora del alimento, tiempo y temperatura de almacenamiento del alimento, tipo de microorganismo de interés, tipo y concentración del antimicrobiano. Por otra parte, entre los factores que influyen en la actividad antimicrobiana se encuentran la resistencia específica entre células vegetativas y esporas, las diferencias entre cepas, la concentración inicial de microorganismos, la interacción con otros microorganismos y el estado de los mismos (Raybaudi *et al.*, 2006).

Los organismos oficiales correspondientes, al momento de autorizar el uso de determinado aditivo antimicrobiano, consideran que éste sea un auxiliar del procesado correcto de los alimentos y no un agente para enmascarar condiciones de manipulación sanitaria o tecnológicamente deficientes, ni un sistema para defraudar al consumidor, ocultando característica de la frescura real del alimento. Las condiciones de uso de los conservadores están reglamentadas estrictamente en todos los países del

mundo. Usualmente existen límites de la cantidad que se puede añadir de un conservador y los productos en que dicho aditivo puede ser utilizado (Luck y Jager, 1997).

2.1.1 Agentes antimicrobianos sintéticos

El uso de agentes químicos o sintéticos es uno de los métodos de conservación más antiguos y tradicionales que existen, dichas sustancias químicas al ser añadidas intencionalmente al alimento, tienden a prevenir o retardar el deterioro causado a los alimentos por microorganismos, sin embargo, el uso excesivo de conservadores químicos ha resultado en un rechazo por parte de los consumidores hacia la incorporación de estos aditivos en los alimentos procesados, no cumpliendo con el concepto de natural o de seguro, que los consumidores demandan y asocian con alimentos frescos o mínimamente procesados, en los cuales no ha sido añadido ningún conservador químico (Hernández, 2003).

Los antimicrobianos sintéticos utilizados en los alimentos difícilmente pueden provocar la muerte en concentraciones bajas y aunque existe una legislación para el uso de dichas sustancias, desafortunadamente algunas empresas no siempre cumplen con la legislación y en ocasiones emplean concentraciones por encima de la norma, lo cual podría provocar a largo plazo en el consumidor desde alergias menores hasta diversos tipos de cáncer (Rivera, 2008).

A medida que ha progresado la toxicología, los científicos encargados del estudio de los alimentos se han interesado por la utilidad y los efectos de algunos compuestos químicos, con fuerte efecto inhibitor del crecimiento de ciertos microorganismos, como aditivos alimentarios. Solamente unos cuantos de aquellos conservadores potenciales de los alimentos han pasado con éxito su evaluación toxicológica. Dicha situación ha desencadenado en el rechazo por parte de los consumidores de los conservadores sintéticos, quienes día a día se preocupan más por los efectos que tienen los alimentos que consumen sobre su salud, teniendo como consecuencia la creciente búsqueda de conservadores de origen natural (Mossel, 2003).

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 (Cuber *et al.*, 2002).

Debido al riesgo toxicológico que pudiese implicar un aditivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como otras organizaciones internacionales para la agricultura y para la alimentación; por ejemplo FAO, ha sugerido una ingesta diaria aceptable (IDA), en base al peso corporal del individuo, siendo la cantidad de aditivo (u otro compuesto) en un alimento, que puede ser ingerido diariamente en la dieta, durante toda la vida, sin que se presente un riesgo para la salud humana, basándose en estudios de toxicidad aguda y prolongada (FAO/WHO, 1975). Además, se debe aplicar un factor de seguridad que consiste en usar una concentración 100 veces menor respecto a la dosis en la cual no fueron detectados efectos adversos (Cuber *et al.*, 2002). Los principales conservadores de origen sintético utilizados en la industria alimentaria, permitidos por el Codex Alimentario (código alimentario creado por la FAO y la OMS) y se describen a continuación, con su respectivo número E el cual corresponde a un código impuesto a los aditivos alimentarios y se encuentran normalmente especificados en las etiquetas de los productos alimenticios, sobre todo en la zona de la Unión Europea. El esquema de números que sigue se debe al International Numbering System (INS, Sistema Internacional de Numeración) según lo determinado por el órgano correspondiente del Codex Alimentarius.

2.1.1.1 Ácido benzoico y benzoatos

El ácido benzoico (C_6H_5-COOH), (E-210) es uno de los conservadores más empleados en todo el mundo. Aunque el producto utilizado en la industria se obtiene por síntesis química, el ácido benzoico se encuentra presente en forma natural en algunos vegetales, como la canela o las ciruelas. El ácido benzoico es especialmente eficaz en alimentos ácidos y es un conservador barato, útil contra levaduras y en menor proporción contra bacterias y mohos. Sus principales inconvenientes son que tiene un cierto sabor astringente poco agradable y su toxicidad, que aunque relativamente baja, es mayor que la de otros conservadores. En España se utiliza como conservador en bebidas refrescantes, zumos para uso industrial, algunos productos lácteos, en repostería y galletas, en algunas conservas vegetales, como el tomate o el pimiento, mermeladas, crustáceos frescos o congelados, margarinas, salsas y otros productos (Cuber *et al.*, 2002).

El benzoato sódico (C_6H_5COONa), (E-211), el benzoato potásico (C_6H_5COOK), (E-212) y el benzoato cálcico (C_6H_5COOCa), (E-213), son las sales correspondientes a dicho ácido, las cuales son más utilizadas en la industria debido a que cuentan con mayor solubilidad en agua que el ácido

Pueden actuar de varias maneras contra los microorganismos, actuando por ejemplo sobre diversas enzimas de la célula microbiana, como las que regulan el metabolismo del ácido acético y la fosforilación oxidativa; o bien pueden tener acción sobre la membrana interfiriendo la permeabilidad de la pared celular, y dando lugar a una acidificación del contenido celular (Cuber *et al.*, 2002).

La OMS considera como aceptable una ingesta de hasta 5 mg por Kg de peso corporal por día. Con la actual legislación española este límite se puede superar, especialmente en el caso de los niños. Otras legislaciones europeas son más restrictivas. En Francia solo se autoriza su uso en derivados de pescado, mientras que en Italia y Portugal está prohibido su uso en refrescos. Cerca de 50 países en cinco regiones del Codex permiten el uso de ácido benzoico y sus sales en los niveles de 1.000 ppm o mayores. Estos países incluyen los Estados Unidos, Canadá y México. No obstante, la tendencia actual es utilizarlo cada vez menos, substituyéndolo por otros conservadores de sabor neutro y menos tóxico, como los sorbatos. El ácido benzoico no tiene efectos acumulativos, ni es mutágeno o carcinógeno (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.2 Ácido sórbico y sorbatos

El ácido sórbico ($C_6H_8O_2$), (E-200) es un ácido graso insaturado, presente de forma natural en algunos vegetales, pero fabricado para su uso como aditivo alimentario por síntesis química. Este grupo tiene la ventaja tecnológica de ser activo en medios poco ácidos y de carecer prácticamente de sabor. Su principal inconveniente es que son comparativamente caros y que se pierden en parte cuando el producto se somete a ebullición. Son especialmente eficaces contra mohos y levaduras, y menos contra las bacterias (Luck y Jager, 1997).

La acción de este ácido se basa en que tiene la propiedad de unirse a la superficie de las células microbianas, modificando la permeabilidad de la membrana y el metabolismo, y también se ha sugerido que su estructura de dieno interfiere con el sistema enzimático de las deshidrogenasas de los microorganismos (Cuber *et al.*, 2002).

Los sorbatos (E-201 Sorbato sódico ($C_6H_7O_2Na$), E-202 Sorbato potásico ($C_6H_7O_2K$) y E-203 Sorbato cálcico ($C_6H_7O_2Ca$)) se utilizan en bebidas refrescantes, repostería, pastelería y galletas, derivados cárnicos, quesos, aceitunas en conserva, postres lácteos con frutas, mantequilla, margarina, mermeladas y en otros productos. En la industria de fabricación de vino encuentra aplicación como inhibidor de la fermentación secundaria, permitiendo reducir los niveles de sulfitos. Cada vez se usan más los sorbatos en los alimentos en lugar de otros conservadores más tóxicos como el ácido benzoico. Los sorbatos son poco tóxicos, mostrando niveles de toxicidad menores incluso que la sal común o el ácido acético (el componente activo del vinagre). Por esta razón, su uso está autorizado en todo el mundo. Metabólicamente se comporta en el organismo como los demás ácidos grasos, es decir, se absorbe y se utiliza como una fuente de energía (Wedzicha, 1995).

2.1.1.3 Ácido acético y acetatos

El ácido acético (CH_3-COOH), (E-260), en su forma de vinagre, que es esencialmente una disolución de este ácido en agua, más los aromas procedentes del vino y los formados en la acidificación, se utiliza como conservador al menos desde hace 5,000 años. Una gran parte del utilizado actualmente se obtiene por síntesis química. Como conservador es relativamente poco eficaz, con excepción de la aplicación específica en panadería y repostería, donde evita la alteración conocida como "pan filante". También es eficaz contra algunos mohos. Los acetatos más utilizados en la industria alimentaria son: E-261 acetato potásico (CH_3COOK), E-262 acetato sódico (CH_3COONa), E-262 diacetato sódico y el E-263 acetato cálcico (CH_3COOCa) (Cuber *et al.*, 2002).

La acción conservador del ácido acético es un efecto añadido en aquellos productos en los que la acidez o el aroma típico que confiere son deseables o característicos, como en los escabeches, salmueras y encurtidos. En las aplicaciones en las que no resulta desagradable la acidez debe utilizarse algún otro tratamiento conjunto para estabilizar el producto, como el calor (pasteurización), frío (semiconservas), o la combinación del ácido acético con otros conservadores. En mayonesas, por ejemplo, su uso permite reducir la adición de otros conservadores como benzoatos o sorbatos. La legislación española exige en muchos casos que el ácido acético utilizado sea de origen vínico. La razón no es de índole sanitaria sino para la protección de la industria del vinagre. El acetato es una pieza esencial en muchas de las reacciones metabólicas del organismo. El ingerido con la dieta se absorbe y utiliza para la obtención de energía o la fabricación de constituyentes del organismo. El

ácido acético y los acetatos son productos totalmente inocuos a las concentraciones utilizables en los alimentos (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.4 Ácido propiónico y propionatos

El ácido propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) es un ácido graso de cadena corta, sus sales (E-280 ácido propiónico, E-281 propionato sódico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COONa}$), E-282 propionato cálcico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOCa}$) y el E-283 propionato potásico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOK}$)), se usan como conservadores alimentarios desde los años cuarenta, especialmente en panadería. Es el más efectivo contra los mohos de todos los conservadores, pero poco eficaz contra levaduras y bacterias, con alguna excepción. Se utilizan especialmente las sales, ya que el ácido tiene un olor muy fuerte. Son conservadores baratos. Es fundamental en la fabricación del pan de molde, estando autorizado para ello en la mayoría de los países. Esta aplicación por sí sola hace que, si se exceptúa la sal común, sea el conservador más utilizado en el mundo. También se utiliza en algunos productos de repostería. La otra aplicación importante de este producto es para impregnar exteriormente ciertos tipos de quesos, por ejemplo el de tipo Emmental (queso de origen suizo, semejante al queso gruyer), para impedir su enmohecimiento, aunque en este caso se utiliza cada vez menos. Algunos quesos tienen de forma natural cantidades relativamente altas de ácido propiónico, substancia que contribuye de forma importante a su aroma característico. También se utiliza como conservador en quesos fundidos. Aunque el que se utiliza en la industria procede de síntesis química, el ácido propiónico está bastante extendido en la naturaleza. El presente en los alimentos tanto en forma natural o como aditivo se absorbe en el intestino y se utiliza de la misma forma que los demás ácidos grasos, es decir, como fuente de energía (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.5 Ácido fórmico y formiatos

El ácido fórmico (H-COOH) y sus derivados (E-236 ácido fórmico, E-237 formiato sódico y E-238 formiato cálcico) no están autorizados en España, ni en muchos otros países. Proporcionan un sabor poco agradable a los productos y además son bastante tóxicos. Se utiliza, en países en los que se encuentra autorizado, para conservar zumos de frutas, especialmente los que se van a utilizar después industrialmente. También para la conservación de ciertos encurtidos (pepinos) en Alemania. En este caso se usa sobre todo el formiato cálcico, que actúa a la vez como endurecedor (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.6 Parabenos

E-214 p-hidroxi-benzoato de etilo (éster etílico del ácido p-hidroxi-benzoico), E-215 derivado sódico del éster etílico del ácido p-hidroxi-benzoico, E-216 p-hidroxi-benzoato de propilo (éster propílico del ácido p-hidroxi-benzoico), E-217 derivado sódico del éster propílico de ácido para-hidroxi-benzoico, E-218 p-hidroxi-benzoato de metilo (éster metílico del ácido p-hidroxi-benzoico) y E-219 derivado sódico del éster metílico del ácido p-hidroxi-benzoico. Los ésteres del ácido p-hidroxi-benzoico y sus derivados sódicos, denominados en general parabenos, son compuestos sintéticos especialmente útiles contra mohos y levaduras, y menos contra bacterias. Su principal ventaja es que son activos en medios neutros, al contrario que los otros conservadores, que solo son útiles en medio ácido. En cambio tienen el inconveniente de que incluso a las dosis autorizadas proporcionan a los alimentos un cierto olor y sabor fenólico. Se utilizan fundamentalmente para la protección de derivados cárnicos, especialmente los tratados por el calor, conservas vegetales y productos grasos, repostería y en salsas de mesa (1 g/Kg de conservadores totales). Los parabenos se utilizan en muchos países. Desde los años 50 se han realizado múltiples estudios acerca de su posible toxicidad, demostrándose que son poco tóxicos, menos que el ácido benzoico. Se absorben rápidamente en el intestino, eliminándose también rápidamente en la orina, sin que se acumulen en el organismo. Algunas de las personas alérgicas a la aspirina también pueden ser sensibles a estos aditivos (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.7 Sulfitos

E-220 anhídrido sulfuroso (SO_2), E-221 sulfito sódico (Na_2SO_3), E-222 sulfito ácido de sodio (bisulfito sódico), E-223 bisulfito sódico (metabisulfito sódico o piro-sulfito sódico), E-224 bisulfito potásico (metabisulfito potásico o piro-sulfito potásico), E-226 sulfito cálcico, E-227 sulfito ácido de calcio (bisulfito cálcico) y E-228 Sulfito ácido de potasio (bisulfito potásico).

El anhídrido sulfuroso es uno de los conservadores con una mayor tradición en su utilización. También es el que tiene más siglos de prohibiciones y limitaciones a sus espaldas. El anhídrido sulfuroso, obtenido quemando azufre, se utilizaba ya para la desinfección de bodegas en la Roma clásica. En el siglo XV se prohibió su utilización en Colonia (Alemania) por sus efectos perjudiciales sobre los bebedores y en otras ciudades alemanas también se limita su uso en la misma época. Su utilización en la conservación de la sidra está documentada al menos desde 1664. El anhídrido sulfuroso es un gas, comercializado en forma líquida a presión (Lyengar y McEvily, 1992).

Es un aditivo autolimitante en su uso, en el sentido de que por encima de una cierta dosis altera las características gustativas del producto. Es especialmente eficaz en medio ácido, inhibiendo bacterias y mohos, y en menor grado, levaduras. Actúa destruyendo la tiamina (vitamina B1), por lo que no debe usarse en aquellos alimentos que la aporten en una proporción significativa a la dieta, como la carne; sin embargo, protege en cierto grado a la vitamina C. Durante el cocinado o procesado industrial de los alimentos, el anhídrido sulfuroso y sulfitos se pierden en parte por evaporación o por combinación con otros componentes. Los límites legales se expresan siempre en contenido de anhídrido sulfuroso. El anhídrido sulfuroso y los sulfitos son muy utilizados para la conservación de zumos de uva, mostos y vinos, así como para sidra y vinagre. También se utiliza como conservador en salsas de mostaza y especialmente en los derivados de fruta (zumos, etc.) que van a utilizarse como materia prima para otras industrias, de los que desaparece en su mayor parte durante el procesado posterior. Además de su acción contra los microorganismos, los sulfitos actúan como antioxidantes, inhibiendo especialmente las reacciones de oscurecimiento producidas por ciertas enzimas en vegetales y crustáceos. Con este fin se autoriza su uso en conservas vegetales y aceitunas de mesa, cefalópodos congelados y crustáceos. También se utiliza como antioxidante en zumos y cervezas. En algunos países se utiliza para conservar el aspecto fresco de los vegetales que se consumen en ensalada. También puede utilizarse para mejorar el aspecto de la carne y dar impresión de mayor frescura, pero esta última práctica se considera un fraude, al engañar al comprador respecto a la calidad real. También es perjudicial en el aspecto nutricional al destruir la tiamina (vitamina B1) aportada en una gran proporción por la carne. Esta práctica está prohibida en muchos países, entre ellos España (Wedzicha, 1995).

En el organismo humano, el sulfito ingerido con los alimentos es transformado en sulfato por una enzima presente sobre todo en riñón, hígado y corazón, que es la responsable de la eliminación del sulfito producido en el propio organismo durante el metabolismo de los aminoácidos que contienen azufre. Un pequeño porcentaje de los asmáticos, entre el 3 y 8%, son sensibles a los sulfitos. En las personas en que esta sensibilidad es más elevada, los niveles presentes en algunos alimentos en los que se ha utilizado este conservador son suficientes para producir reacciones perjudiciales, por lo que deben evitar consumir alimentos que los contengan. Se ha observado en algunos casos otros tipos de reacciones frente a los sulfitos usados como aditivos alimentarios, entre ellos manifestaciones cutáneas o diarrea, especialmente entre personas con el jugo gástrico poco ácido. Los sulfitos no tienen efectos teratógenos ni cancerígenos, no representando ningún riesgo para la

inmensa mayoría de la población a los niveles presentes en los alimentos. Ante los efectos nocivos que pueden producir el anhídrido sulfuroso y los sulfitos en ciertas personas, se ha planteado reiteradamente su sustitución por otros conservadores; esto es prácticamente imposible en el caso de su aplicación en la industria del vino, aunque sí en las demás, especialmente en sus aplicaciones como antioxidante. Su utilización para conservar el aspecto de los vegetales frescos para ensalada, especialmente en Estados Unidos, que ha sido la causa de la mayor parte de los incidentes observados en asmáticos, tiende a disminuir (Lyengar y McEvily, 1992).

2.1.1.8 Nitritos y nitratos

Los nitratos (E-249 nitrito potásico (KNO_2), E-250 nitrito sódico E-251 nitrato sódico (NaNO_3) y E-252 nitrato potásico (KNO_3)), particularmente el potásico (salitre), se han utilizado en el curado de productos cárnicos desde la época romana. Probablemente su efecto se producía también con la sal utilizada desde al menos 3,000 años antes, que, procedente en muchos casos de desiertos salinos, solía estar contaminada con nitratos. El efecto del curado, en el que participa también la sal y las especias es conseguir la conservación de la carne evitando su alteración y mejorando el color. El color de curado se forma por una reacción química entre el pigmento de la carne, la mioglobina, y el ión nitrito. Cuando se añaden nitratos, estos se transforman en parte en nitritos por acción de ciertos microorganismos, siendo el efecto final el mismo (Spencer y Berman, 2003).

El uso de nitratos y nitritos como aditivos presenta incuestionablemente ciertos riesgos. El primero es el de la toxicidad aguda. El nitrito es tóxico (2 g pueden causar la muerte de una persona), al ser capaz de unirse a la hemoglobina de la sangre, de una forma semejante a como lo hace a la mioglobina de la carne, formándose metahemoglobina, un compuesto que ya no es capaz de transportar oxígeno. Esta intoxicación puede ser mortal, y de hecho se conocen varios casos fatales por ingestión de embutidos con cantidades muy altas de nitritos, producidos localmente por un mal mezclado del aditivo con los otros ingredientes durante su fabricación. Para evitar esto, se puede utilizar el nitrito ya mezclado previamente con sal. En muchos países, esto debe hacerse obligatoriamente y las normativas de la CE incluyen esta obligatoriedad. Otro riesgo del uso de nitratos y nitritos es la formación de nitrosaminas, sustancias que son agentes cancerígenos. Existen dos posibilidades de formación de nitrosaminas: en el alimento o en el propio organismo. En el primer caso, el riesgo se limita a aquellos productos que se calientan mucho durante el cocinado o que son ricos en aminas que pueden convertirse en nitrosaminas (pescado y productos

fermentados). En el segundo caso se podrían formar nitrosaminas en las condiciones ambientales del estómago. Se conocen afortunadamente una serie de técnicas para disminuir el riesgo de formación de nitrosaminas. En primer lugar, obviamente, reducir la concentración de nitritos y nitratos siempre que esto sea posible. Debe tenerse en cuenta que la cantidad de nitritos que llega al consumidor es siempre mucho menor que la añadida al producto, ya que estos son muy inestables y reactivos (Spencer y Berman, 2003).

En segundo lugar, se pueden utilizar otros aditivos que bloqueen el mecanismo químico de formación de nitrosaminas. Estos aditivos son el ácido ascórbico (E-330) y sus derivados y los tocoferoles (E-306 y siguientes), especialmente eficaces en medios acuosos o grasos, respectivamente. Se utiliza con mucha frecuencia, y en algunos países (USA, por ejemplo) el empleo de ácido ascórbico junto con los nitritos es obligatorio (Spencer y Berman, 2003).

Los riesgos tanto de toxicidad aguda como de formación de carcinógenos permitirían cuestionar radicalmente el uso de nitratos y nitritos en los alimentos, de no ser por un hecho conocido solo desde los años cincuenta. Los nitritos son un potentísimo inhibidor del crecimiento de *Clostridium botulinum*, que, aunque no es patógena, produce durante su desarrollo una proteína, la toxina botulínica, que, como ya se indicó, es extremadamente tóxica (una dosis de entre 0,1 y 1 millonésima de gramo puede causar la muerte de una persona) (Spencer y Berman, 2003). El caso de los nitritos y nitratos puede ser representativo de las decisiones basadas en la relación riesgo/beneficio. Por una parte, se sitúa el riesgo de la formación de nitrosaminas, potenciales cancerígenos, mientras que por otra se sitúa el beneficio de evitar el botulismo. Con medidas complementarias, como la restricción de los niveles y el uso de inhibidores de la formación de nitrosaminas, los organismos reguladores de todos los países aceptan el uso de nitratos y nitritos como aditivos, considerándolos necesarios para garantizar la seguridad de ciertos alimentos. De todos modos, al incluirse la indicación de su presencia en las etiquetas de los alimentos la decisión última queda en manos del consumidor (Pegg, 2000).

2.1.1.9 Hexametilentetramina

La hexametilentetramina, $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$, (E-239) utilizada inicialmente con fines médicos, pasó a la tecnología alimentaria como conservador de escabeches hacia 1920, haciéndose muy popular en el norte de Europa. Aunque en otros países se utiliza como conservador en escabeches y en

conservas de cangrejos o camarones. La UE lo permite exclusivamente para evitar el hinchamiento del queso Provolone. El mecanismo de acción antimicrobiana de este conservador se basa en su transformación en formaldehído en los alimentos ácidos. Si se ingiere, se produce la misma reacción en el estómago. El formaldehído es un agente cancerígeno débil y se ha comprobado a nivel experimental con ratas que la ingestión de grandes cantidades de hexametilentetramina es capaz de inducir la aparición de ciertos tipos de cáncer (Cuber *et al.*, 2002).

Se encuentra como un polvo blanco cristalino higroscópico, de síntesis a partir de la unión de amoníaco y formaldehído en solución acuosa. Su efecto microbicida se debe al desdoblamiento hidrolítico de la molécula que tiene lugar en medios con pH ácido. En esta reacción se desprende formaldehído que se une con las proteínas de la célula microbiana y produce una inactivación de determinadas enzimas, afectando así a su metabolismo y desarrollo. La hexametilentetramina puede reaccionar con otros aminoácidos del alimento y quedar inactivada parcialmente, disminuyendo así su acción. Su acción contra las proteínas es general e inespecífica. Es más eficaz contra bacterias que contra levaduras y mohos (Calvo, 1991).

2.1.1.10 Formaldehído

El formaldehído, CH₂O, (E-240) es un gas bastante tóxico que suele utilizarse en disolución acuosa (formol o formalina). Es un agente mutágeno y cancerígeno débil. Su empleo como aditivo alimentario no está autorizado en la mayoría de países, aunque sí se emplea en la desinfección de los equipos industriales. A veces se utiliza también en la desinfección de especias en los países tropicales productores (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.11 Anhídrido carbónico

El anhídrido carbónico, CO₂, (E-290) se produce en la respiración de todos los seres vivos. En los procesos de fabricación de alimentos, se produce en la fermentación de la masa del pan y en las fermentaciones que dan lugar al vino, cerveza y sidra, y es el gas responsable de la formación de las burbujas de estas bebidas. Evidentemente, el ácido carbónico ha contribuido a la protección de estas bebidas desde su origen, aunque lo ignoraran los fabricantes. Este producto es poco eficaz como conservador, siendo esta propiedad un simple complemento de sus efectos estéticos y organolépticos (confiere sabor ácido y una pungencia característica a las bebidas). Al desplazar al oxígeno actúa también como antioxidante. Se utiliza en el envasado de queso o de carne en

atmósfera controlada para la venta al detalle, y también para producir bebidas refrescantes gasificadas. Aunque el presente en las atmósferas de ciertos lugares cerrados, bodegas, por ejemplo, puede ser perjudicial (más del 3%) e incluso mortal (del 30 al 60%), la cantidad de este gas presente en los alimentos resulta por supuesto totalmente inofensiva (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.12 Cloruro de sodio (sal común)

Es, con mucho, la substancia más utilizada de entre todos los aditivos alimentarios; sin embargo, su gran tradición en el procesado de los alimentos, incluyendo el realizado a nivel doméstico, hace que no se le considere legalmente como aditivo y que, salvo casos excepcionales, no se limite su uso. No obstante, además de condimento es un conservador eficaz en mantequilla, margarina, quesos y derivados del pescado. A pesar de lo extendido de su uso, la sal común no es un producto carente de toxicidad y una dosis de 100 g puede causar la muerte de una persona. De hecho, se conocen algunos casos de intoxicaciones accidentales graves de niños muy pequeños por confusión de la sal con el azúcar al preparar sus papillas. El cloruro sódico se encuentra presente en todos los fluidos biológicos, y entre otras funciones, interviene en la formación del jugo gástrico. Es, por tanto, un componente esencial en la dieta. Desde principios de este siglo se discute la posible relación existente entre la ingestión de sal y la hipertensión. En la inmensa mayoría de los casos no se conoce la causa real de esta enfermedad, uno de los factores de riesgo más importantes de los accidentes cardiovasculares, y no está claro en absoluto que una dieta con alto contenido en sal pueda producirla. Sin embargo, una restricción drástica (menos de 1 g/día, frente a los cerca de 10 de ingestión habitual de los países occidentales) puede colaborar en su mejora. El nivel de ingestión más adecuado se sitúa, por los conocimientos actuales, en torno a los 3 g/día para la población normal, es decir, menos de la mitad de lo que se utiliza habitualmente (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.13 Antibióticos

El uso de antibióticos como conservadores en la industria alimentaria es muy limitado, ya que hay que tener presente el desarrollo de microorganismos resistentes, por lo que es necesario utilizarlos en condiciones muy específicas.

Con la excepción de la nisina (E-234), todos los demás antibióticos quedan reservados en la Unión Europea al uso médico, prohibiéndose expresamente su utilización como conservadores alimentarios. Esto es así para evitar la aparición de cepas bacterianas resistentes y la posible

alteración de la flora intestinal de los consumidores. El uso de antibióticos en medicina veterinaria está también reglamentado para que no puedan llegar al consumidor como contaminantes de la carne o de la leche (Wedzicha, 1995).

La **nisina** E-234 ($C_{143}H_{230}O_{37}N_{42}S_7$), es un antibiótico producido por ciertas cepas de *Lactococcus lactis*, microorganismo que se encuentra de forma natural en productos lácticos. Tiene un espectro de acción más importante contra las esporas que contra la forma vegetativa de la célula, debido a que su acción afecta a la membrana citoplasmática, haciéndola más sensible a la temperatura. La nisina que permanece en forma activa después del tratamiento térmico actúa inhibiendo la formación de las esporas bacterianas. Sólo actúa contra bacterias Gram positivas, lo que hace que se considere que tiene un espectro antibacteriano limitado, ya que no afecta a las bacterias Gram negativa, los mohos y las levaduras tienen la capacidad de descomponerla con rapidez (Cuber *et al.*, 2002).

La **Pimaricina** ($C_{33}H_{47}NO_{13}$), también llamada natamicina (E-235) es un antibiótico útil en la protección externa de ciertos alimentos contra el ataque de mohos. Su utilización no está autorizada a nivel de la Comunidad Europea. Sin embargo está autorizada en Estados Unidos y otros países. En España se emplea para impregnar la superficie de los quesos duros o semiduros, chorizo, salchichón y jamones (Wedzicha, 1995). La pimaricina actúa sobre la membrana celular y en algunos microorganismos sobre diferentes enzimas del metabolismo oxidativo. Para inhibir la actividad vital de la célula son necesarias concentraciones mucho menores que para inhibir el crecimiento. No tiene efecto sobre bacterias, su principal aplicación es contra levaduras y mohos, inhibiendo *in vitro* el desarrollo de hongos productores de aflatoxinas. Los hongos, con el tiempo, tienden a crear formas resistentes, lo cual se debe de tener en cuenta, evitando un uso prolongado (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.14 Agua oxigenada

El agua oxigenada se ha utilizado como agente bactericida en algunos productos, como leche o derivados del pescado, en un proceso conocido con el nombre engañoso de "pasteurización en frío". El agua oxigenada se descompone en general rápidamente y no llega a ingerirse como tal, por lo que no presenta riesgo de toxicidad. Sin embargo, puede alterar el color y destruir algunas vitaminas, por lo que su uso como conservador está prohibido en diversos países. No obstante, se

emplea con alguna frecuencia en la conservación de leche destinada a la fabricación de queso, en la que se elimina después utilizando un enzima, la catalasa, para evitar que perjudique a los microorganismos beneficiosos que participan en el proceso de elaboración. Se ha propuesto la posible utilización de cantidades muy pequeñas de agua oxigenada para la conservación de la leche cruda en países que no disponen de medios adecuados para refrigerarla. En la forma actual de esta aplicación el agua oxigenada no actúa como un conservador directo, sino que interviene en un mecanismo complejo junto con otros componentes naturales de la leche, lo que la hace eficaz a concentraciones mucho más bajas. En los países en los que se puede refrigerar la leche, este método de conservación física resulta preferible, y es el único autorizado (Calvo, 1991).

El percarbonato sódico es una sustancia que produce agua oxigenada cuando se disuelve en agua, por lo que su efecto como conservador es el mismo. Al ser un producto sólido es más sencillo su manejo y conservación. Está prohibido en diversos países (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.15 Ácido bórico

$B(OH)_3$, utilizado desde el siglo XIX en Italia para la conservación de mantequilla y margarina, también se ha empleado en la conservación de carne, pescado y mariscos. Es relativamente tóxico, conociéndose bastantes casos de intoxicación, sobre todo en niños. Además se absorbe bien y se elimina mal, por lo que tiende a acumularse en el organismo. Esto hace que su uso esté prohibido en todo el mundo, con la excepción de su empleo para conservar el caviar. En España se han detectado con cierta frecuencia casos de uso fraudulento del ácido bórico en la conservación de mariscos, para evitar el oscurecimiento de las cabezas de gambas y langostinos. El ácido bórico actúa bloqueando a las enzimas de metabolismo del fosfato, afectando así el crecimiento microbiano, éste presenta un espectro de acción antimicrobiano limitado básicamente frente a mohos y bacterias, aunque su efecto inhibitorio es escaso (Cuber *et al.*, 2002).

2.1.1.16 Cloro

En la industria alimentaria se utiliza como desinfectante del equipo y del agua a utilizar, así como del agua de bebida. También como agente en el tratamiento de harinas. En forma pura es un gas muy venenoso, ya que una concentración de 60 mg/m^3 de aire puede causar la muerte en 15 minutos, habiéndose utilizado incluso como un agente en la guerra química. Su uso es sin embargo esencial para garantizar la calidad higiénica del agua de bebida, y disuelto en las cantidades adecuadas no

causa problemas a la salud. El cloro suele ser usado en la forma de ácido hipocloroso (HClO) para eliminar bacterias y otros microbios en los suministros de agua potable. El cloro en sí no se usa, sino hipoclorito de sodio (NaClO), formado a partir de cloro e hidróxido de sodio, o tabletas sólidas de isocianuratos clorados (Calvo, 1991).

2.1.2 Agentes antimicrobianos de origen natural

Los aditivos antimicrobianos están entre los aditivos alimentarios más importantes y utilizados en la industria, sin embargo como se ha mencionado en las diversas investigaciones sobre la toxicidad de dichos compuestos a generado la demanda por parte del consumidor de productos frescos y mínimamente tratados con aditivos sintéticos, lo que ha incrementado el interés y la investigación por los antimicrobianos de origen natural, que son compuestos con capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, incluyendo bacterias, virus y hongos, dichos compuestos constituyen cada vez una nueva forma de garantizar alimentos seguros, manteniendo inalterable la calidad del producto. A partir de este principio las investigaciones realizadas en diversos países han demostrado que estas sustancias puedan extraerse para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y garantizar la seguridad del consumidor.

Muchos alimentos contienen compuestos de forma natural con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden prolongar la vida útil de los alimentos, incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos. El uso de estos compuestos implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos con fines antimicrobianos a los alimentos sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y a su garantía sanitaria. Esto tiene que lograrse manteniendo los costos de formulación, procesado o comercialización (Raybaudi *et al.*, 2006).

Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen en animal, vegetal y microbiano. El primero de estos grupos incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas (Beuchat, 2001) y polisacáridos como el quitosán (Davidson y Zivanovic, 2003). El segundo grupo incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Beuchat, 2001), mientras que el tercer grupo incluye compuestos producidos por microorganismos. De esta clasificación el grupo con mayor campo de investigación es el de

compuestos de origen vegetal, por el gran número de plantas existentes en la tierra, de las cuales solo un pequeño porcentaje ha sido estudiado. Para fines de este trabajo, sólo se realiza la descripción de los antimicrobianos de origen vegetal.

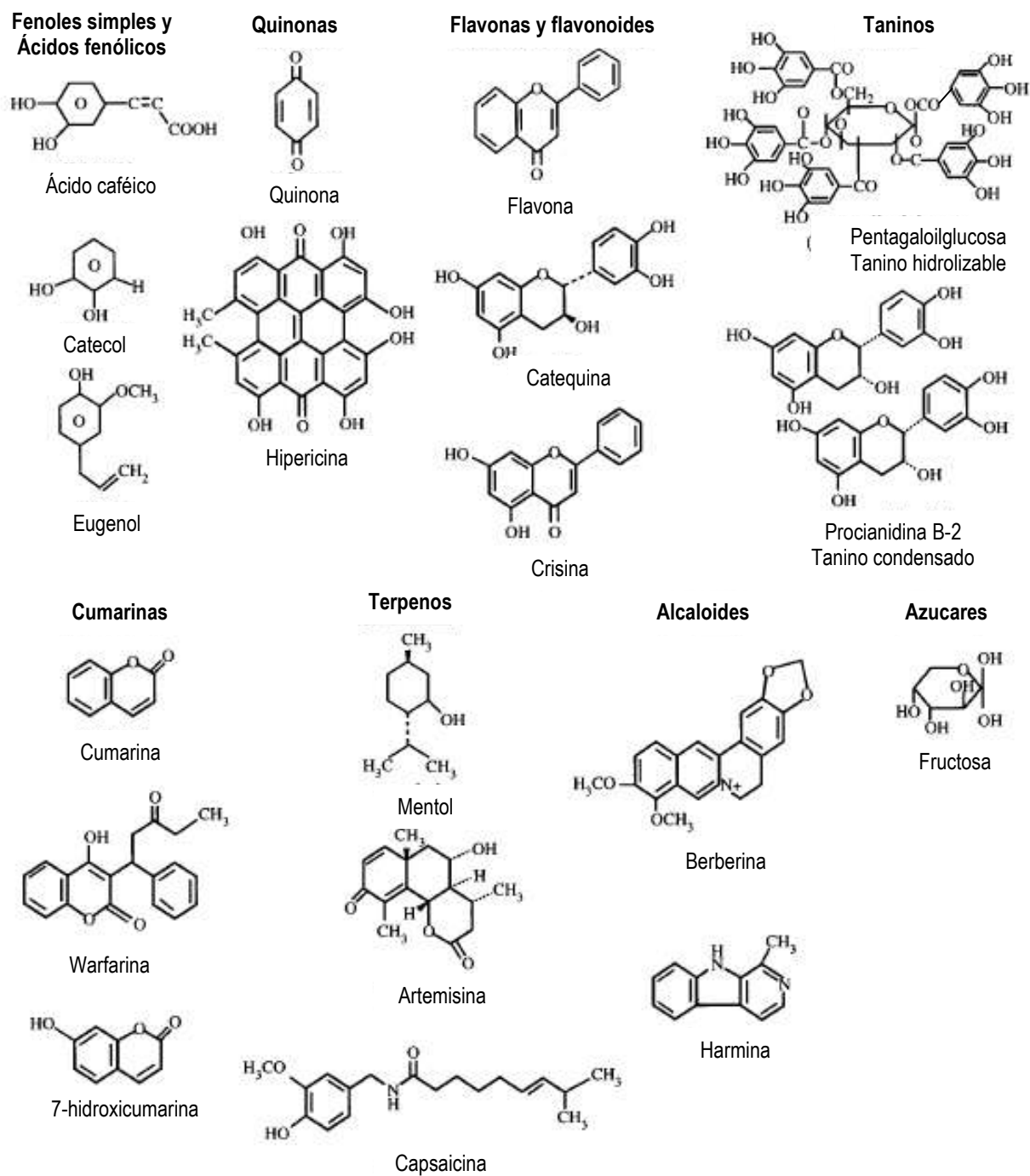
Las plantas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas, la mayoría de las cuales son fenoles o sus derivados que sustituyen el oxígeno (Geissman, 1963). La mayoría son fitoquímicos o metabolitos secundarios, denominados así porque no ejercen una función directa en las actividades fundamentales del organismo vegetal como el crecimiento o la reproducción y constituyen numerosos componentes químicos, de los cuales al menos 12,000 han sido aislados, un número estimado que equivale a menos del 10% del total (Schultes, 1978). Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a diversos microorganismos. La razón de ser de estos compuestos se desconoce por el momento. Existen diversas teorías: podrían ser compuestos con diversas funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano, o realmente tienen una actividad antimicrobiana como primer fin (Domingo y López, 2003).

En muchos casos, estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de la planta a la predación de los microorganismos, insectos y herbívoros. Algunos, como los terpenoides, dan a las plantas sus olores característicos, y otros como las quinonas y taninos son responsables de la pigmentación, así mismo, muchos son los compuestos responsables del sabor como la capsaicina en el chile. Siendo estas plantas utilizadas como alimento, especies o condimentos en la alimentación humana, mientras que un número similar es utilizado como remedios medicinales en diversas culturas del mundo, y en la actualidad como fuentes de principios activos, en la farmacéutica (Murphy, 1999).

2.1.2.1 Clasificación de los compuestos antimicrobianos de origen vegetal

Para el estudio de los compuestos antimicrobianos de origen vegetal, estos han sido clasificados de diversas formas considerando diferentes aspectos como lo son: su estructura química, su origen, su efecto inhibitorio y las características de inhibición que estos generan, cada una de estas clasificaciones estructuradas, en base a las necesidades de cada investigación, y no necesariamente cumpliendo un estándar. Dentro del presente trabajo se muestra la clasificación por su estructura química, considerando los principales representantes de cada grupo, así como el efecto antimicrobiano que estos han demostrado tener en diversos estudios. En la Figura 1 se

muestran algunos de los ejemplos más representativos de cada uno de estos grupos, describiéndolos en sus apartados correspondientes.



Murphy, 1999.

Figura 1. Estructuras químicas de compuestos antimicrobianos comunes en plantas.

2.1.2.1.1 Fenoles y sus derivados

Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados. Los principales grupos de compuestos generados por plantas se describen a continuación y se resumen en la Tabla 1.

Grupo químico	Compuesto	Planta	Actividad
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (tomillo)	General
	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	<i>S. aureus</i> , <i>S. thyphimurium</i>
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella</i>
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	VIH
Taninos		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias y virus
		<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	Virus
		<i>Melissa officinalis</i> (melisa)	
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus
Flavonas	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>S. mutans</i>
	Isoflavona	<i>Milletia thonningii</i>	<i>Schistosoma</i>
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
Alcaloides	Coca	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Cocos grampositivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, <i>Lactobacillus</i>
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	General

Davidson y Parish, 1989.

2.1.2.1.1.1 Compuestos fenólicos simples

Algunos de los fitoquímicos bioactivos más simples consisten de un único anillo fenólico sustituido. Los ácidos, cinámico y cafeico, son los representantes más comunes de un amplio grupo de compuestos derivados de fenilpropano, que se encuentran en estado de máxima oxidación (Fig. 1). Las plantas productoras de compuestos de estas características son tomillo (*Thymus vulgaris*), manzanilla (*Matriarca chamomilla*) y gayuba (*Arctostaphylos uva ursi*), cuyo principio activo, la arbutina, ha sido utilizada a lo largo de los años en el tratamiento de infecciones urinarias (Domingo y López, 2003). El estragón y el tomillo son plantas comunes que contienen ácido cafeico, el cual es eficaz contra algunos virus (Wild, 1994), bacterias (Brantner, et. al., 1996; Thomson, 1978) y hongos (Duke, 1985). El catecol y pirogalol son fenoles hidroxilados, que han demostrado ser tóxicos para microorganismos.

El catecol cuenta con dos grupos OH, mientras que el pirogalol tiene tres. El sitio y número de grupos hidroxilo en el fenol se considera que están relacionados con su toxicidad relativa a microorganismos, con evidencia de que el aumento de la hidroxilación, genera un aumento en la toxicidad (Geissman, 1963). Además, algunos autores han encontrado que los fenoles más oxidados presentan mayor poder inhibitorio (Scalbert, 1991; Urs, *et al.*, 1975). Los mecanismos responsables de la inhibición de los microorganismos por los compuestos fenólicos, están relacionados con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente a través de la reacción con los grupos sulfhidrilo o por medio de interacciones más inespecíficas con las proteínas (Mason *et al.*, 1987).

Compuestos fenólicos tales como los ácidos cafeico, clorogénico, p-coumárico, ferúlico y quínico, están presentes en partes de plantas que son usadas como especias. La actividad antimicrobiana de esos y otros ácidos como hidroxycinnámico y cinnámico pueden retardar la invasión microbiana, así como también la putrefacción de frutas y vegetales. Bacterias Gram+ y Gram-, mohos y levaduras comúnmente encontradas como organismos deterioradores son sensibles a los derivados del ácido hidroxycinnámico. Los ácidos cafeico, ferúlico y p-cumárico, por ejemplo, inhiben *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus* (Raybaudi *et al.*, 2006).

2.1.2.1.1.2 Quinonas

Las quinonas son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio. Un ejemplo es la hipericina, una antraquinona aislada de la planta de San Juan (*Hypericum perforatum*), antiguamente utilizada como antidepresivo (Miskovsky, 2002).

2.1.2.1.1.3 Taninos

Son sustancias de origen vegetal, no nitrogenadas de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol y acetona. Estas sustancias son de sabor astringente y tienen la propiedad común de curtir la piel, haciéndola imputrecible e impermeable al fijarse sobre sus proteínas (Domingo y López, 2003). Estos compuestos fenólicos han demostrado tener actividad antimicrobiana son los taninos y el ácido tánico. Este último, por ejemplo es inhibitorio para *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Enteritidis*,

S. aureus, *A. hydrophila* y *S. faecalis* (Beuchat, 2001). Compuestos fenólicos como los flavonoles, típicamente presentes en frutas y en el té verde, tienen actividad antibacteriana. Puupponen *et al.* (2001), demostraron que la miricetina utilizada como compuesto químico puro, inhibió el crecimiento de bacterias ácido lácticas derivadas de la flora del tracto gastrointestinal de humanos, pero no afectó al crecimiento de *Salmonella*, mientras que extractos preparados directamente a partir de fresas, frambuesas y otras bayas presentaron una fuerte actividad inhibidora de *Salmonella* y *E. coli*.

El término tanino se empleó para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensadas. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias. Un ejemplo es el tanino presente en el eucalipto (*Eucalyptus globulos*), (Cruz *et al.*, 2000).

Nychas (1995), demostró el efecto del extracto fenólico del té negro, el cual puede ser catalogado como un agente bacteriostático o bacteriocida contra microorganismos como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*.

2.1.2.1.1.4 Cumarinas

Son compuestos derivados de la benzo- α -pirona, como la cumarina, la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Están presentes en las margaritas y tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadores. La warfarina, un anticoagulante clásico pertenece a este grupo. Parece que su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el DNA eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Domingo y López, 2003).

2.1.2.1.1.5 Flavonas y compuestos relacionados

Las flavonas son estructuras fenólicas que tienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles, extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas (Yildirim *et al.*, 2000). Mención especial merecen las catequinas, presentes en el té verde (*Camellia sinensis*), las cuales ejercen actividad frente a *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, *Sigella* y otros microorganismos. Otros flavonoides tienen en

general actividad antiviral, como la glicirricina, sintetizada por el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) (Fukai *et al.*, 2002).

Otro grupo de compuestos pertenecientes a esa familia son los **isoflavonoides**, que actúan como efectivas fitoalexinas, las cuales pueden ser definidas como compuestos antimicrobianos de pequeño peso molecular o metabolitos de estrés biológico. Ellos pueden ser constitutivos o también ser inducidos por ataque biológico o heridas. Los constituyentes varían entre especies, y también varían dependiendo de la edad y el ambiente en el que se encuentre la planta. Estos flavonoides inhiben la germinación de esporas de hongo y causan daño a los sistemas de membrana. El recubrimiento de algunas semillas y algunas resinas de árboles son particularmente ricas en flavonoides antimicrobianos (Domingo y López, 2003).

2.1.2.1.2 Ácidos orgánicos

Uno de los principales factores que influye en la supervivencia y crecimiento de los microorganismos es la acidez del medio. Las bacterias capaces de causar enfermedades no pueden crecer a valores de pH por debajo de 3.9 a 4.0. Los alimentos ácidos que presentan valores de pH por debajo de ese límite están esencialmente protegidos contra la contaminación por bacterias patógenas. Las frutas que contienen ácidos como: cítrico, málico o tartárico entre otros, como naranjas, peras, manzanas y uvas generalmente se encuentran en ese rango (Raybaudi *et al.*, 2006).

Existe un buen número de ácidos orgánicos en los alimentos como resultado de los procesos fermentativos que ocurren de manera natural. La forma activa del ácido es la molécula completa sin ionizar. El nivel de disociación de los ácidos orgánicos, es una función del pH del medio. El ácido benzoico está presente en arándanos, ciruelas, manzanas y fresas. Su actividad antimicrobiana es mayor contra levaduras y mohos que contra bacterias en general, aunque es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, incluyendo *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*, *B. cereus* y *L. monocytogenes*. El ácido sórbico también está presente en frutas y se utiliza extensivamente para el control del crecimiento microbiano en alimentos. Los ácidos acético, láctico y propiónico que son producidos en alimentos fermentados, frecuentemente juegan un rol importante en la prevención del crecimiento de bacterias patógenas (Beuchat, 2001).

2.1.2.1.3 Aldehídos

Son derivados de los alcoholes primarios por deshidrogenación. Muchos aldehídos son aromatizantes como la vainilla y el citral. Así mismo, este grupo fitoquímico tiene propiedades antisépticas. La vainilla por ejemplo tiene efectos coleréticos (Carey, 2003). Algunos aldehídos como el hexanal y su derivado trans-2-hexanal, que son moléculas presentes naturalmente en manzanas (compuestos volátiles característicos del aroma), han mostrado tener efectos antimicrobianos al aplicarlos en manzanas frescas cortadas, logrando aumentar su vida útil (Lanciotti *et al.*, 1999; Corbo *et al.*, 2000).

2.1.2.1.4 Alcaloides

Los compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno se llaman alcaloides, compuestos nitrogenados heterocíclicos, pertenecen a este grupo, entre otros, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. El primer ejemplo utilizado médicamente fue la morfina, aislado en 1805 de la opium poppy *Papaver somniferum* (McDevitt *et al.*, 1996). La codeína y la heroína son los derivados de la morfina. A los alcaloides diterpenos aislados de las plantas más comunes de las Ranunculaceae, o botón de oro (Sethi, 1979), se les han encontrado comúnmente nuevas propiedades antimicrobianas (Omuloqli *et al.*, 1997). Los alcaloides solamargina, un glicoalcaloides de las bayas de *Solanum khasianum*, y otros pueden ser útiles contra la infección por el VIH (McMahon *et al.*, 1995), así como infecciones intestinales asociadas con el SIDA (Jones *et al.*, 1986). Los principales efectos inhibidores observados de los alcaloides son contra *Giardia* y *Entamoeba*. La berberina es uno de los representantes más importantes del grupo de alcaloides, potencialmente eficaz contra los tripanosomas (Fessenden *et al.*, 1982) y plasmodios (Omuloqli *et al.*, 1997). El mecanismo de acción de estos compuestos se atribuye a la interacción de estos compuestos con la pared celular y el ADN de los microorganismos (Domingo y López, 2003).

2.1.2.1.5 Terpenos y aceites esenciales

Son compuestos a menudo no saturados formados por carbono, hidrógeno y oxígeno de estructura no aromática y que se encuentran sobre todo en los aceites esenciales y en las resinas (Carey, 2003). Con el nombre de terpenos se conoce a un grupo importante de componentes vegetales que tienen un origen biosintético común. Todos, aunque con estructuras químicas muy distintas, proceden de la condensación, en número variable, de unidades isoprenicas. Desde el punto de vista

farmacéutico, los grupos de principios activos de naturaleza terpénica más interesantes son: monoterpenos y sesquiterpenos constituyentes de los aceites esenciales, derivados de monoterpenos correspondientes a los iridoides, lactonas sesquiterpénicas que forman parte de los principios amargos, algunos diterpenos que poseen actividades farmacológicas de aplicación terapéutica y por último, triterpenos y esteroides entre los que se encuentran las saponinas y los heterósidos cardiotónicos (Barre *et al.*, 1997).

Diversos terpenos o terpenoides han demostrado actividad contra bacterias, hongos, virus y protozoos. El ácido betulínico triterpenoide es sólo uno de varios terpenoides que han demostrado inhibir el VIH (Xu *et al.*, 1996). El mecanismo de acción de los terpenos no se entiende completamente, pero se especula que implican disrupción de la membrana por los compuestos lipofílicos (Amaral *et al.*, 1998). Mendoza *et al.* (1997), encontraron que el aumento de la hidrofiliidad de diterpenoides kaureno mediante la adición de un grupo metilo han reducido drásticamente su actividad antimicrobiana. Investigadores del área de los alimentos han encontrado terpenoides en aceites esenciales de plantas, los cuales han sido útiles en el control de *Listeria monocytogenes* (Aureli *et al.*, 1992).

Los **aceites esenciales** químicamente están formados principalmente por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, etc. que pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos.), en ocasiones llevan también derivados del fenil propano y raramente cumarinas. Entre las principales acciones debidas a la presencia de aceites esenciales cabe destacar: antiséptica (recordemos el uso dado durante muchísimos años a especies vegetales como especias, no solo para dar sabor sino también para conservar los alimentos) (Barre *et al.*, 1997).

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces (Burt, 2004). De igual forma de acuerdo a sus características químicas son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua (Nychas, 1995). Para la extracción de estos compuestos se pueden utilizar distintos solventes (acetato, etanol, y cloruro de etileno), originándose compuestos con alta actividad antimicrobiana como el timol del timo y orégano, el aldehído cinámico de la canela o el eugenol del clavo (Raybaudi *et al.*, 2006). Se han realizado numerosas investigaciones acerca del poder

antimicrobiano de especias y sus aceites esenciales (por ejemplo clavo, ajo, cebolla, salvia, romero, cilantro, perejil, orégano, mostaza y vainilla) (Hefnawy *et al.*, 1993).

El interés en la aplicación de aceites esenciales para el control de patógenos pre y postcosecha se ha incrementado en años recientes, debido a que poseen características especiales y presentan un gran potencial en la conservación de alimentos. Los aceites esenciales derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos (Ayala *et al.*, 2005). Los estudios “*in vitro*” realizados con aceites esenciales han demostrado que la actividad antimicrobiana está influida por el medio de cultivo, la temperatura de incubación y la concentración de células del inóculo utilizado (Nychas *et al.*, 2003). Así mismo, las características de los microorganismos son también importantes sobre la efectividad de los aceites esenciales. En la Tabla 2 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias de diferentes aceites esenciales probados contra distintos microorganismos patógenos transmitidos por alimentos.

Son relativamente pocos los estudios sobre la actividad antimicrobiana de aceites esenciales en sistemas modelo de alimentos o en alimentos propiamente dichos. Sin embargo, en los estudios realizados se ha logrado ver que la eficacia de los aceites esenciales “*in vitro*” es frecuentemente mucho mayor que en los alimentos (Nychas *et al.*, 2003). Incluso cuando la mayoría de los aceites esenciales son considerados como GRAS, su uso como aditivos alimentarios es limitado debido a los cambios sensoriales que causan en los productos tratados. Sin embargo, el uso de los aceites esenciales en productos que tengan características sensoriales similares puede ser una buena alternativa. Lanciotti *et al.* (2004), reportaron que la aplicación de aceites esenciales de mandarina, cidra, limón y lima, aumentaron la vida útil de ensaladas de frutas y redujeron la carga microbiana, sin alterar las características sensoriales del producto. El eugenol es un representante bien caracterizado en el aceite de clavo. El eugenol se considera un agente bacteriostático frente a los hongos (Duke, 1985) y bacterias (Thomson, 1978).

2.1.2.1.6 Lectinas y polipéptidos

Los péptidos con actividad inhibitoria contra microorganismos se reportaron por primera vez en 1942 (Balls *et al.*, 1942). A menudo están cargados positivamente y contienen enlaces disulfuro (Zhang y Lewis, 1997). Su mecanismo de acción se debe a la formación de los canales iónicos en la

Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias de aceites esenciales probados “in vitro” contra microorganismos patógenos transmitidos por alimentos.

Planta de la cual se deriva el antimicrobiano	Especie bacteriana	CMI rango aproximado(ul/ml)
Romero (Rosmarinus officinalis)	<i>Escherichia coli</i>	4.5 - > 10
	<i>Salmonella typhimurium</i>	> 20
	<i>Bacillus cereus</i>	0.2
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.4 10
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.2
Orégano (Origanum vulgare)	<i>E. coli</i>	0.5 1.2
	<i>S. typhimurium</i>	1.2
	<i>S. aureus</i>	0.5 1.2
	<i>E. coli</i>	0.6
	<i>S. typhimurium</i>	2.5
	<i>S. aureus</i>	0.6
	<i>E. coli</i>	3.5 5
	<i>S. typhimurium</i>	10 20
	<i>S. aureus</i>	0.75 10
	<i>L. monocytogenes</i>	0.2
	<i>E. coli</i>	0.4 2.5
	<i>S. typhimurium</i>	> 20
	<i>S. aureus</i>	0.4 2.5
	<i>L. monocytogenes</i>	0.3
	<i>E. coli</i>	0.45 1.25
	<i>S. typhimurium</i>	0.450- > 20
	<i>S. aureus</i>	0.2 2.5
	<i>L. monocytogenes</i>	0.156 0.45
	<i>E. coli</i>	> 0.2
	<i>B. cereus</i>	0.2
<i>E. coli</i>	2.5 - > 80	
<i>Shigella dysenteria</i>	5 - > 80	
<i>S. aureus</i>	0.6 40	
<i>B. cereus</i>	5 10	

Burt, 2004.

CMI = Concentración mínima inhibitoria

membrana microbiana (Terra *et al.*, 1993; Zhang y Lewis, 1997) o la inhibición competitiva de la adhesión de proteínas microbianas para acoger los receptores de polisacáridos (Sharon y Ofek, 1986).

Las tioninas son péptidos que se encuentran comúnmente en la cebada y el trigo y se componen de 47 residuos de aminoácidos (Colilla *et al.*, 1990; Méndez *et al.*, 1990). Son tóxicas para las levaduras y bacterias Gram- y Gram+. Las tioninas AX1 y AX2 de la remolacha azucarera presentan actividad contra hongos, pero no contra bacterias (Kragh *et al.*, 1995). Fabatin, un nuevo péptido identificado de 47 residuo, en habas, con relación estructural a las Tioninas de granos, inhibe a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Enterococcus hirae* pero no a *Candida* o *Saccharomyces* (Zhang y Lewis, 1997).

2.1.2.1.7 Cromenos y benzofuranos

Los cromenos y benzofuranos son productos naturales que se han encontrado en algunas especies de *Rutaceae*, *Liliaceae*, *Cyperaceae* y principalmente en ciertas tribus de las *Asteraceae*, entre las cuales parece ser exclusivos de las *Asterreae*, *Eupatorieae*, *Heliantheae*, *Inulaeae* y *Senecioneae*. Estos compuestos se encuentran presentes generalmente en hojas, tallos, y menos comúnmente en raíces habiéndose encontrado en los primeros hasta un 5% sobre el peso seco (Scherriber, 1963).

Muchos cromenos y benzofuranos han demostrado ser biológicamente activos como el toxol y la deshidrotremetona que son bacteriostáticos; la tremetona, la deshidrotremetona y la hidroxitremetona son tóxicas a los peces; el toxol y el angelato de toxilo exhiben una débil actividad antitumor contra la leucemia linfocítica P-288; el enecalín, el 7-hidroxiencalín y la 6-metaxieuparina son fototóxicos a varios hongos y bacterias; el enecalín también ha mostrado acción insecticida (Scherriber, 1963).

2.1.2.2 Principales fuentes de fitoquímicos vegetales

Las plantas, hierbas y especies, así como sus aceites esenciales, contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos. Wikins y Board (1989), reportan más de 1340 plantas como potenciales fuentes de antimicrobianos. Los compuestos antimicrobianos de las plantas, se encuentran generalmente en el aceite esencial obtenido a partir de las hojas, flores, bulbos, rizomas y frutos. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos.

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas, hierbas y especies, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides. La mayoría de estos compuestos, son identificados como metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas (glucanasas, citanasas) y proteínas que actúan principalmente sobre las membranas de los microorganismos invasores.

2.1.2.2.1 Especies

Desde hace mucho tiempo se sabe que los condimentos o especies contienen compuestos que detienen el crecimiento microbiano. En la antigüedad para embalsamar cadáveres se empleaban especias y aceites vegetales que los protegían frente a la putrefacción. Las cebollas y ajos son remedios conocidos de la medicina popular (Davidson, 2001).

Las especias son raíces, cortezas, semillas, brotes, hojas o frutos de plantas aromáticas que se añaden a los alimentos como agentes “flavorizantes”. Sin embargo, se sabe desde tiempos antiguos que las especias y sus aceites esenciales tienen diferentes grados de actividad antimicrobiana. El primer reporte del uso de las especias como conservadores se remonta a unos 1,550 años a.C., cuando los antiguos egipcios las empleaban para conservar alimentos y embalsamar a los muertos (Davidson, 2001).

Hasta ahora, sólo se conoce parcialmente la composición química de las sustancias antimicrobianas de las especias (Tabla 3). Entre sus componentes se cuentan alcaloides, piperina y piperidina en la pimienta, taninos y ácidos orgánicos, como el ácido benzoico del clavo y la canela. Las sustancias antimicrobianas de numerosas especias son los propios aceites esenciales, mezclas de diferentes productos volátiles, con frecuencia afines, entre los que se incluyen hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles y éteres fenólicos, ácidos y sus ésteres (Müller, 1981).

Muchos de los hidrocarburos, alcoholes y cetonas son terpenoides. También contienen derivados sulfurados, que abundan en cebolla, ajo y granos de mostaza. Los aceites esenciales suelen encontrarse formando glicósidos de los que quedan en libertad por hidrólisis enzimática. El ajo (*Allium sativum*) contiene alicina y alostatina que se han incluido entre los antibióticos elaborados por los vegetales superiores (Müller, 1981). Los aceites esenciales de los condimentos se encuentran en células especiales. Su concentración varía mucho en los distintos condimentos y especias. Entre los más ricos se encuentran el clavo (con 15 a 17%) y la nuez moscada (alrededor del 16%). La

concentración en aceites esenciales depende no sólo de la especia en cuestión sino de dónde y cómo se cultive, de la forma en que se recolectó, de la edad y de las condiciones de almacenamiento.

Tabla 3. Sustancias antimicrobianas contenidas en algunas especias.

Especia	Componente activo
Anís (<i>Pimpinella anisum</i>)	Cresol, aldehído anisínico, ácido benzoico
Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Aceite de clavo, eugenol, ácido benzoico
Pimentón (<i>Capsicum annuum</i>)	Capsaicina (saponina esteroide)
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Alicina, alistatina y acroleina
Alcarabea (comino) (<i>Cuminum cyminum</i>)	α - y γ -Terpineno, carvona
Nuez moscada (<i>Myristica</i>)	Geraniol, eugenol
Pimienta (<i>Piper nigrum</i>)	Aceite de pimienta, piperina, piperidina y citral
Pimienta de Jamaica (<i>Pimenta officinalis Lindley</i>)	Eugenol, citral
Tomillo (<i>Thymus</i>)	Tinol, γ -terpineno, carvacrol
Canela (<i>Cinnamomum verum</i>)	Aceite de canela, aldehído cinámico, ácido benzoico, eugenol, citral
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	Esencias alílicas, de butilo, de croton, y feniletil mostaza

Raybaudi *et al.* (2006)

2.1.2.2.2 Hierbas y plantas

Muchas hierbas exhiben actividad antimicrobiana; entre las usadas en alimentos se encuentran por ejemplo apio, cilantro, laurel, albahaca, café, angélica, puerro, rábano picante, hierbabuena, tomillo,

etc. Los compuestos presentes en estas hierbas que tienen actividad antimicrobiana son derivados simples y complejos del fenol, los cuales son volátiles a temperatura ambiente (Raybaudi *et al.*, 2006).

Muchas partes de plantas y sus extractos usados han mostrado efectos antimicrobianos contra bacterias y hongos. Las bacterias patógenas adversamente afectadas por un amplio rango de compuestos presentes en esos condimentos se incluyen: *C. botulinum*, *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus* y *V. parahaemolyticus* (Raybaudi *et al.*, 2006).

El crecimiento de mohos micotoxigénicos, tales como *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *Penicillium urticae*, y *Penicillium roquefortii*, es retardado o inhibido, así como también el de mohos, levaduras y bacterias causantes del deterioro de alimentos (Beuchat, 2001). Estudios con extractos de hojas de *Ginkgo biloba* han demostrado su efecto antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes*. Xie *et al.* (2003), observaron que los extractos de las hojas redujeron los niveles de la población de *L. monocytogenes* y este efecto se hizo más pronunciado a bajas temperaturas (4 °C). Además demostraron que la adición de EDTA (1.6 mg/mL) aumentó la actividad antimicrobiana.

2.1.2.3 Modo de acción de los compuestos antimicrobianos de origen vegetal.

Los sitios de acción de los agentes antimicrobianos en la célula microbiana, incluyen a la membrana celular, la pared celular, las enzimas metabólicas, la síntesis de proteínas y el sistema genético (Conner, 1993), todos ellos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos y cualquier acción sobre ellos puede inactivar a la célula microbiana. Wilkinsy y Board (1989), mencionan que los compuestos utilizados como antimicrobianos y que dependiendo de las concentraciones utilizadas en los alimentos, pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos.

Conner (1993), sugirió que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas, causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así a la actividad celular.

Juven *et al.* (1994), encontraron que el aumento en la concentración de aceite esencial de tomillo y carvacrol no se reflejó en una relación directa con un efecto antimicrobiano. Sin embargo, se

encontró que después de rebasar una cierta concentración crítica, se presentó una rápida y significativa reducción en el número de células viables de *Salmonella typhimurium*. Esta situación se interpretó de la siguiente manera: los compuestos fenólicos sensibilizan a la membrana celular y cuando se saturan los sitios sobre los cuales actúa, se presenta un grave daño a la membrana citoplasmática.

Kabara (1991), menciona que los efectos de los compuestos fenólicos pueden ser a dos niveles, sobre la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática, así como sobre la respuesta fisiológica del microorganismo. Los compuestos fenólicos pueden desnaturalizar a las enzimas responsables del inicio de la germinación de las esporas o interferir con el uso de aminoácidos necesarios para iniciar el proceso de germinación (Nychas, 1995).

Existen pocos estudios enfocados a comprender el mecanismo involucrado en la inhibición microbiana por especies y sus aceites esenciales (Davidson, 1996). Sin embargo, se supone que dada la estructura fenólica de muchos de los compuestos con actividad antimicrobiana presentes en las especias y sus aceites esenciales, el modo de acción es similar al de otros compuestos fenólicos.

2.1.2.4 Eficacia de los compuestos antimicrobianos de origen vegetal

Existe un número importante de reportes acerca de la actividad antimicrobiana de extractos, aceites especias y condimentos, es difícil obtener estimaciones cuantitativas y hacer comparaciones de sus efectos debido, al menos parcialmente, a la gran variedad de métodos que se han utilizado para evaluar su efectividad (Zaika, 1998).

Para la aplicación de los antimicrobianos de origen vegetal, se necesita comprobar su eficiencia (*in vitro*), en medios microbiológicos y en productos alimenticios. Las pruebas *in vitro* proporcionan información valiosa acerca de la efectividad de un compuesto, y pueden ser evaluadas de igual manera las variables que afectan a la actividad antimicrobiana, la cual depende, como se ha visto, del tipo, género, especie, y microorganismo a probar. Por ejemplo, las esporas bacterianas son más resistentes al efecto de los antimicrobianos que las células vegetales. También el tipo de pared celular es un factor a considerar (Hernández, 2003).

Una variable asociada a la efectividad de un agente antimicrobiano en los alimentos, es el número inicial de microorganismos en el sistema. Debido a que la mayoría de los antimicrobianos son

bacteriostáticos más que bactericidas. Los agentes antimicrobianos de origen natural no contribuyen al desarrollo de cadenas de resistencia o alteran el ambiente del alimento de manera que crezcan otros organismos patógenos (Hernández, 2003).

Algunos factores intrínsecos y extrínsecos o variables asociadas a las aplicaciones de los agentes antimicrobianos a los alimentos se determinan en las pruebas “*in vitro*”. Estas incluyen temperatura, atmósfera, pH, potencial de óxido reducción y actividad de agua. Para el éxito de estas pruebas, se requiere que estos factores sean controlados. Uno de estos factores es el microorganismo en sí, la actividad de los antimicrobianos depende de la especie, tipo y género del microorganismo (Hernández, 2003).

Las variaciones en la preparación del antimicrobiano se debe a la pureza del disolvente, así como el método de esterilización (p. ej., calor, filtración por membrana). El tiempo de exposición debe ser cuidadosamente controlado para establecer resultados significativos. El número inicial de microorganismos, debe ser consistente para obtener resultados reproducibles. El efecto de la temperatura es muy importante durante la incubación y la exposición. En la mayoría de los casos, el incremento de la temperatura de exposición incrementa la actividad del antimicrobiano. La temperatura de incubación debe ser la óptima para el microorganismo a probar. La composición de la atmósfera juega un rol muy importante, es necesario definir si el microorganismo es anaerobio o no. La actividad de los antimicrobianos se ve afectada de igual manera por el pH, generalmente la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se atribuye principalmente a su forma no disociada (Wilkinsy y Board, 1989).

Estas pruebas demuestran los problemas potenciales que se pueden encontrar en los sistemas alimenticios. Para el éxito de dichas pruebas, es necesario que las propiedades del agente antimicrobiano, se especifiquen dentro de un esquema de aplicación para conocer los propósitos del mismo (Hernández, 2003).

2.2 Efectos de los antimicrobianos sobre la salud

Las condiciones de uso de los conservadores están reglamentadas estrictamente en todos los países del mundo. Usualmente existen límites de la cantidad que se puede añadir de un conservador y la cantidad total de conservadores. Los antimicrobianos alimentarios, a las concentraciones autorizadas, no matan en general a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación

o inhiben su desarrollo. Los organismos oficiales correspondientes, a la hora de autorizar el uso de determinado aditivo tienen en cuenta que éste sea un auxiliar del procesado correcto de los alimentos y no un agente para enmascarar condiciones de manipulación sanitaria o tecnológicamente deficientes, ni un sistema para defraudar al consumidor engañándole respecto a la frescura real del alimento. La FDA (Foods and Drugs Administration), considera a los agentes antimicrobianos de origen natural (vegetal) como sustancias del tipo GRAS (Generally recognized as safe), en la tabla 4 figuran productos vegetales de los que se obtienen aceites esenciales, oleorresinas y extractos naturales incluyendo a sus destilados, para su uso como agentes antimicrobianos.

El uso de agentes químicos es uno de los métodos de conservación más antiguos y tradicionales que existen, sin embargo, no cumplen con el concepto de natural o de seguro que los consumidores demandan (Hernández, 2003). A medida que progresó la toxicología, los científicos de los alimentos se interesaron por la utilidad de algunos compuestos químicos, con fuerte efecto inhibitor del crecimiento de ciertos microorganismos, como aditivos alimentarios. Solamente unos cuantos de aquellos conservadores potenciales de los alimentos han pasado con éxito su evaluación toxicológica. Últimamente, ante el rechazo por parte de los consumidores de los conservadores químicos o artificiales, ha cobrado un gran impulso la búsqueda de conservadores naturales (Mossel, 2003).

Los antimicrobianos químicos utilizados para desinfectar alimentos difícilmente pueden provocar la muerte en concentraciones bajas y aunque existe una legislación para el uso de dichas sustancias, desafortunadamente algunas empresas no siempre cumplen con la legislación y en ocasiones emplean concentraciones por encima de la norma, lo cual a largo plazo podría provocar en el consumidor desde alergias hasta diversos tipos de cáncer (Fernández, 2000).

Recientemente se ha encontrado que desinfectantes químicos, como el cloro, aun en las dosis recomendadas por los organismos nacionales o internacionales pueden formar precursores de cáncer, por lo que la tendencia se basa en consumir alimentos libres de este tipo de sustancias (Fernández, 2000).

Tabla 4. Lista de FDA de algunas especias, aromatizantes y saborizantes naturales considerados GRAS.

Especias, aromatizante y saborizantes naturales			
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Caléndula (<i>Calendula officinalis</i>)	Hinojo (<i>Foeniculum vulgare</i>)	Perejil (<i>Petroselinum crispum</i>)
Ajonjolí (<i>Sesamum indicum</i>)	Canela (<i>Cinnamomum verum</i>)	Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	Pimentón (<i>Capsicum annuum</i>)
Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	Laurel (<i>Laurus nobilis</i>)	Pimienta (<i>Piper nigrum</i>)
Alcaparra (<i>Capparis spinosa</i>)	Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	Manzanilla (<i>Chamaemelum nobile</i>)	Pimienta de Cayena (<i>Capsicum baccatum</i>)
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Mejorana (<i>Origanum majorana</i>)	Pimienta de Jamaica (<i>Pimenta officinalis</i> Lindley)
Angélica (<i>Archangelica officinalis</i>)	Comino (<i>Cuminum cyminum</i>)	Menta Inglesa (<i>Mentha piperita</i>)	Rábano (<i>Raphanus sativus</i>)
Anís (<i>Pimpinella anisum</i>)	Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>)	Mostaza (<i>Brassica nigra</i>)	Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)
Apio (<i>Apium graveolens</i>)	Geranio (<i>Geranium phaeum</i>)	Nuez moscada (<i>Myristica</i>)	Tila (<i>Tilia</i>)
Azafrán (<i>Crocus sativus</i>)	Cardamomo (<i>Zingiberaceae</i>)	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Vainilla (<i>Vanilla planifolia</i>)

Adaptada de Roberts, 1986.

Sin duda, el aspecto más importante del uso de compuestos antimicrobianos es el toxicológico. Se tiende a pensar que los compuestos naturales que tienen actividad antimicrobiana son menos tóxicos que los sintéticos, sin embargo no siempre es así. Para que un compuesto con actividad antimicrobiana se considere apropiado para ser utilizado en alimentos se debe demostrar que no tiene efectos tóxicos a través de estudios con animales o que no es responsable de alteraciones de

la salud al ser consumido con regularidad en alimentos como las especias. El problema está en que las concentraciones necesarias de especias o compuestos extraídos de ellas, para lograr la inhibición del crecimiento microbiano normalmente son mayores que las consumidas con regularidad. Por otra parte, es importante que se demuestre que esas sustancias son metabolizadas, excretadas, no dejan residuos y que no destruyen nutrientes importantes presentes en los alimentos (Davidson y Zivanovic, 2003).

Específicamente en las áreas de nutrición y cáncer se ha demostrado que los fitoquímicos protegen los tejidos contra los efectos tóxicos y neoplásicos de un amplio rango de carcinógenos.

Así, los polifenoles y sus derivados presentes en té verde y negro han manifestado tener efectos protectores contra el cáncer y enfermedades del corazón, por lo que la ingesta regular de vegetales y frutas, así como el consumo de té reducen el riesgo de diversos tipos de cáncer en humanos. Por otra parte se ha observado que los fenoles (por ejemplo, ácidos cafeíco y ferúlico) son altamente efectivos contra la formación de potentes carcinógenos a partir de aminas y amidas secundarias (Nychas, 1995).

2.3 Microorganismos de interés en la industria alimentaria

La inocuidad y la calidad de los alimentos serán siempre objeto de interés y preocupación. Los microorganismos representan dos problemas importantes para la industria de alimentos, por un lado, son causantes de descomposición de estos y por el otro, son causantes de graves enfermedades en los consumidores.

La idea de riesgos para el medio ambiente, y la salud de las personas están muy difundidas en la sociedad actual, algo para lo cual, sin duda, ha contribuido el tratamiento de algunos temas por parte de los medios de comunicación. Por eso, no es extraño que la seguridad se haya convertido en una de las mayores preocupaciones sociales, dentro de las cuales cobra especial relevancia la seguridad alimentaria (Dos Santos, 2007).

Los microorganismos de interés sanitario en los alimentos incluyen, de manera convencional, bacterias, hongos, levaduras, protozoarios, virus, parásitos microscópicos o sus estados de huevecillo o larvario, y ciertas algas microscópicas. Se encuentran involucrados en dos áreas fundamentales en la microbiología sanitaria: como causa de deterioro de los alimentos y como

agentes etiológicos de enfermedades a su consumo. Debe de considerarse además, en menor escala, su participación en la generación controlada de cambios sensoriales deseables y el empleo, directo o indirecto, en la preservación de su frescura e inocuidad. Estos dos últimos efectos se asocian principalmente a la actividad de bacterias lácticas (Fernández, 2000).

Los microorganismos tienen acceso a los alimentos a través de una diversidad de fuentes y mecanismos, en ellos pueden simplemente sobrevivir sin dar lugar a modificaciones aparentes en sus características sensoriales. Eventualmente, cambios adversos subletales de la acidez, una baja o alta temperatura, la descomposición y otros, afectan su capacidad para proliferar en el alimento. Una vez que las condiciones se tornan favorables (por ejemplo, rehidratar leche en polvo, descongelar pescado), es posible, si los factores ecológicos son propios, la multiplicación microbiana. Las consecuencias pueden ser deterioro progresivo del alimento o un incremento en el riesgo a la salud consecutivo a su consumo (Fernández, 2000).

Es por esto el gran interés que existe por parte de los investigadores en el control, reducción y eliminación de dichos riesgos, derivados de la presencia de microorganismos indeseables en los alimentos. A continuación se realiza una breve descripción de los dos grandes grupos de interés en la industria alimenticia: microorganismos deterioradores y con fines de este estudio, microorganismos patógenos.

2.3.1 Microorganismos deterioradores de alimentos

También denominados alteradores, debido a que afectan o alteran las características organolépticas de los alimentos. La actividad microbiana es el principal mecanismo que produce alteración en la apariencia de un alimento, en cuanto a frecuencia e intensidad. El deterioro de los alimentos es desde luego, como la presencia de microorganismos patógenos, una condición indeseable, que puede ser detectada por el consumidor frente a los alimentos, por lo que puede decidir si los acepta o no (Caballero, 2000).

La acción microbiana predominante es sobre proteínas, lípidos o carbohidratos, provocando cambios distintivos. Los compuestos resultantes son la expresión del proceso o descomposición; unos provienen de la degradación de compuestos constitutivos del alimento, mientras que otros de su síntesis (Fernández, 2000). Dichos compuestos generan cambios de textura, sabores y olores desagradables, cambios en la coloración, entre otros.

Los principales grupos de microorganismos deterioradores están formados por (Caballero, 2000):

- ☞ Microorganismos psicrófilos. Capaces de desarrollarse a bajas temperaturas, como son las temperaturas de refrigeración de los alimentos.
- ☞ Microorganismos termófilos. Son aquellos que crecen a temperaturas elevadas.
- ☞ Microorganismos halófilos. Aquellos que afectan a alimentos con elevadas concentraciones de sal.
- ☞ Microorganismos lipolíticos. Capaces de degradar los compuestos de origen lipídico que se encuentran en los alimentos.
- ☞ Microorganismos acidófilos. Se desarrollan en medios con pH ácidos.

2.3.2 Microorganismos patógenos en alimentos

En el conjunto de los microorganismos existentes en la naturaleza, algunos de ellos son considerados de interés en seguridad alimentaria, debido a que su presencia en los alimentos puede representar un peligro para la salud del consumidor, ya sea por sus características patógenas como por su capacidad toxigénica. Como ejemplo de microorganismos de interés en seguridad alimentaria podemos citar las especies: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Yersinia enterocolitica*, entre otros. (Dos Santos, 2007).

La presencia de los agentes patógenos en contraste, no suele acompañarse de cambios sensoriales objetables; mientras menor sea la incidencia de microorganismos deterioradores en activo, mayor riesgo de que una colonización concurrente por patógenos pase inadvertida, situación evidente de mayor riesgo (Caballero, 2000). Se realiza mayor énfasis en este tipo de bacterias, debido a que el presente estudio está encaminado a los efectos del fitoquímico contra diez cepas de bacterias patógenas de importancia alimentaria.

2.3.2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), es la sigla tal como se la reconoce en los distintos ámbitos vinculados a la alimentación), son aquellas que se originan por la ingestión de

alimentos infectados con agentes contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Sean sólidos naturales, preparados, o bebidas simples como el agua, los alimentos pueden originar dolencias provocadas por patógenos, tales como bacterias, virus, hongos, parásitos o componentes químicos, que se encuentran en su interior. Los síntomas varían –entre los diversos factores que pueden incidir– de acuerdo al tipo de contaminación, así como también según la cantidad del alimento consumido. Los signos más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar: dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble, ojos hinchados, dificultades renales, etc. Además, ciertas enfermedades ETAs pueden llevar a una enfermedad de largo plazo. Por ejemplo, *Escherichia coli O157:H7* puede provocar fallas en riñón en niños y bebés, *Salmonella* puede provocar artritis y serias infecciones, y *Listeria Monocytogenes* puede generar meningitis, o un aborto en mujeres embarazadas (Molins, 2007).

Durante las últimas décadas, se han identificado varios nuevos patógenos importantes que se transmiten a través de los alimentos, algunos de los cuales aún pueden crecer a temperaturas de refrigeración. También se han identificado nuevos métodos de propagación de estos patógenos. Los cambios en las poblaciones, en los estilos de vida de los consumidores y en las preferencias alimentarias han producido cambios en la formulación, manufactura y distribución de los mismos.

Estos cambios, aunados a la habilidad que tienen los microorganismos para evolucionar rápidamente y adaptarse a su medio ambiente, presentan nuevos retos microbiológicos para todas las personas involucradas en la industria alimentaria (Molins, 2007). Los microorganismos, de los cuales un pequeño porcentaje son patogénicos, están en todas partes y contaminan a los productos agrícolas. Algunos de estos microorganismos posiblemente sean capaces de sobrevivir los tratamientos para su conservación.

También, los seres humanos pueden introducir patógenos en los alimentos, durante la producción, procesamiento, distribución y/o preparación de los mismos. Por lo tanto, cualquier alimento, ya sea crudo o procesado puede presentar algún nivel de riesgo, para poder causar ETAs, si no se maneja apropiadamente antes de su consumo. Todas las personas involucradas en la industria alimentaria, desde el productor hasta la persona que prepara el alimento, deben reconocer la necesidad de vigilancia para controlar los riesgos microbiológicos, a fin de reducir las ETAs.

En la tabla 5 se presenta una descripción de las principales bacterias patógenas causantes de ETAs, así como las características de los problemas que generan, la fuente y modo de contaminación, así como el periodo de latencia (Cliver, 1993).

Tabla 5. Enfermedades comunes transmitidas a través de los alimentos, causadas por bacterias.

Enfermedad (agente causante)	Periodo de latencia (duración)	Principales síntomas	Alimentos típicos	Modo de contaminación
Intoxicación alimentaria, diarreico (<i>Bacillus cereus</i>)	8-16 h (12-24 h.)	Diarrea, cólicos, vómitos ocasionales	Productos cárnicos, sopas, salsas, vegetales	De la tierra o del polvo
Intoxicación alimentaria, emético (<i>Bacillus cereus</i>)	1-5 h (6-24 h)	Náuseas, vómitos, a veces diarrea y cólicos	Arroz y pasta cocidos	De la tierra o del polvo
Botulismo; intoxicación alimentaria (toxina de <i>Clostridium botulinum</i> lábil al calor)	12-36 h (meses)	Fatiga, debilidad, visión doble, habla arrastrada, insuficiencia respiratoria, a veces la muerte	Tipos A y B: vegetales; frutas; productos cárnicos, avícola y de pescado; condimentos; Tipo E: pescado y productos de pescado	Tipos A y B: de la tierra o del polvo; Tipo E: del agua y sedimentos
Botulismo; intoxicación alimentaria, infección infantil	No conocida	Estreñimiento, debilidad, insuficiencia respiratoria, a veces la muerte	Miel, de la tierra	Esporas ingeridas de la tierra, del polvo, o de la miel; coloniza el intestino
Campilobacteriosis (<i>Campylobacter jejuni</i>)	3-5 días (2-10 días)	Diarrea, dolores abdominales, fiebre, náuseas, vómitos	Alimentos de origen animal, infectados	Pollo, leche cruda (no pasteurizada)
Cholera (<i>Vibrio cholera</i>)	2-3 días de horas a días	Heces líquidas profusas; a veces vómitos, deshidratación; si no se trata puede ser mortal	Mariscos crudos o mal cocinados	Heces humanas en el entorno marino
Intoxicación alimentaria (<i>Clostridium perfringens</i>)	8-22 h (12-24 h)	Diarrea, cólicos, rara vez náuseas y vómitos	Pollo y carne de res cocidos	De la tierra, alimentos crudos
Infecciones enterohemorrágicas transmitidas por los alimentos (<i>Escherichia coli</i>)	12-60 h (2-9 días)	Diarrea líquida, sanguinolenta	Carne de res cruda o mal cocida, leche cruda	Ganado infectado
Infecciones enteroinvasoras transmitidas por los alimentos (<i>Escherichia coli</i>)	por lo menos 18 h (incierto)	Cólicos, diarrea, fiebre, disentería	Alimentos crudos	Contaminación fecal humana, directa o a través del agua
Infecciones enterotoxigénicas transmitidas por los alimentos (<i>Escherichia coli</i>)	10-72 h (3-5 días)	Diarrea líquida profusa; a veces cólicos, vómitos	Alimentos crudos	Contaminación fecal humana, directa o a través del agua

Listeriosis (<i>Listeria monocytogenes</i>)	3-70 días	Meningo-encefalitis; mortinatos; septicemia o meningitis en neonatos	Leche, queso y vegetales crudos	De la tierra o de animales infectados, directamente o por estiércol
Salmonelosis (<i>Salmonella especies</i>)	5-72 h	Diarrea, dolores abdominales, escalofríos, fiebre, vómitos, deshidratación	Huevos crudos, mal cocinados: leche, carne y pollos crudos	Alimentos de origen animal, infectados; heces humanas
Shigelosis (<i>Shigella especies</i>)	12-96 h (4-7 días)	Diarrea, fiebre, náuseas, a veces vómitos y cólicos	Alimentos crudos	Contaminación fecal humana, directa o a través del agua
Intoxicación alimentaria por estafilococos (enterotoxina de <i>Staphylococcus aureus</i> estable al calor)	1-6 h (6-24 h)	Náuseas, vómitos, diarrea y cólicos	Jamón, productos cárnicos y avícola, pastelería rellena de crema, mantequilla batida, queso	Operarios con resfriados, dolor de garganta o cortadas que están infectadas, rebanadoras de carne
Infección por estreptococos transmitidos por los alimentos (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	1-3 días (varía)	Diversos, incluso dolor de garganta, erisipela, escarlatina	Leche cruda, huevos "endiablados"	Operarios con , dolor de garganta y otro tipo de infecciones por estreptococos
Infección por <i>Vibrio parahemolyticus</i> transmitidos por los alimentos	12-24 h (4-7 días)	Diarrea, cólicos, a veces náuseas, vómitos, fiebre, dolor de cabeza	Pescado y mariscos	Entorno marino de la costa
Infección por <i>Vibrio vulnificus</i> transmitida por los alimentos	En personas que tienen alto hierro sérico: 1 día	Escalofríos, postración, a menudo la muerte	Ostiones y almejas crudas	Entorno marino de la costa
Yersiniosis (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	3-7 días (2-3 semanas)	Diarrea, dolores imitando apendicitis, fiebre, vómitos, etc.	Carne de res y puerco cruda o mal cocida, tofu empacado en agua de manantial	Animales infectados, especialmente cerdos; aguas contaminadas

Cliver, 1993.

2.4 Métodos de prueba para determinar el efecto de los compuestos antimicrobianos

Los métodos que se utilizan para evaluar la actividad de los antimicrobianos, se pueden dividir en: pruebas “*in vitro*” y pruebas de aplicación. Estas últimas, también se conocen como “métodos de barrido” y pueden incluir cualquier prueba en la que el compuesto no se aplica de manera directa al sistema alimenticio: generalmente, este tipo de pruebas proveen información preliminar para determinar la eficacia del compuesto. Las pruebas “*in vitro*” incluyen pruebas en las que el agente antimicrobiano se aplica directamente al producto (Davison y Parish, 1989). En la tabla 6, se muestra la clasificación de algunos de los métodos más utilizados para evaluar la eficacia de los compuestos antimicrobianos en los alimentos.

Tabla 6. Métodos para evaluar la eficacia de antimicrobianos para alimentos.

Métodos exploratorios
<ul style="list-style-type: none">● Métodos de evaluación de un punto final<ul style="list-style-type: none">○ Difusión en agar○ Dilución en agar y en caldo○ Gradiente en placa○ Pruebas para desinfectantes● Métodos descriptivos<ul style="list-style-type: none">○ Ensayos turbidimétricos○ Curvas de inhibición o muerte● Métodos aplicados<ul style="list-style-type: none">○ Punto final○ Curvas de inhibición o muerte● Métodos para evaluar mezclas de sustancias

Adaptada de Davidson y Parish, 1989.

Davidson y Parish (1989), mencionan que para la aplicación de cualquiera de éstos métodos deben controlarse los demás factores que pueden intervenir en la respuesta del microorganismo (temperatura, pH, actividad de agua, nutrientes, etc.) y señalan que uno de los factores es el propio microorganismo, es decir, depende del tipo, género, especie y cepa del organismo de prueba. El número inicial de células o esporas utilizadas durante los ensayos con el antimicrobiano debe de ser consistente para asegurar que los resultados sean reproducibles. En el caso de los antimicrobianos naturales, Zaika (1988), señala que el medio en el que se prueba su eficacia, la especie, aceite o extracto a evaluar y el microorganismo afectan significativamente los resultados y las pruebas.

Un método ampliamente utilizado para la evaluación de los antimicrobianos naturales es el conocido como “zona de inhibición” (Zaika, 1988), denominado por algunos otros autores como “halos de inhibición”. Se trata de un método sencillo, sin embargo, el efecto inhibitorio del compuesto que se va a evaluar, dependerá de su habilidad para difundirse en el medio. Este método, cae en la clasificación de los llamados de punto final y se le conoce como “ensayo de disco”. Uno de los

requisitos para obtener resultados confiables y repetibles es que el microorganismo a evaluar se desarrolle rápidamente y uniformemente (Davidson y Parish, 1989). Este método es uno de los más antiguamente utilizados, que ha sido y continúa siendo una técnica ampliamente usada en los laboratorios para evaluar la sensibilidad de bacterias a diferentes compuestos, debido a que muestra el efecto de los antimicrobianos impidiendo su desarrollo en la zona donde se ha difundido, dicha zona es comparable con la superficie donde si hay un desarrollo. Es por esto que dicho método es utilizado en el presente estudio.

Por otra parte, la metodología utilizada en la segunda parte de la evaluación del efecto de los extractos, consiste en vertidos en placa, donde una concentración conocida de microorganismos es inoculada directamente en el extracto diluido a determinada concentración, y en seguida o a un tiempo determinado de contacto del extracto con la bacteria, se realiza el recuento, para observar el número de microorganismos que sobreviven o son viables tras el contacto con el compuesto fitoquímico.

2.5 Estudio previo

Peña (2009), realizó un estudio del efecto de la temperatura de extracción sobre la capacidad antimicrobiana de un extracto fitoquímico en medio acuoso, donde evaluó el efecto del extracto en medio acuoso, obtenido por extracciones sucesivas a temperatura ambiente y en un rango de 40-90 °C (40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C), frente a *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Shigella flexneri*, en medios de cultivo estándar. Cabe destacar que los extractos obtenidos en dicho estudio fueron secados de distinta forma, puesto que probó el secado por aspersión y por liofilización, determinado a su vez el método óptimo de secado, eligiendo aquellos obtenidos por liofilización, para continuar con su estudio. En los resultados obtenidos en ese trabajo, se observó que la temperatura de extracción no tuvo un efecto significativo sobre la capacidad antimicrobiana frente a los microorganismos estudiados, haciendo referencia a que todos los extractos probados presentaron un efecto inhibitorio semejante.

Al analizar el trabajo y la metodología seguida se pueden apreciar algunos errores cometidos durante la obtención, manipulación y almacenamiento de los extractos obtenidos, que se reflejan en los resultados obtenidos. Al inicio del trabajo de investigación se planteó como hipótesis que la temperatura de extracción del fitoquímico afectaba su actividad antimicrobiana.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del método y la temperatura extracción sobre la capacidad antimicrobiana del extracto acuoso de una planta.

3.2 Objetivos específicos

- ☞ Obtener extractos acuosos de la planta de estudio a tres temperaturas: 40, 60 y 90 °C, mediante extracción sucesiva y extracción simple.

- ☞ Evaluar la capacidad de inhibición de los seis extractos sobre 10 cepas de bacterias patógenas, comparando la actividad antimicrobiana en base al método y la temperatura de extracción.

- ☞ Determinar si la temperatura y el método de extracción afectan la capacidad antimicrobiana del extracto acuoso.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Medios de cultivo

- ☞ Agar para métodos estándar BD Bioxon, México (AME)
- ☞ Agar base sangre Diagnostica Merck, México (ABS)
- ☞ Caldo de soya tripticaseína BD Bioxon, México (CST)
- ☞ Peptona de caseína BD Bioxon, México

4.1.2 Reactivos

- ☞ Rifampicina

4.1.3 Cepas

- ☞ ***Bordetella sp.*** Aislada de caso clínico
- ☞ ***Escherichia coli O157:H7 Fluorescente.*** Aislada de caso clínico
- ☞ ***Listeria monocytogenes*** ATCC19115
- ☞ ***Pseudomona auruginosa*** ATCC 27853
- ☞ ***Salmonella choleraesuis*** ATCC 10708
- ☞ ***Salmonella tiphymurium*** ATCC 14028
- ☞ ***Shigella flexneri*** ATCC 12022
- ☞ ***Shigella sonnei*** ATCC 25931
- ☞ ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923
- ☞ ***Staphylococcus epidermis.*** Aislada de caso clínico

4.1.4 Material de uso común

Matraces erlenmeyer, probetas, pipetas graduadas, vasos de precipitado, espátulas, embudo Buchner, matraz kitazato, agitador magnético, termómetro, vidrios de reloj, tubos de ensayo con tapón de rosca, gradillas, frascos tapón de rosca, asas bacteriológicas, micropipetas, puntas para micropipetas, cajas petri, mecheros, perillas, varillas de vidrio acodadas, papel filtro, algodón, etc.

4.1.5 Aparatos

- ☞ Balanza analítica Adventurer Pro
- ☞ Parrilla simultánea Fisher Scientific
- ☞ Rotavapor Büchi Heating Bath B-490
- ☞ Congelador Tor-Tey
- ☞ Autoclave Yamato SM200
- ☞ Vortex-Genie 2 Scientific Industries, U. S. A.
- ☞ Incubadora bacteriológica Blue M. U.S. A.
- ☞ Cuenta colonias Darkfield Québec, Cia. American Optical, U.S. A.
- ☞ Refrigerador Lab-Line Enviro-neers Inc., U. S. A.
- ☞ Campana de flujo laminar Labconco

4.2 Obtención de extractos a diferentes temperaturas

4.2.1 Extracciones sucesivas

- ☞ Se pesaron 25 g de la planta de estudio y se colocaron en un vaso de precipitados, enseguida se le adicionaron 100 mL de agua destilada dejándose 2 min para su completa hidratación.
- ☞ Posteriormente, la mezcla se sometió a molienda en licuadora casera por 1 min.
- ☞ La mezcla obtenida se colocó en un matraz erlenmeyer de 1 L con 400 mL de agua destilada. Colocándose en agitación magnética 30 min en una parrilla simultánea, controlando la temperatura a 40 °C.
- ☞ Al finalizar los 30 min se filtró a vacío el extracto acuoso con ayuda de papel filtro y algodón, para separar los restos de la planta, que se recuperaron nuevamente en el matraz. El filtrado se almacenó en un matraz erlenmeyer de 2 L.
- ☞ Al residuo de la planta recuperado de la primera filtración se le adicionaron nuevamente 400 mL de agua destilada y se colocó nuevamente en agitación por 30 min a 40 °C, transcurrido

el tiempo se filtro, el líquido se almaceno junto al primer filtrado. Este procedimiento se llevó a cabo 4 veces de forma sucesiva. Al finalizar las 4 extracciones se obtuvo un volumen de 1.6 L.

- ↻ Este procedimiento se repitió de la misma forma para la obtención de los dos extractos a 60 °C y 90 °C.

4.2.2 Extracción simple

Con el fin de determinar si las extracciones sucesivas eran adecuadas para la extracción de los compuestos fitoquímicos con efecto antimicrobiano, se realizó una extracción simple a cada una de las temperaturas de estudio (40 °C, 60 °C y 90 °C).

- ↻ Se pesaron 25 g de la planta y se colocaron en un vaso de precipitados, enseguida se le adicionaron 100 mL de agua destilada dejándose 3 min para su completa hidratación.
- ↻ Posteriormente, la mezcla se sometió a molienda por 1 min.
- ↻ La mezcla obtenida se colocó en un matraz erlenmeyer de 1 L con 400 mL de agua destilada. Colocándose en agitación magnética 30 min en una parrilla simultánea, controlando la temperatura.
- ↻ Al finalizar los 30 min se filtró a vacío el extracto acuoso con ayuda de papel filtro y algodón, para separar los restos de la planta. Enseguida se almacenó el extracto, para su posterior concentración.

4.2.3 Concentración del extracto

- ↻ Con el fin de retirar la mayor cantidad de agua y conservar los compuestos fitoquímicos de la planta con mayor pureza, cada extracto fue concentrado posteriormente a su obtención. Dicha concentración se llevó a cabo en un Rotavapor con vacío, controlando la temperatura del baño del equipo, la cual no sobrepaso la temperatura a la que se obtuvo cada extracto.
- ↻ El volumen final de cada extracto fue de 8 mL, el cual se recolecto en frascos de plástico. Al finalizar la concentración de cada extracto se fueron almacenando en congelación, hasta el momento de uso. Cabe destacar que este procedimiento se llevo a cabo al finalizar la

obtención de cada extracto. Esto fue hasta colocar en congelación el extracto obtenido a 40 °C, se inicio la extracción a 60 °C y así sucesivamente.

Al finalizar la obtención y concentración de los extractos se contaba con 6 extractos, dos de cada una de las temperaturas de estudio, de los cuales uno fue obtenido por extracciones sucesivas y el otro obtenido en extracción simple.

4.3 Evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos

La evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos se llevó a cabo en dos etapas. La primera fue mediante la medición de halos de inhibición y la segunda realizando diluciones del extracto e inoculando en este las bacterias de ensayo, realizando posteriormente un recuento en placa. A continuación se describe el procedimiento seguido para ambas etapas, llevadas a cabo en el mismo orden en el que se presentan.

4.3.1 Preparación de cepas

Las diez cepas utilizadas en el estudio, fueron activadas en el laboratorio de microbiología de alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, las cuales a su vez fueron marcadas con resistencia al antibiótico Rifampicina (R⁺). La resistencia de todas las cepas se mantuvo durante todo el estudio. Las cepas se mantuvieron en agar base sangre (ABS) entre 4-7 °C, con transferencias quincenales, activándose en caldo soya tripticaseína (CST) con incubación a 37 °C por 24 h.

4.3.2 Preparación del inóculo

A partir de la cepa conservada en ABS, con ayuda de una asa bacteriológica, se transfirió un poco de biomasa a otro tubo con 3 mL de CST, homogeneizando en un Vortex por 15 s, efectuándose el mismo procedimiento para las diez bacterias, los tubos se incubaron a 37 °C por 24 h en una incubadora bacteriológica (Blue M), obteniendo así cultivos jóvenes.

4.3.3 Evaluación por halos de inhibición

- ☞ Se prepararon 60 cajas petri con agar para métodos estándar (AME) y Rifampicina (R⁺), solidificado.

- ☞ Se tomó 1 mL de cultivo joven, y se vertió en un tubo con 9 mL de diluyente de peptona (DP) y se agitó en el Vortex, de este tubo se tomo 1 mL y se colocó en otro con 9 mL de DP y se agito, y por último se tomo de este segundo 1 mL y se incorporo en un tercero con 9 mL de DP. Esto con el fin de realizar diluciones decimales. De cada una de las bacterias se realizaron tres diluciones siguiendo este procedimiento.
- ☞ En cada seis cajas de agar solidificado, mediante la técnica de siembra en superficie por extensión, se distribuyo de manera homogénea 100 µL de la tercera dilución, de una misma bacteria, con ayuda de una varilla de vidrio acodada. Obteniendo de esta forma seis cajas por bacteria, dos cajas se rotularon para probar los extractos concentrados, otras dos para los extractos diluidos 1:5 y las últimas dos para el extracto diluido 1:10. Cabe destacar que se utilizaron dos cajas por extracto, debido a que se probaron de forma paralela los extractos obtenidos mediante extracciones sucesivas y los obtenidos mediante extracción simple. Cada caja en el exterior fue dividida en tres partes iguales.
- ☞ Una vez extendida la bacteria, en cada sección de las cajas se colocó un disco pequeño de papel filtro estéril. Quedando de esta forma 3 discos por caja, cada disco se destino a un extracto (extraídos a 40, 60 y 90 °C).
- ☞ En cada disco se adicionaron 10 µL del extracto concentrado o en dilución, teniendo cuidado de que el volumen adicionado se distribuyera sobre el disco.
- ☞ Se esperó de 15 a 20 min, a que el extracto se absorbiera en el agar y secara un poco, para incubarlas de forma invertida a 37 °C por 24 h.
- ☞ Transcurridas las 24 h, se procedió a realizar la medición de los halos de inhibición formados por los extractos en cada bacteria. Se midió el diámetro de estos usando una regla, tomando como referencia el disco de papel filtro colocado para la adición del extracto. Los diámetros se reportaron en milímetros.

Este método es ampliamente utilizado para la evaluación de los antimicrobianos naturales conocido también como “zona de inhibición”, el cual es un método sencillo, sin embargo el efecto inhibitor del compuesto que se evalúa, depende de su capacidad para difundirse en el medio. Uno de los requisito para obtener resultados confiables y repetibles es que el microorganismo a evaluar se desarrolle rápida y uniformemente (Davidson y Zivanovic, 2003).

4.3.4 Evaluación por vertido en placa

- ☞ Para realizar esta etapa se partió de cultivos jóvenes, preparados como se describe en el apartado 4.3.1. De los diez cultivos jóvenes de las cepas utilizadas para este trabajo, se realizaron 7 diluciones seriadas en tubos de ensayo con 9 mL de DP.
- ☞ A la par se prepararon tubos con un volumen de 5 mL del extracto diluido en agua destilada en proporciones de 1:5, 1:10 y 1:50. De cada dilución se prepararon 10 tubos.
- ☞ Para cada una de las bacterias se asignó 1 tubo con extracto diluido 1:5, otro con 1:10 y uno con 1:50. Los tubos con extracto 1:5 y 1:10 se inocularon con 10 μ L de la tercera dilución de la bacteria correspondiente, mientras que los tubos con extractos 1:50, se inocularon con la segunda dilución (esta modificación en las concentraciones de microorganismos se debe a los resultados obtenidos y descritos en el apartado 5.2). Se agitaron los tubos en el Vortex y enseguida se tomó 1 mL de cada tubo, colocándolo en distintas cajas petri vacías, previamente rotuladas, el vertido se realizó al tiempo cero (T_0), a continuación se les adicionó AME con R^+ , homogeneizando uniformemente. Se esperó a que solidificaran, incubándose de forma invertida por 24 h a 37 °C.
- ☞ A su vez los tubos que contenían los extractos inoculados, se dejaron a temperatura ambiente por 20 min. Transcurrido el tiempo se repitió la técnica de vertido en placa, descrita en el paso anterior, rotulando las cajas como tiempo veinte (T_{20}).
- ☞ Durante esta etapa se realizó el vertido en placas de la sexta y la séptima dilución, obtenidas en el primer paso descrito en este apartado. Siguiendo el procedimiento descrito, pero en vez de colocar 1 mL del extracto inoculado, se colocó 1 mL de las diluciones mencionadas. El objetivo de este vertido es realizar un recuento de cada bacteria, con el fin de conocer el número de células inoculadas en cada extracto.
- ☞ Transcurridas las 24 h en incubación se sacaron las cajas y se contó el número de colonias desarrolladas en cada caja, reportando los resultados en UFC/mL.
- ☞ Al realizar el recuento de la sexta y séptima dilución, se conoce el número de UFC/mL inoculadas en el extracto y colocadas en las cajas. Al número de UFC/mL inoculadas se le restó el número que se desarrolló transcurridas las 24 h, con el fin de determinar la disminución en el desarrollo por efecto de la concentración de extracto en el que se inoculó. Esto se realizó con las cajas inoculadas al T_0 y al T_{20} , para comparar los resultados y

observar cómo influye el tiempo de contacto del extracto con la bacteria en la inhibición de su desarrollo.

Se debe destacar que este procedimiento se siguió para las tres diluciones probadas de cada uno de los seis extractos, cada dilución se probó en diferente día, debido a la cantidad de material, tiempo y trabajo que implica cada prueba. Posteriormente a que se determinó que dilución era la óptima se procedió a realizar los experimentos donde se comparaba el efecto del método de extracción, por lo que se probaban al mismo tiempo los seis extractos obtenidos a las tres temperaturas de estudio. Estas últimas pruebas se realizaron por duplicado con el fin de obtener los datos necesarios para realizar un análisis estadístico, y establecer si el efecto antimicrobiano del fitoquímico en estudio se ve afectado por la temperatura de extracción así como por el método utilizado para su obtención.

V. RESULTADO Y DISCUSIONES

5.1 Lectura de los halos de inhibición

En la figura 2 se muestran los halos de inhibición generados sobre *P. auruginosa*, las zonas transparentes alrededor de los discos de papel filtro muestran el agar sin crecimiento bacteriano, mientras que en el resto del agar se observó un color blanquecino opaco, que indica el crecimiento de la bacteria inoculada sobre toda la placa de agar tras la incubación. Del lado superior derecho de la caja se colocó el disco con el extracto obtenido a 40 °C, del lado superior izquierdo el disco con el extracto obtenido a 60 °C y en la parte de abajo el disco con el extracto obtenido a 90 °C, cabe destacar que todas las imágenes mostradas en esta sección presentan el mismo orden.



Figura 2. Halos de inhibición generados por los extractos concentrados, obtenidos vía extracción simple sobre *P. auruginosa*.

La tabla 7 presenta los halos de inhibición en milímetros, generados por los extractos obtenidos por extracciones sucesivas y por extracción simple, probados en su forma concentrada, en función de la temperatura de extracción frente a las diez bacterias utilizadas. Se puede apreciar que todos los extractos presentan inhibición, observándose diferencias en el diámetro por efecto del método de extracción y dentro de cada método el efecto de la temperatura, lo cual indica que ambas variables afectan la capacidad antimicrobiana de los extractos.

Al observar en la tabla 7 los resultados generados con los extractos concentrados, obtenidos mediante extracción sucesiva y comparar el efecto inhibitorio de cada extracto con respecto a la temperatura, fue evidente que los halos de inhibición de mayor tamaño se generaron con el extracto obtenido a 40 °C, independientemente de la bacteria probada. Al comparar los halos generados por los extractos obtenidos a 60 y 90 °C, se aprecia que con el extracto obtenido a 90 °C se generaron halos de mayor diámetro que con el de 60 °C para *L. monocytogenes*, *P. auruginosa*, *S. tiphyurium*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. epidermis* y *S. aureus*, y sólo para *Bordetella sp* y *S. choleraesuis* se observan halos de mayor diámetro que con el extracto obtenido a 60 °C, con respecto a los generados por los de 90°C, en el caso de *E. coli O157:H7* los halos son del mismo diámetro con estos dos últimos extractos.

Ahora al observar los resultados obtenidos con los extractos concentrados, obtenidos mediante extracción simple, en la tabla 7, se puede apreciar que la diferencia de los diámetros no es tan amplia entre sí como la generada entre los halos de los extractos obtenidos vía extracciones sucesivas, esto se puede apreciar de forma gráfica en la figura 3.

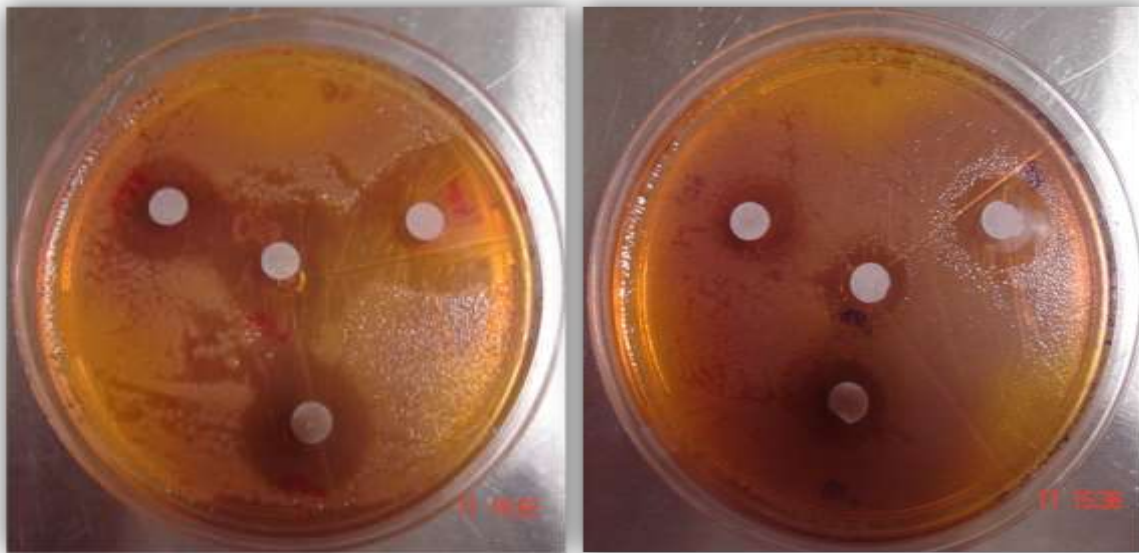


Figura 3. Halos generados por los extractos concentrados, obtenidos por los dos métodos, sobre *L. monocytogenes* (Lado izquierdo halos formados por extractos obtenidos por extracciones sucesivas, lado derecho halos generados por extractos obtenidos vía extracción simple).

Tabla 7. Diámetro de los halos de inhibición generados por los extractos concentrados, obtenidos por extracción sucesiva y extracción simple a las tres temperaturas de estudio.

Bacteria	Tipo de extracción	Temperatura		
		40° C	60 °C	90 °C
<i>Escherichia coli O157:H7</i> <i>Fluorescente</i>	Simple	12*	10	11
	Sucesiva	21	15	15
<i>Bordetella sp</i>	Simple	11	10	11
	Sucesiva	20	14	13
<i>Listeria monocytogenes</i>	Simple	15	11	15
	Sucesiva	35	15	23
<i>Pseudomona auruginosa</i>	Simple	11	12	11
	Sucesiva	14	11	12
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Simple	16	8	13
	Sucesiva	20	12	11
<i>Salmonella tiphymurium</i>	Simple	8	6	14
	Sucesiva	22	11	21
<i>Shigella flexneri</i>	Simple	11	12	11
	Sucesiva	18	19	20
<i>Shigella sonnei</i>	Simple	12	13	14
	Sucesiva	28	10	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	Simple	14	13	15
	Sucesiva	17	14	21
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Simple	15	11	15
	Sucesiva	13	6	13

Simple = Extractos obtenidos por extracción simple

Sucesiva = Extractos obtenidos por extracciones sucesivas

*Los diámetros de los halos está reportados en milímetros

Para el caso de estos tres extractos, se aprecian halos similares en tamaño para la mayoría de las bacterias bajo estudio, siendo *S. typhimurium* la que mostró halos de mayor tamaño con los extractos obtenidos a 40 y 90 °C, con respecto al generado por el extracto obtenido a 60 °C. En el caso de *Bordetella sp*, *L. monocytogenes* y *S. epidermis*, se obtuvieron halos del mismo tamaño con los extractos obtenidos a 40 y 90 °C, y de menor diámetro con el extracto de 60 °C. Para *E. coli O157:H7* y *S. choleraesuis* los tamaños de los halos están en función del siguiente orden de temperaturas de extracción: 40, 90 y 60 °C. Al observar los halos de *P. auruginosa* y *S. flexneri*, se observan halos de mayor diámetro con el extracto obtenido a 60 °C, y del mismo diámetro los generados por el extracto de 40 y 90 °C. Por último se observan halos más grandes con el extracto obtenido a 90 °C para *S. sonnei* y *S. aureus*.

Al comparar los halos de los extractos obtenidos mediante las dos metodologías de extracción, se puede apreciar que aquellos obtenidos mediante extracción simple, tienen menor efecto de inhibición que los extractos obtenidos mediante extracciones sucesivas. Este comportamiento se debe a que mediante las extracciones sucesivas se genera un mayor arrastre de compuestos fitoquímicos de la planta a diferencia de la menor concentración obtenida de estos vía extracción simple.

Para *E. coli O157:H7* (Fluorescente), en ambos casos se aprecian halos de mayor diámetro con los extractos obtenidos a 40 °C. El comportamiento de los halos generados por los extractos a 60 y 90 °C, fue diferente, puesto que los tamaños son inversos para los extractos obtenidos vía extracción simple con respecto a los obtenidos por extracción sucesiva. Cabe destacar que esta es una de las bacterias en donde se presentó mayor efecto de inhibición de los extractos.

Para *Bordetella sp* se observó mayor efecto de inhibición con el extracto obtenido a 40 °C, siguiendo el obtenido a 90 °C y por último el obtenido a 60 °C, con los extractos obtenidos mediante extracciones sucesivas, presentándose los halos de inhibición más pequeños con esta bacteria entre las diez estudiadas. En el caso de los halos generados por los extractos obtenidos mediante extracción simple, estos fueron los de menor tamaño, independientemente de la temperatura de extracción usada.

Para *L. monocytogenes*, con los extractos obtenidos por extracciones sucesivas, el halo generado por el extracto obtenido a 40 °C fue el que presentó el mayor diámetro de inhibición entre las diez bacterias estudiadas, de igual forma el generado por el extracto obtenido a 90 °C fue el mayor entre

las diez bacterias probadas a esta temperatura y el de menor tamaño fue el halo generado por el extracto obtenido a 60 °C. Al comparar el diámetro de los halos generados por el extracto en esta bacteria con los observados en las otras nueve, se puede determinar que el fitoquímico de la planta en estudio tiene mayor efecto de inhibición sobre esta bacteria. Los halos generados por los extractos obtenidos mediante extracción simple, son semejantes en tamaño y no se encontraron diferencias significativas en cuanto al diámetro. En la figura 3, podemos observar el comparativo de los halos obtenidos con los extractos obtenidos por ambos métodos de extracción.

Los diámetros de los halos de inhibición de los seis extractos sobre *P. auruginosa* son muy semejantes, tanto con los extractos obtenidos por extracción sucesiva, como para los obtenidos por extracción simple, se diferencian por dos o tres milímetros (Tabla 7).

Al observar los halos formados para *S. choleraesuis*, se aprecian diferencias significativas entre los diámetros de los halos del extracto obtenido a 40 °C (siendo el más grande en esta bacteria) y el obtenido a 90 °C (el más pequeño), para ambos extractos obtenidos por extracciones sucesivas, mientras que con los extractos obtenidos por extracción simple el de menor tamaño fue el obtenido a 60 °C y el más grande fue el de 40 °C.

Para *S. tiphymurium*, los extractos obtenidos por extracciones sucesivas a 40 y 90 °C, generaron halos de diámetros parecidos y mayores que a 60 °C. Con los extractos obtenidos por extracción simple, se observa el mismo comportamiento, pero los tamaños son menores al compararlos con la extracción sucesiva.

En las placas de agar de *S. flexneri*, las diferencias en el diámetro de los halos de inhibición también fueron mínimas para ambos casos. Con los extractos obtenidos por extracciones sucesivas se observó que el halo de mayor tamaño fue generado por el extracto obtenido a 90 °C y el de menor por el de 40 °C. Mientras que los obtenidos por extracción simple fueron de tamaños semejantes.

En el caso de *S. Sonnei* el halo de mayor tamaño y con una diferencia significativa, fue el producido por el extracto obtenido a 40 °C vía extracciones sucesivas. Sin embargo los halos obtenidos con los extractos obtenidos vía extracción simple son semejantes en tamaño.

En **S. aureus** se aprecia el único caso que muestra un comportamiento de los extractos diferente al resto, puesto que los halos generados por los extractos obtenidos a 90 °C mediante los dos métodos de extracción, fueron significativamente mayores a los obtenidos con los extractos obtenidos a las otras dos temperaturas de extracción, siguiendo en tamaño los generados por los extractos obtenidos a 40 °C y por último los generados por los extractos obtenidos a 60 °C.

Por último, para **S. epidermis** se puede apreciar que los extractos obtenidos a 40 y 90 °C, tienen un efecto semejante, puesto que ambos halos de inhibición tienen diámetros parecidos, para los extractos obtenidos mediante ambos métodos de extracción. Para el caso de los extractos obtenidos a 60 °C, se aprecian halos de menor tamaño en ambos casos, siendo menor el generado por el extracto obtenido por extracción sucesiva.

Para el caso de aquellos halos de mayor diámetro generados por los extractos obtenidos mediante extracción simple, que son más grandes para la misma bacteria que los obtenidos con los extractos generados por extracciones sucesivas, se debe a que en estos casos particulares la menor viscosidad del extracto favoreció una mayor difusión de este en el agar, que se traduce en una mayor zona de inhibición, mientras que al tener mayor viscosidad el extracto tenía menor difusión en el agar; la viscosidad puede relacionarse con la concentración de compuestos arrastrados al momento de la extracción, teniendo menor concentración de sólidos los extractos obtenidos por extracción simple que los obtenidos por extracciones sucesivas. Otro factor del cual depende este fenómeno es la presencia de mayor o menor humedad en el agar, que determina la difusión de los extractos sobre cada placa.

Con el fin de observar la disminución del efecto antimicrobiano del extracto en dilución, se probaron diluciones de los extractos en proporciones 1:5 y 1:10, estas pruebas tuvieron como objetivo determinar el comportamiento del extracto en dilución, para establecer las condiciones de las pruebas por vertido en placa.

La tabla 8 muestra los halos de inhibición generados por los extractos diluidos en proporción 1:5 de los extractos obtenidos mediante extracción sucesiva y extracción simple, frente a las diez bacterias bajo estudio, los diámetros son reportados en milímetros. Esta tabla muestra los resultados de los extractos obtenidos por ambos métodos de extracción, con el fin de comparar los resultados con respecto a la temperatura de extracción.

Tabla 8. Diámetro de los halos de inhibición de los extractos diluidos 1:5, obtenidos mediante extracciones sucesivas y extracción simple a las tres temperaturas de estudio.

Bacteria	Tipo de extracción	Temperatura		
		40° C	60 °C	90 °C
<i>Escherichia coli O157:H7</i> <i>Fluorescente</i>	Simple	*N	N	N
	Sucesiva	8	6	7
<i>Bordetella sp</i>	Simple	8	N	N
	Sucesiva	9	N	8
<i>Listeria monocytogenes</i>	Simple	N	N	N
	Sucesiva	10	8	10
<i>Pseudomona auruginosa</i>	Simple	9	6	N
	Sucesiva	12	10	9
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Simple	9	7	6
	Sucesiva	9	9	7
<i>Salmonella tiphymurium</i>	Simple	9	7	6
	Sucesiva	11	7	8
<i>Shigella flexneri</i>	Simple	12	8	6
	Sucesiva	12	8	9
<i>Shigella sonnei</i>	Simple	9	7	N
	Sucesiva	10	8	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	Simple	9	N	N
	Sucesiva	10	9	11
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Simple	8	6	6
	Sucesiva	8	6	9

Simple = Extractos obtenidos por extracción simple.

Sucesiva = Extractos obtenidos por extracciones sucesivas.

*Los diámetros de los halos está reportados en milímetros.

*N = No hubo formación de halo de inhibición.

Al comparar los halos de la tabla 8, con respecto al método de extracción, se puede apreciar una disminución del tamaño en estos, siendo de menor diámetro los obtenidos por los extractos generados por extracción simple, con los extractos obtenidos por extracción sucesiva, se puede apreciar una disminución de tamaño con respecto a los extractos concentrados obtenidos de la misma forma, sin embargo esta disminución no es muy alta y sólo no se genera inhibición para *Bordetella sp* con el extracto obtenido a 60 °C.

Para el caso *E. coli O157:H7 Fluorescente* y *L. monocytogenes*, ninguno de los tres extractos obtenidos vía extracción simple presentó efecto inhibitorio, mientras que para *Bordetella sp* y *S. aureus*, sólo mostró efecto el extracto obtenido a 40 °C, los halos de mayor tamaño obtenidos por estos extractos se aprecian en *S. flexneri*. La disminución del efecto antimicrobiano con respecto a lo generado por los extractos concentrados obtenidos de la misma forma es evidente.

La tabla 9 muestra los halos de inhibición generados por los extractos diluidos en proporción 1:10 de los extractos obtenidos mediante extracción sucesiva y simple, frente a las diez bacterias analizadas, los diámetros son reportados en milímetros. Al comparar los resultados se puede apreciar una disminución considerable del efecto de inhibición con los extractos diluidos obtenidos por extracción simple, observando más casos donde no hubo inhibición, y en los casos donde se observo efecto fue gracias al extracto obtenido a 40 °C, mientras que con el obtenido a 60 °C sólo se observa efecto en *P. auruginosa* y *S. sonnei* y con el extraído a 90 °C se aprecia efecto sobre *S. tiphymurium* y *S. epidermis*.

Para el caso de los halos generados por los extractos obtenidos vía extracciones sucesivas, diluidos en la misma proporción, se puede observar una disminución del efecto antimicrobiano menor con respecto a los diluidos en proporción 1:5, teniendo a su vez mayor efecto que los extractos generados vía extracción simple diluidos en proporción 1:10, para este caso se observan menos halos no medibles.

De esta forma se puede establecer que el extracto obtenido por extracción simple, disminuye considerablemente su efecto entre mayor sea su dilución, mientras que los obtenido por extracciones sucesivas no muestran una disminución tan drástica.

Tabla 9. Diámetro de los halos de inhibición de los extractos diluidos 1:10, obtenidos mediante extracciones sucesivas y extracción simple a las temperaturas de estudio.

Bacteria	Tipo de extracción	Temperatura		
		40° C	60 °C	90 °C
<i>Escherichia coli O157:H7</i> <i>Fluorescente</i>	Simple	*N	N	N
	Sucesiva	6	N	N
<i>Bordetella sp</i>	Simple	N	N	N
	Sucesiva	8	N	N
<i>Listeria monocytogenes</i>	Simple	N	N	N
	Sucesiva	10	9	8
<i>Pseudomona auruginosa</i>	Simple	6	6	N
	Sucesiva	10	8	8
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Simple	8	N	N
	Sucesiva	10	N	6
<i>Salmonella tiphymurium</i>	Simple	9	N	6
	Sucesiva	9	7	6
<i>Shigella flexneri</i>	Simple	N	N	N
	Sucesiva	10	6	6
<i>Shigella sonnei</i>	Simple	8	N	N
	Sucesiva	8	7	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	Simple	N	N	N
	Sucesiva	8	8	6
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Simple	7	N	6
	Sucesiva	8	6	7

Simple = Extractos obtenidos por extracción simple.

Sucesiva = Extractos obtenidos por extracciones sucesivas.

*Los diámetros de los halos está reportados en milímetros.

*N = No hubo formación de halo de inhibición.

Al analizar los resultados obtenidos en esta parte, se puede observar una disminución del efecto antimicrobiano de forma proporcional a la concentración, puesto que entre más diluidos se encuentran (proporción 1:10), menor es el efecto inhibitorio que se evidencia con la disminución del tamaño de los halos o la no generación de estos para determinadas bacterias. La figura 4 muestra el comparativo de los halos de inhibición generados por los extractos obtenidos mediante extracción simple sobre *S. choleraesuis*, del lado izquierdo se observan los halos generados por los extractos concentrados, mientras que del lado derecho se observan los halos generados por el mismo extracto, diluido en proporción 1:10, en dicha imagen se aprecia la disminución del efecto hasta la no generación de halos inhibitorios.

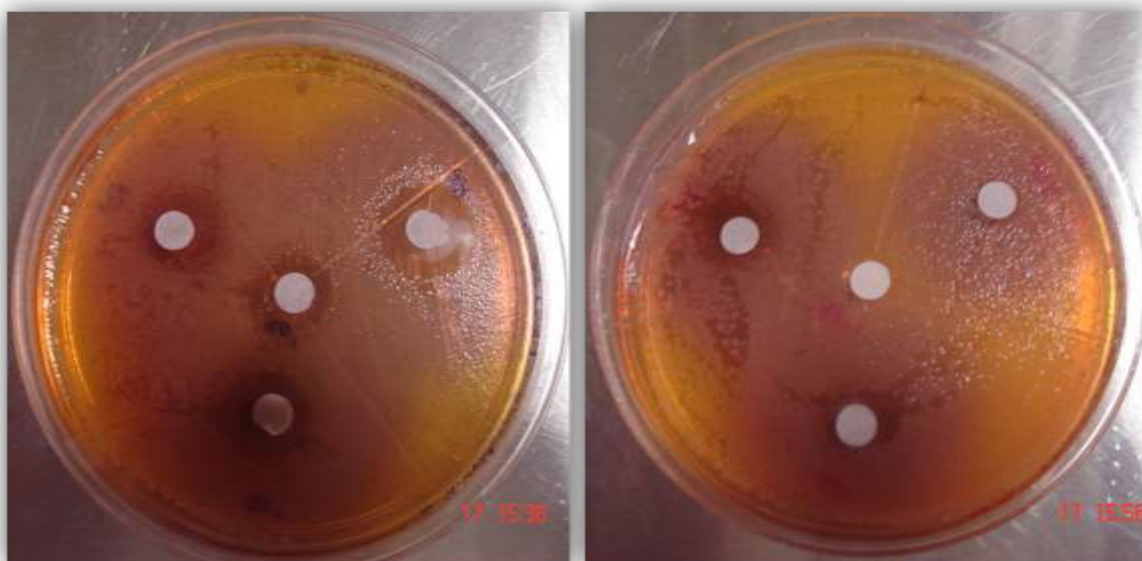


Figura 4. Comparación del efecto de los extractos concentrados y en dilución 1:10 sobre *S. choleraesuis*, obtenidos por extracción simple (Lado izquierdo, halos generados por extractos concentrados, lado derecho, halos generados por extractos diluidos 1:10).

Al comparar el efecto de los extractos obtenidos vía extracciones sucesivas con los obtenidos por extracción simple (Tabla 9), se puede observar un mayor efecto de los obtenidos por extracción sucesiva, puesto que para estos son pocos los casos donde no se genera inhibición, mientras que para los obtenidos vía extracción simple es un mayor número de casos donde no se aprecia formación de halos, esto también es proporcional a la concentración, puesto que entre mayor factor de dilución, menor es la inhibición observada.

5.2 Vertido en placa

Al conocer el efecto de los extractos frente a las diez bacterias patógenas de estudio, se determinó que para el análisis por vertido en placa se utilizarían los seis extractos, siguiendo la metodología del apartado 4.3.4.

Cómo los resultados anteriores mostraron que los extractos tenían un efecto inhibitorio alto de forma concentrada, las primeras pruebas de esta etapa se realizaron con los extractos diluidos en proporciones 1:5 y 1:10, sin embargo a estas concentraciones no hubo sobrevivencia de ninguna de las bacterias frente a las que se analizó el comportamiento de los extractos, lo cual permitió establecer que la concentración era muy elevada, y los resultados obtenidos no permitían alcanzar el objetivo de esta evaluación, el cual consistió en determinar el porcentaje de inhibición de los extractos a dos tiempos, para cada una de las dos bacterias de estudio.

Tras estos resultados, se estableció disminuir la concentración de extracto, por lo que se prepararon en proporción 1:50. Cuando se realizó una primer prueba con los extractos diluidos en esta proporción, la concentración inicial de bacterias inoculadas fue de 1×10^4 , la disminución del porcentaje de bacterias que se observó fue muy alto desde el tiempo cero, estando los porcentajes de inhibición en un intervalo del 99.6 -100 %, para los extractos obtenidos por ambos métodos de extracción a las tres temperaturas de estudio, estos porcentajes de inhibición no permitían establecer una diferencia significativa entre la capacidad inhibitoria de cada uno de los extractos. En base a esto se estableció elevar la concentración de bacterias inoculadas, pasando de 10 μL de la tercera dilución (1×10^6), a 10 μL de la segunda dilución (1×10^7). Estos ajustes a la metodología permitieron al final, establecer diferencias de inhibición de cada uno de los extractos, comparando el método y la temperatura de extracción.

Para evaluar los resultados de esta etapa se realizó el cálculo de los porcentajes de inhibición a T_0 (tiempo cero) y a T_{20} (20 minutos), para realizar dichos cálculos se requería conocer el número de UFC inoculadas en 1 mL del extracto diluido 1:50, por lo que se realizó un recuento de forma paralela a la inoculación de los extractos, con un mayor número de diluciones, como se describe en el apartado 4.3.4. Con este recuento se determinó el total de UFC/mL inoculadas, dicho valor se consideró el 100 % de bacterias presentes en 1 mL de extracto inoculado y vertido en cajas con AME e incubado por 24 h. Los valores obtenidos tras la incubación son las UFC/mL sobrevivientes

tras la interacción del extracto con la bacteria, por lo que se realizó el comparativo con el número inoculado inicialmente, para determinar los porcentajes de inhibición.

Es necesario destacar que esta prueba se realizó por duplicado, con el fin de observar si el comportamiento de los extractos era constante y a su vez realizar un análisis estadístico con el programa "Statistica versión 7.0", en dicho análisis se compararon los porcentajes de inhibición de cada uno de los seis extractos a T_0 y T_{20} contra cada una de las diez bacterias utilizadas para el estudio, con el fin de establecer si las diferencias observadas entre los porcentajes eran estadísticamente significativas, determinando así el efecto tanto de la temperatura como del método de extracción y las interacciones de estos parámetros con la capacidad antimicrobiana de cada uno.

La tabla 10 muestra en la primer columna la bacteria frente a la que se probó el extracto, en la segunda columna se aprecia la temperatura y el método de obtención del extracto correspondiente, mientras que en la cuarta y en la quinta columna se muestran los porcentajes de inhibición (promedio de ambos experimentos) a T_0 y a T_{20} , respectivamente, con la correspondiente desviación estándar.

En la tabla 11 se presentan los resultados del ANOVA en los que se aprecia que los tres factores principales tienen un efecto significativo sobre el porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos, los cuales fueron el tipo de bacteria evaluada, la temperatura y el método de extracción, lo que nos muestra que tanto la temperatura como el método de extracción afectan la capacidad antimicrobiana de los extractos acuosos, mientras que la capacidad de inhibición está en función del tipo de microorganismo que sea expuesto al extracto, debido a que cada una de las bacterias probadas presentan diferente comportamiento. También se puede apreciar que no existió interacción entre los factores principales.

Tabla 10. Promedio de los porcentajes de inhibición por vertido en placa para T₀ y T₂₀, con su correspondiente desviación estándar.

Bacteria	Extracto		% de inhibición en T ₀	% de inhibición en T ₂₀
	Temperatura	Extracción		
<i>Escherichia coli O157:H7</i> <i>Fluorescente</i>	40 °C	Simple	96.96 ± 1.64*	99.94 ± 0.06
		Sucesiva	98.31 ± 1.11	100 ± 0.00
	60 °C	Simple	87.28 ± 2.35	99.93 ± 0.03
		Sucesiva	97.98 ± 1.90	99.99 ± 0.001
	90 °C	Simple	88.58 ± 2.33	99.88 ± 0.08
		Sucesiva	96.58 ± 1.58	99.96 ± 0.04
<i>Bordetella sp</i>	40 °C	Simple	93.41 ± 3.05	99.98 ± 0.01
		Sucesiva	97.98 ± 1.90	99.99 ± 0.001
	60 °C	Simple	92.55 ± 4.40	99.93 ± 0.01
		Sucesiva	97.07 ± 1.95	99.99 ± 0.00
	90 °C	Simple	89.43 ± 1.61	99.90 ± 0.09
		Sucesiva	91.90 ± 0.13	99.96 ± 0.02
<i>Listeria monocytogenes</i>	40 °C	Simple	87.37 ± 5.24	99.50 ± 0.49
		Sucesiva	96.30 ± 3.66	100 ± 0.00
	60 °C	Simple	88.41 ± 0.92	99.92 ± 0.08
		Sucesiva	89.57 ± 0.96	100 ± 0.00
	90 °C	Simple	87.42 ± 1.92	99.65 ± 0.30
		Sucesiva	90.08 ± 0.81	99.99 ± 0.01
<i>Pseudomona auruginosa</i>	40 °C	Simple	92.50 ± 2.39	99.90 ± 0.09
		Sucesiva	97.98 ± 1.19	99.99 ± 0.01
	60 °C	Simple	89.45 ± 2.70	99.65 ± 0.33
		Sucesiva	91.03 ± 3.61	99.95 ± 0.03
	90 °C	Simple	92.23 ± 1.73	99.68 ± 0.32
		Sucesiva	93.65 ± 2.42	99.98 ± 0.01
<i>Salmonella choleraesuis</i>	40 °C	Simple	91.18 ± 6.02	99.37 ± 0.52
		Sucesiva	99.38 ± 0.60	99.99 ± 0.001
	60 °C	Simple	86.09 ± 0.07	99.52 ± 0.47
		Sucesiva	90.14 ± 0.63	99.93 ± 0.07
	90 °C	Simple	88.20 ± 0.65	99.64 ± 0.29
		Sucesiva	93.43 ± 4.85	99.94 ± 0.06

* Desviación estándar.

Continuación tabla 10.

Bacteria	Extracto		% de inhibición en T ₀	% de inhibición en T ₂₀
	Temperatura	Extracción		
<i>Salmonella tiphyurium</i>	40 °C	Simple	83.89 ± 5.04	99.42 ± 0.02
		Sucesiva	96.57 ± 0.01	99.96 ± 0.03
	60 °C	Simple	83.33 ± 4.42	99.42 ± 0.12
		Sucesiva	94.50 ± 0.51	99.92 ± 0.04
	90 °C	Simple	84.48 ± 6.98	98.61 ± 0.33
		Sucesiva	93.33 ± 0.10	99.94 ± 0.02
<i>Shigella flexneri</i>	40 °C	Simple	92.23 ± 6.16	99.75 ± 0.25
		Sucesiva	99.47 ± 0.53	99.87 ± 0.13
	60 °C	Simple	90.33 ± 0.25	99.89 ± 0.10
		Sucesiva	91.83 ± 0.61	100 ± 0.00
	90 °C	Simple	88.26 ± 0.44	99.90 ± 0.05
		Sucesiva	92.33 ± 0.44	99.98 ± 0.1
<i>Shigella sonnei</i>	40 °C	Simple	92.40 ± 3.85	98.84 1.15
		Sucesiva	95.66 ± 2.20	100 0.00
	60 °C	Simple	85.81 ± 3.15	99.70 0.28
		Sucesiva	92.88 ± 1.27	100 0.00
	90 °C	Simple	87.84 ± 0.86	99.20 0.77
		Sucesiva	95.19 ± 1.59	99.96 0.35
<i>Staphylococcus aureus</i>	40 °C	Simple	91.82 ± 2.86	99.77 0.23
		Sucesiva	99.79 ± 0.21	99.98 0.01
	60 °C	Simple	88.07 ± 1.10	99.97 0.02
		Sucesiva	92.85 ± 0.96	100 0.00
	90 °C	Simple	85.94 ± 1.34	99.86 0.09
		Sucesiva	92.12 ± 1.36	99.96 0.04
<i>Staphylococcus epidermis</i>	40 °C	Simple	85.92 ± 4.67	99.82 0.09
		Sucesiva	91.01 ± 0.54	99.99 0.01
	60 °C	Simple	81.91 ± 2.10	99.67 0.25
		Sucesiva	89.45 ± 2.02	99.89 0.06
	90 °C	Simple	85.95 ± 2.26	99.56 0.35
		Sucesiva	87.30 ± 2.62	99.98 0.01

* Desviación estándar.

Con los resultados registrados en la tabla 10 se realizó el análisis estadístico y se obtuvo para el T₀ el ANOVA (análisis de la varianza) que se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Análisis estadístico de los porcentajes de inhibición a T₀.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F calculado	Valor de la probabilidad de que el evento suceda
Intercepto	1002854	1	1002854	70208.45	0.000000
+Bacterias	522	9	58	4.06	0.000418
+Temperatura	404	2	202	14.13	0.000009
+ME	924	1	924	64.66	0.000000
Bacterias*Temperatura	139	18	8	0.54	0.925913
Bacterias*ME	135	9	15	1.05	0.410691
Temperatura*ME	15	2	8	0.53	0.593638
Bacterias*Temperatura*ME	147	18	8	0.57	0.906465
Error	857	60	14		

ME = Método de extracción.

+ Factores con efecto significativo.

Al analizar la variable denominada método de extracción se puede observar que los extractos con mayor capacidad antimicrobiana, son los obtenidos por extracción sucesiva (figura 5), puesto que el número de microorganismos recuperados en el recuento en placa fue menor a los recuentos generados por los extractos obtenidos por extracción simple. Se puede establecer que los treinta minutos de extracción acuosa en la extracción simple, no fueron tiempo suficiente para extraer los compuestos con capacidad inhibitoria en su totalidad, esto tal vez se deba a que el agua de extracción se sature en este tiempo de extracción, ocasionando que el compuesto de interés no sea recuperado en su totalidad o en mayor concentración.

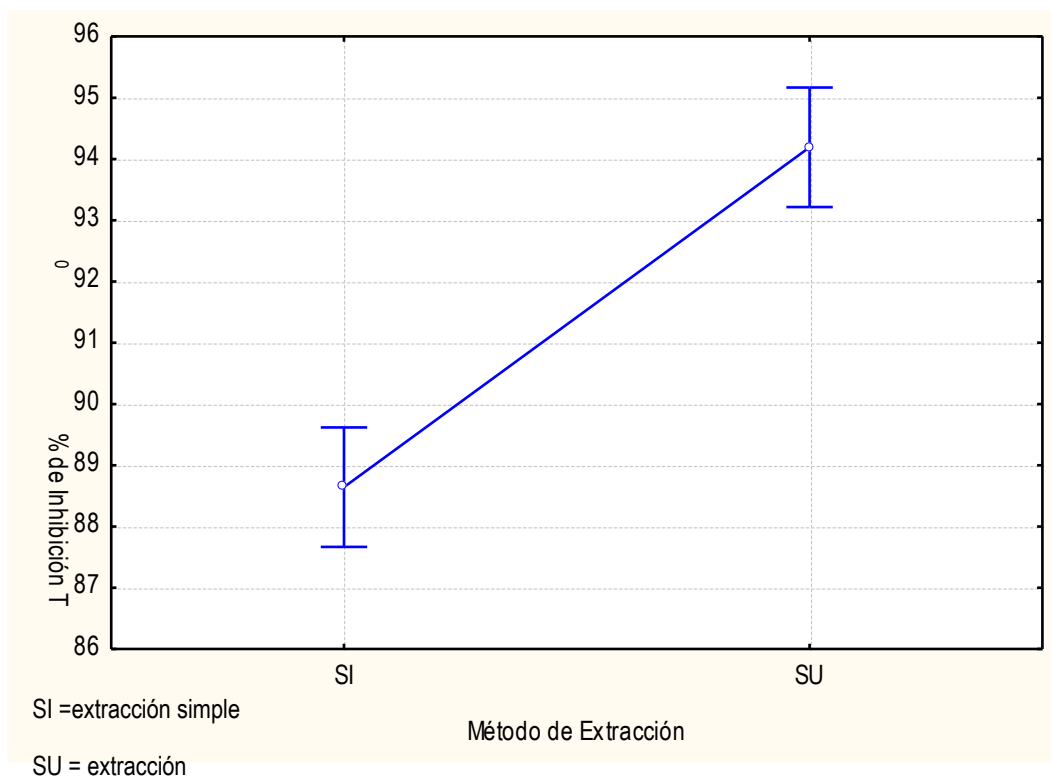


Figura 5. Efecto de la metodología de extracción sobre el porcentaje de inhibición al T₀.

Mientras que en el método de extracción sucesivo no sucede tal cosa, ya que el volumen de agua utilizado se cambia cada 30 min, lo cual propicia un mayor arrastre de los compuestos con capacidad de inhibición bacteriana, lo que genera que los extractos obtenidos por esta técnica tengan mayor capacidad antimicrobiana.

La figura 5 nos permite observar que a T₀, la extracción simple genera porcentajes de inhibición cercanos al 89 %, mientras que los extractos obtenidos por extracción sucesiva genera porcentajes de inhibición por arriba del 94 % de las bacterias inoculadas inicialmente, lo que permite establecer que sí hay un efecto estadísticamente significativo del método de extracción sobre la capacidad antimicrobiana de los extractos acuosos, siendo el método menos eficaz la extracción simple.

Al analizar el efecto antimicrobiano de los extractos obtenidos con respecto a la temperatura de extracción (figura 6), se puede observar que el mayor efecto de inhibición se obtiene con los compuestos extraídos a 40 °C, dichos extractos inhiben el 94 % de las bacterias inoculadas en un mililitro de extracto, teniendo una diferencia evidente de inhibición con respecto a los extraídos a 60 y 90 °C, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de inhibición

entre estos dos últimos extractos, ya que ambos inhiben alrededor del 90 % de UFC/mL. Esto demuestra que la temperatura si tiene un efecto directo sobre la capacidad antimicrobiana, puesto que a mayor temperatura (por arriba de los 40 °C) se disminuye el porcentaje de inhibición, frente a todas las bacterias probadas en el estudio.

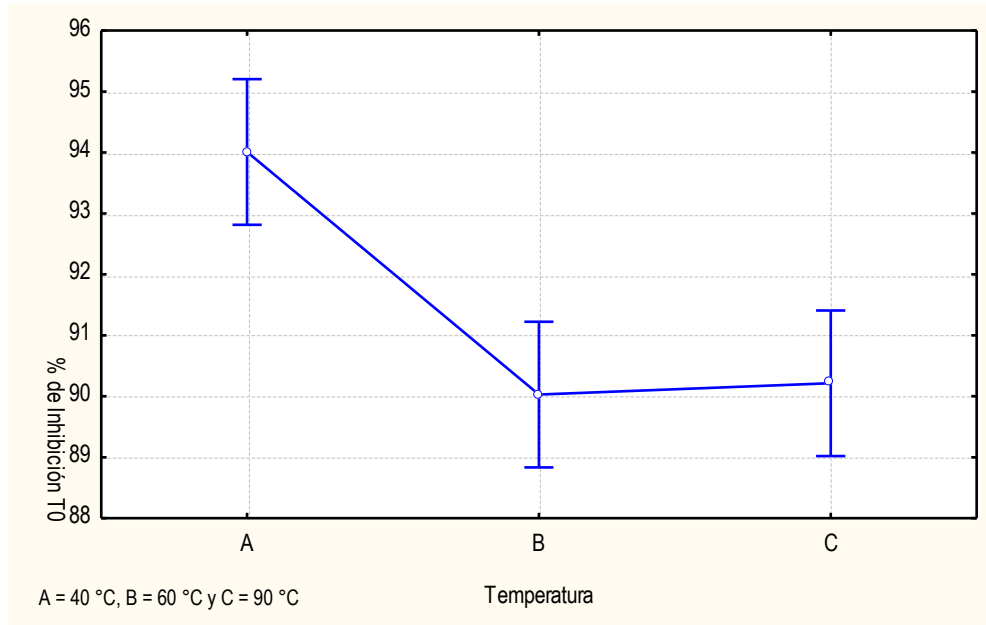


Figura 6. Efecto de la temperatura de extracción sobre el porcentaje de inhibición al T₀.

De acuerdo a los resultados representados en la figura 6, se puede establecer que la mejor temperatura de extracción para obtener extractos con una alta capacidad antimicrobiana es 40°C. Como todas las plantas, la composición de la planta bajo estudio está constituida en su mayoría por sustancias orgánicas como son fitoesteroles, flavonoides, saponinas y algunos otros glucósidos, además de carbohidratos, todas estas sustancias presentan sensibilidad a altas temperaturas, en diferentes grados, por lo que se puede establecer que al incrementar la temperatura por arriba de los 40°C se podría generar una desnaturalización, modificación estructural o volatilización de los compuestos que le brindan a la planta la propiedad antimicrobiana, lo cual se traduce en la disminución de los porcentajes de inhibición, que se da en función al grado de descomposición, modificación o pérdida de compuestos. Al comparar los resultados de ambas etapas de prueba, se puede apreciar que la temperatura afecta la capacidad antimicrobiana de los extractos, ya que tanto en los halos como en los recuentos del vertido en placa, la inhibición de las bacterias, disminuye conforme la temperatura de extracción fue más alta.

Por último se analiza la capacidad de inhibición de los extractos en función de las bacterias estudiadas (figura 7), observándose un efecto significativo de la capacidad de inhibición de los extractos sobre el crecimiento de estas bacterias. La diferencia de inhibición observada entre una y otra bacteria se podría considerar normal, ya que generalmente es sabido que las sustancias antimicrobianas que se encuentran en las plantas tienen un efecto selectivo, es decir, un cierto microorganismo es inhibido con diferente magnitud con respecto a otros (Conner, 1993).

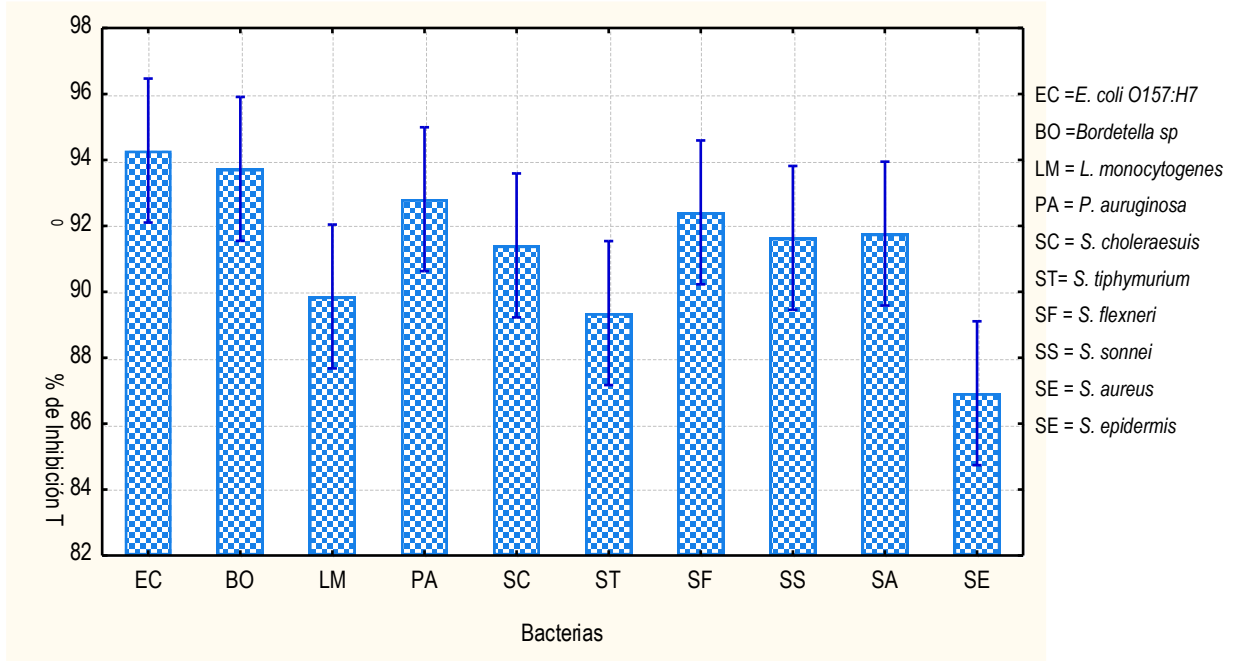


Figura 7. Influencia de las bacterias en el porcentaje de inhibición.

La eficacia de un antimicrobiano depende en gran parte del género, especie y microorganismo frente al que se utilice el compuesto y a pesar de que el grupo de bacterias utilizadas para este estudio se caracterizan por ser patógenas, no es un grupo homogéneo puesto que dentro de la diez se cuenta con Gram + y Gram – y el tipo de pared celular de la bacteria frente a la que se prueba un compuesto también influye en la eficacia del antimicrobiano. La pared de las bacterias Gram-negativas, en comparación de las positivas, son más susceptibles (más permeables, por ejemplo) al efecto de algunos compuestos; los cuales una vez dentro de la célula o sobre la membrana, puedan provocar una serie de alteraciones sobre la estructura celular, dando como resultado formación de poros en la membrana por donde es posible una fuga de iones K^+ y de macromoléculas como los ácidos nucleídos, causando muerte celular (Dusan *et al.*, 2006) o de originar sólo un ligero estrés en

las células patógenas en los primeros momentos de contacto, no obstante conforme transcurre el tiempo de contacto, el estrés provocado por las sustancias antimicrobianas es posible que se intensifique causando un daño letal, impidiendo así su reproducción y frenando rápidamente el crecimiento de la población (Busta, 1976).

Ahora para el T_{20} se muestra su análisis estadístico correspondiente en la tabla 12, en donde se puede apreciar que a diferencia del ANOVA de T_0 , sólo se observó el efecto significativo de la variable del método de extracción, mientras que la temperatura y las bacterias ya no muestran un efecto significativo sobre la capacidad antimicrobiana de los extractos.

Tabla 12. Análisis estadístico de los porcentajes de inhibición al T_{20} .

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F calculado	Valor de la probabilidad de que el evento suceda
Intercepto	1195612	1	1195612	9756923	0.000000
Bacterias	2	9	0	2	0.063401
Temperatura	0	2	0	11	0.525606
+ME	3	1	3	24	0.000009
Bacterias*Temperatura	1	18	0	0	0.974079
Bacterias*ME	2	9	0	2	0.093904
Temperatura*ME	0	2	0	1	0.505241
Bacterias*Temperatura*ME	1	18	0	0	0.984367
Error	7	60	0		

ME = Método de extracción.

+ Factores con efecto significativo.

La figura 8 permite observar que la diferencia en los porcentajes de inhibición entre los métodos de extracción es significativa, siendo los extractos con mayor capacidad de inhibición los obtenidos por extracción sucesiva, sin embargo al T_{20} , los porcentajes para ambos métodos de extracción se elevan considerablemente, y son más cercanos entre sí.

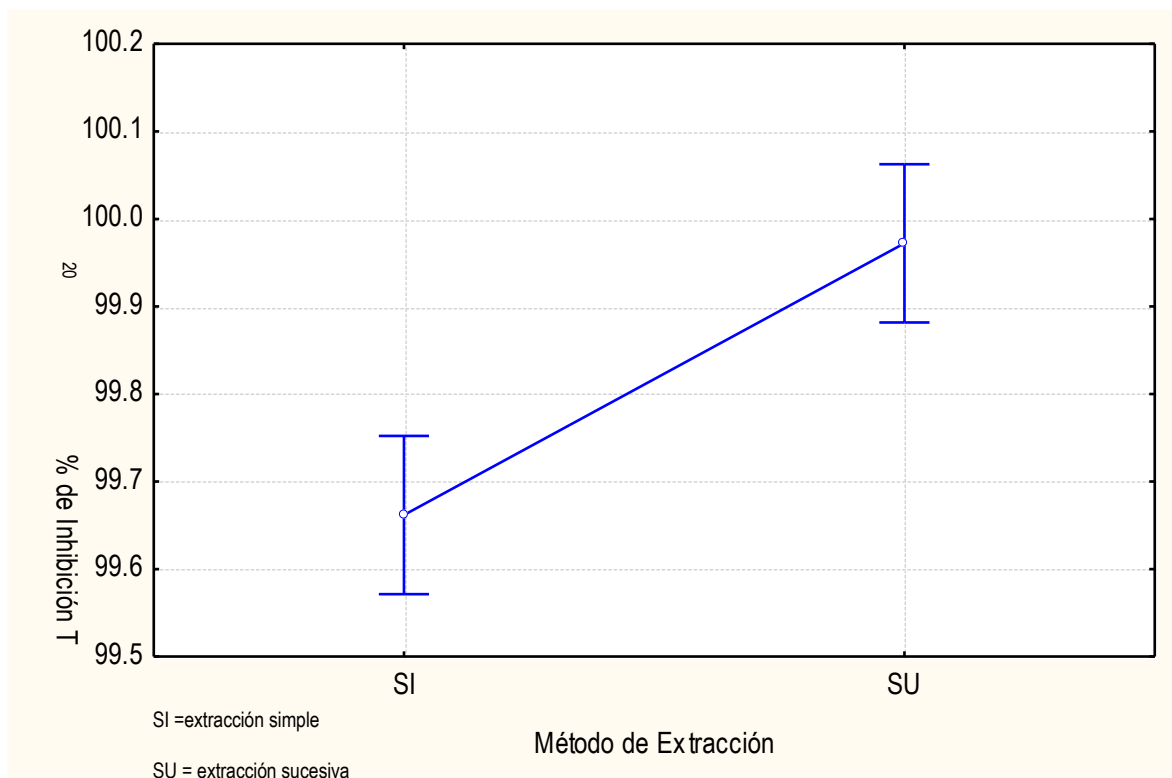


Figura 8. Efecto de la metodología de extracción sobre el porcentaje de inhibición al T₂₀.

Al observar las gráficas del efecto de la temperatura (figura 9) y del efecto de las bacterias (figura 10), se puede apreciar que ya no hay un efecto directo de estos parámetros sobre la capacidad antimicrobiana de los extractos. Para el caso de la temperatura se puede apreciar que las tres temperaturas generan porcentajes de inhibición de entre 99.80 a 99.85 por ciento, no existiendo diferencias significativas entre estas. Para el caso de las bacterias la gráfica muestra que los porcentajes de inhibición son muy semejantes para todas las bacterias a este tiempo. Estas dos situaciones se pueden explicar mediante el mayor tiempo de interacción de las bacterias con el extracto, ya que al T₀, en el caso de las bacterias que son menos inhibidas, es posible que sólo se genere un ligero estrés en las células, mientras que al transcurrir los veinte minutos de contacto, el estrés provocado por las sustancias antimicrobianas se intensifica causando un daño letal, impidiendo así su reproducción y frenando rápidamente el crecimiento de la población (Busta, 1976).

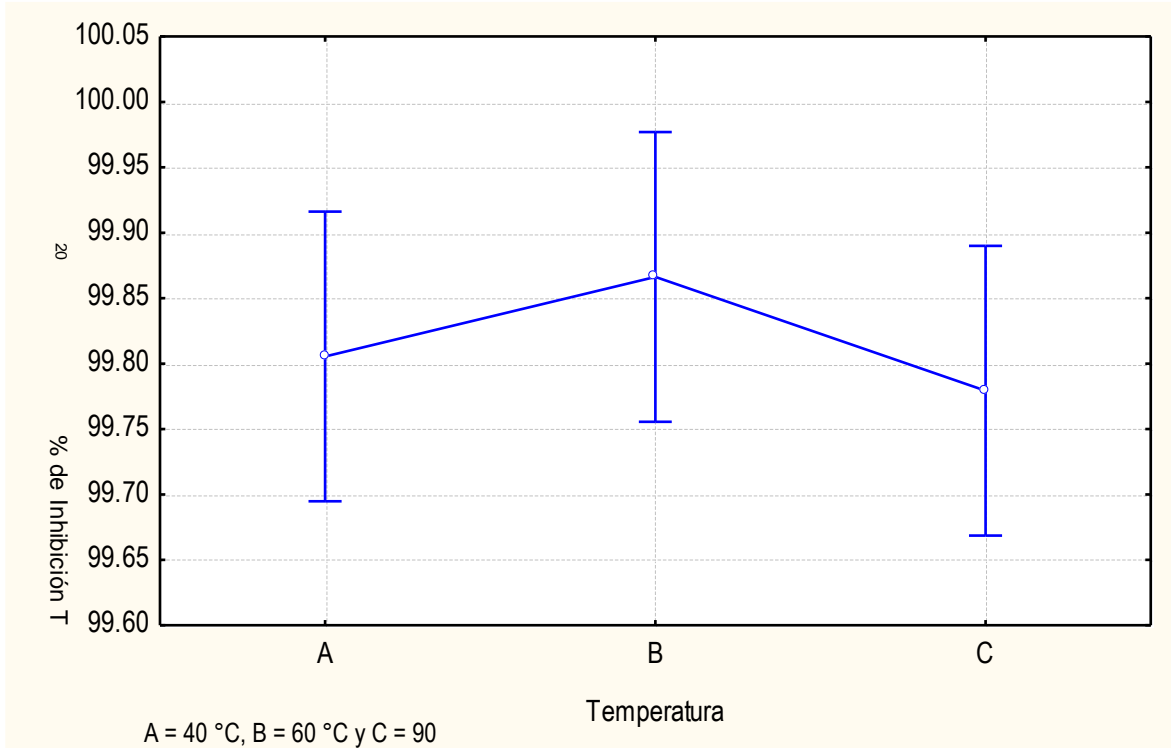


Figura 9. Efecto de la temperatura de extracción sobre el porcentaje de inhibición al T₂₀.

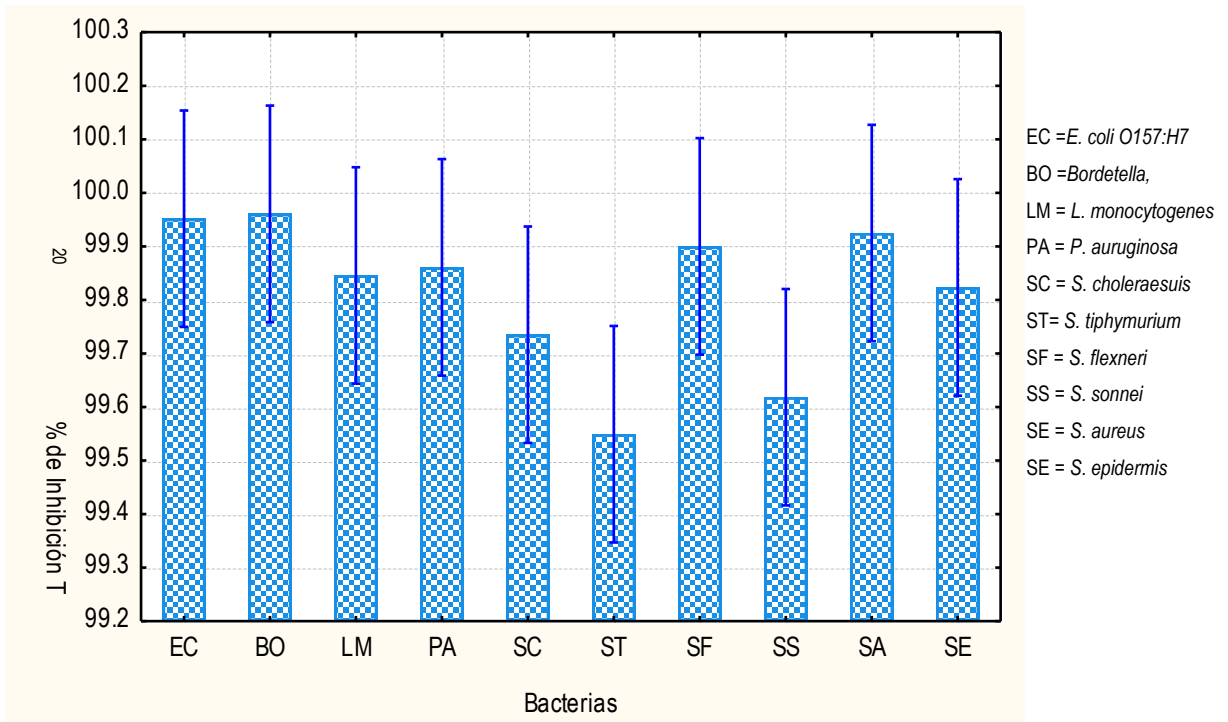


Figura 10. Porcentajes de inhibición para cada una de las bacterias probadas a T₂₀.

Al comparar los resultados aquí presentados con los obtenidos por Peña (2009), se pueden observar diferencias en lo que reporta en su estudio, ya que su trabajo indica que la temperatura de extracción no tiene un efecto significativo sobre la capacidad antimicrobiana del extracto frente a los microorganismos con los que los probó, sólo hace referencia a que todos sus extractos tienen efecto inhibitor semejante, sin embargo, mediante las pruebas realizadas en el presente trabajo se puede observar que si existe efecto de la temperatura sobre la capacidad antimicrobiana de los fitoquímicos de la planta estudiada.

Al analizar el trabajo y la metodología seguida se pueden apreciar algunos errores cometidos durante la obtención, manipulación y almacenamiento de los extractos obtenidos, que se reflejan en los resultados, puesto que inicialmente se planteó que a determinado incremento de la temperatura de extracción si debería existir un cambio en el comportamiento de los extractos, por el origen del fitoquímico, y las modificaciones que genera el calor sobre compuestos de esta especie.

VI. CONCLUSIONES

1. La temperatura de extracción tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la capacidad antimicrobiana de los extractos acuosos, ya que fue observado que a temperaturas de 60 °C en adelante se disminuye la actividad antimicrobiana del extracto.
2. La temperatura óptima de extracción fue de 40 °C, ya que a esta temperatura, fue donde se observó la mayor capacidad antimicrobiana de los fitoquímicos extraídos al tiempo de contacto de cero minutos, mientras que a los 20 minutos se observó que este efecto ya no era significativo.
3. El método de extracción afecta la capacidad antimicrobiana, teniendo mayor capacidad de inhibición los extractos obtenidos por extracciones sucesivas, que los obtenidos por extracción simple, esto tal vez se deba a que el solvente de extracción sea saturado en el tiempo probado, lo cual no permite una extracción eficiente del fitoquímico.
4. La capacidad inhibitoria de los extractos mostró una dependencia del tipo de bacteria estudiado, lo cual era de esperarse, ya que cada una tiene metabolismo diferente.
5. No existe interacción entre la temperatura, el método de extracción y la bacteria frente a la que se prueba el extracto. Cada una de estas variables afecta en forma independiente la capacidad antimicrobiana de los extractos.
6. Se puede establecer que para fines prácticos, el mejor método de obtención es la extracción sucesiva, a cualquier temperatura dentro del intervalo utilizado en el presente trabajo, para disminuir significativamente los contenidos de bacterias patógenas de algún alimento, considerando un tiempo de contacto del extracto con el producto de alrededor de 20 minutos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ☞ Amaral, J. A., Ekins, A., Richards, S. R. y Knowles, R. 1998. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 520-525.
- ☞ Aureli, P., Costantini, A. y Zolea, S. 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *L. monocytogenes*, *J. Food Prot*, **55**: 344-348.
- ☞ Ayala, Z. J. F., Villegas, O. M., Cuamea, N. F., González, A. G. A. 2005. *Compuestos volátiles de origen natural. Nueva alternativa para la conservación*. En: A. González, G. A. Gardea, N. F. Cuamea (Eds), *Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados*. España: Logiprint Digital. pp. 315-338.
- ☞ Balls, A. K., Hale, W. S. y Harris, T. H. 1942. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem*, **19**: 279-288.
- ☞ Barre, J. T., Bowden, B. F., Coll, J. C., Jesus, J., Fuente, V. E., Janairo, G. C. y Ragasa, C. Y. 1997. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. *Phytochemistry*, **45**: 321-324
- ☞ Beuchat, L. R. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. En: C. L. Wilson y S. Droby (Eds.), *Antimicrobial in Foods*. Londres: CRC Press. pp. 149-169.
- ☞ Brantner, A., Males, Z., Pepeljnjak, S. y Antolic, A. 1996. Antimicrobial activity of *Paliurus*. *J. Ethnopharmacol*, **52**(2):119-122.
- ☞ Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *J. Food Microbiol*, **94**: 223 - 253.
- ☞ Busta, F. F. 1976. Practical implications of injured microorganisms in foods. *J. Milk Food Technology*, **39**: 138-145.
- ☞ Caballero, T. A. 2008. *Temas de higiene de los alimentos*. La Habana: Editorial ciencias médicas. pp. 18-41.
- ☞ Calvo, M. 1991. *Aditivos Alimentarios: Propiedades, Aplicaciones y Efectos sobre la Salud*. Zaragoza: Librería General. pp. 47-56.
- ☞ Carey, F. A. 2003. *Química orgánica* 5ª Edición. Madrid: McGraw-Hill. pp. 352-356.
- ☞ Cliver, D. O. 1993. *Eating Safely: Avoiding Foodborne Illness*. New York: A. Golaine, American Council on Science and Health. pp. 52-59.

- ∞ Colilla, F. J., Rocher, A. y Mendez, V. 1990. Gaa-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett*, **270**: 191-194
- ∞ Conner, D. E. 1993. *Naturally occurring compounds*. En: Davidson, P. y Branen, A. L. (Eds.), *Antimicrobials in food*. New York: Marcel Dekker. pp 23-41.
- ∞ Corbo, M. R., Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M. y Guerzoni, M. E. 2000. Effects of hexanal, trans-2-hexenal, and storage temperature on shelf life of fresh sliced apples. *J. Agric. Food Chem*, **48**: 2401-2408.
- ∞ Cruz, J. M., Dominguez, H., Parajo, J. C. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *J Agric Food Chem*, **49**: 2459-2464.
- ∞ Cuber, N., Monferrer, A. y Villalta, J. 2002. *Aditivos alimentarios*. España: Ediciones Mundi-Prensa. pp. 54-74.
- ∞ Davidson, P. M. 2001. *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds*. En: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*, (2nd Ed.). Washington: ASM Press. pp. 593-627.
- ∞ Davidson, P. M. y Parish, M. E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol*, **43**(1): 148-155.
- ∞ Davidson, P. M., Zivanovic, S. 2003. *The use of natural antimicrobials*. En: Zeuthen, P. y Bogh, Z. L. (Eds.), *Food Preservation Techniques*. Washington: ASM Press. pp. 5-29.
- ∞ Davidson, P. M., Sofos, J. N. y Branen, A. I. 2005. *Antimicrobial in Foods*. Reino Unido: CRC Press, Andover. pp. 214-226.
- ∞ Domingo, D. y López, B. M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioterap*, **16**(4): 385-393.
- ∞ Dos Santos, E. A. 2007. *Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos*. Tesis doctoral. España: Universidad Autónoma de Barcelona. pp. 44-105.
- ∞ Duke, J. A. 1985. *Handbook of medicinal herbs*. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc. pp. 379-383.
- ∞ Dusan, F., Sabol, M., Domaracka, K. y Bujnakova, D. 2006. Essential oils: their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in vitro J*, **20**: 1435-1445.

- ∞ FAO/WHO. 1975. Pesticide residues in food. Report of the 1974 Joint Meeting of the FAO Working Party of Experts on Pesticide Residues and the WHO Expert Committee on Pesticide Residues. Geneva, Switzerland: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. *FAO Agricultural Studies*. 97, WHO Technical Report Series no. 574.
- ∞ Fernández, E. E. 2000. *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. México: Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 105-131.
- ∞ Fessenden, R. J. y Fessenden, J. S. 1982. *Organic chemistry*. Boston, Mass.: Willard Grant Press. pp. 302-304.
- ∞ Freiburghaus, F., Kaminsky, R., Nkunya, M. H.H. y Brun, R. 1996. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. *J. Ethnopharmacol*, **55**: 1-11
- ∞ Fukai, T., Marumo, A., Kaitou, K., Kanda, T., Terada, S., Nomura, T. 2002. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia J*, **73**: 536-539.
- ∞ Geissman, T. A. 1963. *Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds*. En: M. Florkin, y E. H. Stotz (Eds.), *Pyrrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents*. New York: Elsevier. pp. 265.
- ∞ Gutiérrez, J. 2006. *Estudio de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a diferentes serotipos de Salmonella spp.* Tesis de licenciatura. Universidad de Córdoba. pp. 27-31.
- ∞ Hefnawy, Y. A., Moustafa, S. I. y Marth, E. H. 1993. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to selected spices. *J. Food Prod*, **56**(10): 876-879.
- ∞ Hernández, P. L. 2003. *Actividad inhibitoria y letal de los extractos de ajo para E. coli y L. innocua*. Tesis de licenciatura. México: Universidad de las Américas Puebla. pp. 8-31
- ∞ Huerta, B., Ponsa, F., Ordóñez, G., Fernández, N. y Peñalver, P. 2005. *Estudio de eficiencia de aceites esenciales ante una infección experimental de Salmonella enteritidis en gallinas ponedoras de producción*. XLII Simposium de Avicultura Científica. España, Cáceres.
- ∞ Jones, S. B. y Luchsinger, A. E. 1986. *Plant systematics*. New York: McGraw-Hill Book. pp. 157-159.

- ↻ Juven, B. J., Kanner, J., Schued, F. y Weissolowics, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oils and its active constituents. *J. Appl. Bacteriology*, **76**: 626-631.
- ↻ Kabara, J. J. 1991. *Medium-Chain fatty acids and esters*. En: P. M. Davidson y A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in foods*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 121-126.
- ↻ Kragh, K. M., Nielsen, J. E., Nielsen, K. K., Dreboldt, S. y Mikkelsen, J. D. 1995. Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **8**: 424-434.
- ↻ Lanciotti, R., Corbo, M. R., Gardini, F., Sinigaglia, M. y Guerzoni, M. E. 1999. *Effects of hexanal, on the shelf life of fresh apples slices*. *J. Agric. Food Chem*, **47**: 4769-4776.
- ↻ Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E. y Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends Food Sci. Technol*, **15**: 201-208.
- ↻ Lindsay, R. C. 1996. *Food aditives*. En: O.R. Fennema (Ed.), *Food Chemistry*. Nueva York: Marcel Dekker. pp. 767-823.
- ↻ Luck, E. y Jager, M. 1997. *Antimicrobial Food Additives. Characteristics, Uses and Effects*. Springer-Verlag. Nueva York: Springer. pp. 35-54.
- ↻ Lyengar, R. y McEvily, A. J. 1992. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends Food Sci. Technol*, **3**: (3) 60-64.
- ↻ Mason, T. L. y Wasserman, B. P. 1987. Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry J*, **26**: 2197-2202.
- ↻ McDevitt, J. T., Schneider, D. M., Katiyar, S. K. y Edlind, T. D. 1996. *Berberine: a candidate for the treatment of diarrhea in AIDS patients*. En: Program and Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 175.
- ↻ McMahon, J. B., Currens, M. J., Gulakowski, R. J., Buckheit, R. W.J., Lackman, S. C., Hallock, Y. F. y Boyd, M. R. 1995. Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cell killing by at least two distinct mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother*, **39**: 484-488.
- ↻ Méndez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G. G., Méndez, R., Soriano, F., Salinas, M. y De Haro, C. 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in

- eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gaa-horothionin, from barley endosperm. *J. Biochem*, **194**: 533-539
- ☞ Mendoza, L., Wilkens, M. y Urzua, A. 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some *Chilean Pseudognaphalium (Asteraceae)*. *J. Ethnopharmacol*, **58**: 85-88
- ☞ Michiels, N., Missotten, J., Fremaut, J., Smet, D. E., y Dierick, S. 2007. In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-against the pig gut flora. *Livestock Science*, **109**: 157-160.
- ☞ Miskovsky, P. 2002. Hypericin-A new antiviral and antitumor photosensitizer. *Curr drug Targets*, **3**: 55.84.
- ☞ Molins, R. 2007. El costo invisible de las enfermedades transmitidas por alimentos. *Comunica*. Edición No. 1: 40-46. Obtenido el 16 abril 2010, de <http://www.infoagro.net/salud/temas%20actualidad/CostoEnfermedades.pdf>
- ☞ Mossel, D. A. A., Moreno B., Struijk, C. B. 2003. *Microbiología de los alimentos*. España: Acribia S. A. pp. 98, 255-256 y 264.
- ☞ Müller, G. 1981. *Microbiología de los Alimentos Vegetales*. España: Acribia. pp. 224-228.
- ☞ Murphy, C. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**(4): 564-582.
- ☞ Nychas, G. J., Skandamis, P. N. y Tassou, C. C. 2003. *Antimicrobials from herbs and spices*. En: S Roller (Ed.). *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Washington: CRC Press. pp. 177-199.
- ☞ Nychas, J. E. 1995. *Natural antimicrobials from plants*. En: G. W Gould (Ed.), *New Methods of Food Preservation*. London: UK: Champman & Hall. pp. 59-89.
- ☞ Omulokoli, E., Khan, B. y Chhabra, S. C. 1997. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, **56**: 133-137.
- ☞ Pegg, R. B. y Shaidi, F. 2000. *Nitrite Curing of Meat, the N-nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives*. Food and Nutrition Press. p 268.
- ☞ Peña, M. B. 2009. *Efecto de la temperatura de extracción sobre la capacidad antimicrobiana de un extracto fitoquímico en medio acuoso*. Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

- ☞ Puupponen, P. R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Copia, A. y Oksman C. K. M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol*, **90**: 494-507.
- ☞ Raybaudi, M. R., Soliva, F. R., Martín, B. O. 2006. *Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas*. España: Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida. Alcalde Rovira Roure. pp. 15-21.
- ☞ Rivera, C. D. 2008 *Efecto antimicrobiano de jugo de zanahoria*. Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. pp. 15-18.
- ☞ Roberts, H. 1986. Aditivos alimentarios. En: H. R. Roberts (Ed.). *Sanidad alimentaria*. España: Acribia, S. A. pp. 198-203.
- ☞ Scalbert, A. 1991. *Antimicrobial properties of tannins*. *Phytochemistry J*, **30**: 3875-3883.
- ☞ Scherriber, K., Aurich, O., Oskke, G. (1963). Solanum alkaloiden XVIII. Dunnschicht chromatographie von Solanm-Steroidalkaloiden und Steroidsapogeninen. *J. Chromatog*, **12**: 63-69.
- ☞ Schultes, R. E. 1978. *The kingdom of plants*. En: W. A. R. Thomson (Ed.), *Medicines from the Earth*. New York: McGraw-Hill Book Co. p. 208.
- ☞ Sebti, I., Martial, A. G., Carnet, P. A., Grelier, S. y Coma, V. 2005. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *J. Food Sci*, **70**(2): 100-104.
- ☞ Sethi, M. L. 1979. Inhibition of reverse transcriptase activity by benzophenanthridine alkaloids. *J. Nat. Prod*, **42**: 187-196.
- ☞ Sharon, N. y Ofek, I. 1986. *Mannose specific bacterial surface lectins*. En: D. Mirelman (Ed.), *Microbial lectins and agglutinins*. New York: John Wiley & Sons, Inc. pp. 55-82.
- ☞ Spencer, P.S. y Berman. F. 2003. Dietary nitrates, nitrites and N-nitroso compounds and cancer risk, with special emphasis on the epidemiological evidence. En: J.P.F. D'Mello, (Ed.), *Food Safety: Contaminants and Toxins*. New York: CABI Publishers. pp. 217-236.
- ☞ Terras, F. R. G., Schoofs, H. M. E., Thevissen, H. M. E., Osborn, R. W., Vanderleyden, B. P. A. Caue, J. y Broekaert, W. F. 1993. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiol*, **103**: 1311-1319.

- ☞ Thomson, W. A.R. 1978. *Medicines from the Earth*. United Kingdom: McGraw-Hill Book. pp. 254-253.
- ☞ Urs, N. V.R. y Dunleavy, J. M. 1975. Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, soybeans). *Phytopathology*, **65**: 686-690.
- ☞ Wedzicha, B. 1995. *Interactions involving sulphites, sorbic acid and benzoic acid*. En: A. Gaonkar (Ed.), *Ingredient Interactions*. Nueva York: Marcel Dekker. pp. 529-558.
- ☞ Wild, R. 1994. The complete book of natural and medicinal cures. *J. Ethnopharmacol*, **52**: 119-122.
- ☞ Wilkins, K. M. y Board, R. G. 1989. Natural antimicrobials systems. En: G. W. Gould (Ed.), *Mechanisms of action of food preservation procedures*. New York: Elsevier Science. pp. 172-184.
- ☞ Xie, L, N. S., Hettiarachchy, M. E., Jane, M. y Johnson, G. 2003. Antimicrobial activity of Ginkgo biloba leaf extract on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci*, **68**(1): 268-270.
- ☞ Xu, H. X., Zeng, F. Q., Wan, M. y Sim, K. Y. 1996. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J. Nat. Prod*, **59**: 643-645.
- ☞ Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, O. F., Bilaloglu. V. 2000 Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argétea* Desf ex DC), sage (*Salvia trilobal*) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agric Food Chem*, **48**: 5030-5034.
- ☞ Zaika, L. L. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J. food Safety*, **9**: 97-118.
- ☞ Zhang, Y. y Lewis, K. 1997. F abatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol. Lett*, **149**: 59-64.