



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

“AISLAMIENTO, EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES ANTIMICROBIANAS DE LAS DIVERSAS PARTES DE LA ZANAHORIA”

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICA

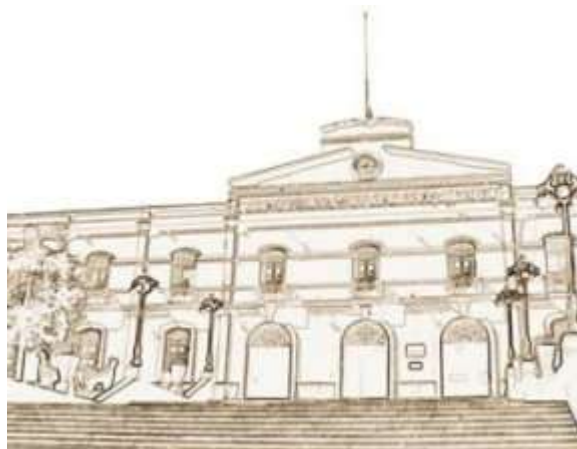
PRESENTA:

MARLEN ESTRADA TRINIDAD

DIRECTORES DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA PÁEZ HERNÁNDEZ.

DRA. MA. DE LOURDES PACHECO HERNÁNDEZ.

PACHUCA, DE SOTO, HIDALGO



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química Analítica del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

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

AGRADECIMIENTOS

Para poder realizar esta tesis de la mejor manera posible fue necesario el apoyo de muchas personas a las cuales quiero agradecer.

En primer lugar a mis padres Serafín y Elvira quienes han sido un apoyo moral y económico para lograr este fin. Gracias por su paciencia comprensión y cariño.

A mis hermanos Miriam, Maritza y Arturo por ayudarme y apoyarme sin condiciones y por aguantar mis malos momentos.

A la Dra. Elena por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la culminación de este trabajo. Gracias por su paciencia y apoyo en todo momento.

A mis sinodales los Drs. Joseantonio Godoy, Javier Castro, Carlos Andrés Galán, Giaan Arturo, José Antonio Rodríguez, Ma. Elena Páez y Araceli Sierra por las sugerencias realizadas al presentarles mis avances.

Mi eterno agradecimiento a Edgar por su amor, apoyo y comprensión por el tiempo que esta tesis nos ha restado para estar juntos. Gracias cariño por estar a mi lado en las buenas y en las malas.

A mis amigas Lety y Karemi que a pesar que no estemos juntas yo se que cuento con ellas y gracias por todo el apoyo que me brindaron dentro y fuera de mi carrera.

Además de las personas que conocí en el camino que me brindaron su amistad y animo para la culminación de esta tesis Paco, Pera y Ángel.

Por último quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio por brindarme su amistad sin condiciones, Silvia, Tere, Yucundo, su ánimo y estímulo para la finalización de esta tesis

A todos ustedes mil gracias de todo corazón, que Dios los bendiga, porque han sido una bendición en mi vida.

DEDICATORIAS

A mis Padres

Con mucho cariño a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén conmigo a mi lado.

Por todo su apoyo, cariño y comprensión durante toda mi vida, y por todos los esfuerzo realizados para poder lograr esta gran meta.

Esta tesis es por ustedes y para ustedes porque nunca voy a terminar de agradecerles.

LOS QUIERO MUCHO.

GRACIAS.

Si la educación te parece cara, prueba con la ignorancia.

■ La mejor manera de educarse es aprender.

■ Aprender es ser un árbol en otoño que espera la primavera para nutrirse de hojas.

ÍNDICE

<i>Índice de figuras</i>	<i>iv</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>v</i>
<i>Índice de espectros</i>	<i>vi</i>
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	4
1.1 Generalidades acerca de la zanahoria	5
1.1.1 Historia	5
1.1.2 Descripción de la planta	6
1.2 Propiedades de la zanahoria	7
1.3 Antimicrobianos en plantas	11
1.4 Estudios preliminares acerca de la actividad antimicrobiana de la zanahoria	13
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo general	18
2.2 Objetivos particulares	18
3. METODOLOGIA	19
3.1 Materiales, equipos y reactivos	21
3.2 Obtención de los jugos de las diferentes partes de la zanahoria y almacenamiento	22
3.3 Extracción de componentes antimicrobianos	22
3.3.1 Elección de los disolventes para la extracción de componentes antimicrobianos.	22
3.3.2 Obtención de los extractos	23
3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana	23
3.5 Fraccionamiento de los extractos activos	24
3.5.1 Extracción líquido-líquido	24

3.5.2 Cromatografía en columna	25
3.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de cada uno de las fracciones aisladas	26
3.7 Caracterización de los compuestos con actividad antimicrobiana	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 Extracción de componentes antimicrobianos	28
4.2 Evaluación antimicrobiana	28
4.2.1 Técnicas para la evaluación antimicrobiana	28
4.3 Cromatografía en columna	29
4.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados por inoculación directa	31
4.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados por la técnica del bioscreen	31
4.6 Caracterización de los compuestos con actividad antimicrobiana	33
4.6.1 Espectroscopía de infrarrojo	34
4.6.1.1 Fracción 1 del floema (F1)	34
4.6.1.2 Fracción 9 del floema (F9)	34
4.6.1.3 Fracción 4 de la peridermis (C4)	34
4.6.1.4 Fracción 2 del xilema (X2)	35
4.6.2 Espectrometría de masas	35
4.6.2.1 Fracción 1 del floema (F1)	35
4.6.2.2 Fracción 4 de la peridermis (C4)	36
4.6.2.3 Fracción 2 del xilema (X2)	36
4.6.3 Identificación de los compuestos con actividad antimicrobiana	36
4.6.3.1 Ácido hexadecanóico	36
V. CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS	42

ANEXOS	45
ANEXO 1 Espectros de IR y MS para los extractos con actividad antimicrobiana	46
ANEXO 2 Técnicas empleadas para la evaluación antimicrobiana	51
A.2.1 Preparación del inóculo	52
A.2.2 Técnica de difusión en disco	53
A.2.2.1 Medio de cultivo	53
A.2.2.2 Preparación del inóculo	53
A.2.2.3 Inoculación de las placas	53
A.2.2.4 Aplicación de los discos sobre las placas inoculadas	54
A.2.3 Técnica de pozos	54
A.2.4 Técnica de inoculación directa	55
A.2.5 Técnica del bioscreen	56
DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Países donde se originaron las zanahorias	5
Figura 2. Fotografía de zanahorias del tipo <i>Chantenay</i>	6
Figura 3. Partes principales de la raíz de la zanahoria	7
Figura 4. Tipos de zanahoria	8
Figura 5. Metodología seguida en este trabajo.	20
Figura 6. Extracciones con acetona de cada fracción de la zanahoria	30
Figura 7. Cinética del crecimiento microbiano de las fracciones F8 y F9 activas contra <i>Listeria Monocytogenes</i>	32
Figura 8. Estructura del ácido hexadecanóico	36
Figura 9. Espectro IR reportado para el ácido hexadecanóico	37
Figura 10. Espectro de IR para la fracción F1	37
Figura 11. Espectro de masas reportado para el ácido hexadecanóico	38
Figura 12. Espectro de masas para la fracción F1	38
Figura 13. Arreglo de McLafferty	39
Figura 14. Pérdida de un grupo alquilo.	39
Figura 15. Preparación del inóculo	52
Figura 16. Diagrama de la técnica de los sensidiscos para evaluar la actividad antimicrobiana	54
Figura 17. Diagrama de la técnica de pozos para evaluar la actividad antimicrobiana.	55
Figura 18. Diagrama de la técnica de inoculación directa para evaluar la actividad antimicrobiana	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición aproximada por cada 100 g de porción comestible de zanahoria	9
Tabla 2. Disolventes utilizados para la obtención de los extractos.	23
Tabla 3. Solventes utilizados para la cromatografía en columna	25
Tabla 4. Extractos que presentaron actividad contra la <i>Listeria Monocytogenes</i>	28
Tabla 5. Extractos que presentaron actividad contra <i>Vibrio cholerae</i>	28
Tabla 6. Extractos que presentaron actividad mediante la técnica de inoculación directa.	31
Tabla 7. Resultados de la técnica del bioscreen	32
Tabla 8. Tabla de coincidencias positivas para ambas técnicas.	33
Tabla 9. Concentraciones de las bacterias usadas en la técnica del bioscreen	57

ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de IR en película sobre CsI para la fracción F9	46
Espectro 2. Espectro de IR en película sobre CsI para la fracción C4	46
Espectro 3. Espectro de IR en película sobre CsI para la fracción X2	47
Cromatograma 1. Cromatograma de la fracción F1.	48
Cromatograma 2. Cromatograma de la fracción C4	49
Cromatograma 3. Cromatograma de la fracción X2	50

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado las plantas como fuente para controlar ciertas enfermedades infecciosas. Mediante diversas técnicas microbiológicas se ha obtenido una amplia gama de productos y extractos de plantas superiores con actividad contra algunos microorganismos asociados a enfermedades infecciosas.

En los alimentos de origen animal y vegetal es posible encontrar sustancias que tienen un efecto inhibitorio contra algunos microorganismos: las de origen vegetal podemos mencionar al eugenol del clavo, alicina del ajo, timol del orégano, etc. y de origen animal podemos hacer mención de los pépticos antimicrobianos como la cecropina A de la oruga, androctonina del escorpión, apidaecina de la abeja etc.

La medicina moderna, a través de los estudios clínicos, ha conseguido validar aquellas plantas que tradicionalmente se han utilizado a base del método de ensayo y error. Muchas resultaron ser válidas, otras demostraron ser inocuas, otras potencialmente peligrosas. Han sido precisamente los análisis bioquímicos los que han podido determinar cuales son los componentes principales de las plantas medicinales: los llamados principios activos.

En años recientes se han realizado diversos estudios de productos naturales relacionados con la evaluación antimicrobiana. Por lo que en este trabajo se realizó un estudio para determinar la actividad antimicrobiana de diferentes fracciones aisladas de la zanahoria (peridermis, floema y xilema), se utilizaron diversas técnicas microbiológicas para demostrar la actividad antimicrobiana de dichas fracciones frente a microorganismos patógenos para el hombre como lo son: *Vibrio cholerae*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, mediante las técnicas de difusión en pozo sobre placas de agar, método de sensidiscos, dilución en caldo (inoculación directa) y bioscreen. Por último, se realizaron pruebas para identificar

el componente activo de aquellas fracciones que demostraron actividad antimicrobiana.

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades acerca de la zanahoria

1.1.1 Historia

Las zanahorias se descubrieron hace 3000 años en Asia, en la región que hoy ocupa Afganistán (figura 1). Durante los primeros años de su cultivo, las raíces de la zanahoria eran de color violáceo. El cambio de éstas a su actual color naranja se debe a las selecciones ocurridas a mediados de 1700 en Holanda, que aportó una gran cantidad de caroteno, el pigmento causante del color y que han sido base del material vegetal actual.



Figura 1. Países donde se originaron las zanahorias.

Los griegos y los romanos utilizaron las zanahorias con propósitos medicinales. Durante la Edad Media la zanahoria servía como tinte para la mantequilla y en Francia la hoja se utilizaba para decorar peinados y sombreros. La primera referencia escrita de consumo de zanahorias data de unos escritos españoles del

siglo XII en los que se señala el consumo de zanahoria con aceite, vinagre y sal [1].

En el siglo XIX el descubrimiento de las vitaminas y en concreto de la vitamina A hizo que las zanahorias adquirieran una gran importancia en la alimentación sirviendo para la prevención de la ceguera nocturna. Por este motivo, durante la segunda guerra mundial a los aviadores británicos se les proporcionaban grandes cantidades de zanahorias en sus comidas, ya que la vitamina A presente en ellos también es buena para las uñas, el pelo y la piel [1].

Hoy en día todas las zanahorias descienden de la variedad holandesa anaranjada y su cultivo y consumo se extiende por el mundo entero [2].

1.1.2 Descripción de la planta

La zanahoria (figura 2) pertenece a la familia Umbelíferas, su nombre científico es *Daucus carota L.*, es una planta bianual erecta de hasta un metro de altura, con la raíz endurecida el segundo año y tallos ramosos de medio metro de altura. Posee hojas de sabor aromático y dividido en segmentos; flores blancas o sonrosadas agrupadas en umbelas compuestas, cuyo centro en la variedad silvestre es de color púrpura. Florece a partir de mayo y los frutos maduran en verano y otoño. [2]



Figura 2. Fotografía de zanahorias del tipo Chantenay

Su sistema radicular es una raíz napiforme, de forma y color variables. Tiene función almacenadora, y también presenta numerosas raíces secundarias que sirven como órganos de absorción. Al realizar un corte transversal se distinguen dos zonas bien definidas: una exterior, constituida principalmente por el floema secundario y otra interior formada por el xilema (figura 3). Las zanahorias más aceptadas son las que presentan gran proporción de corteza exterior, ya que el xilema es generalmente leñoso y sin sabor.

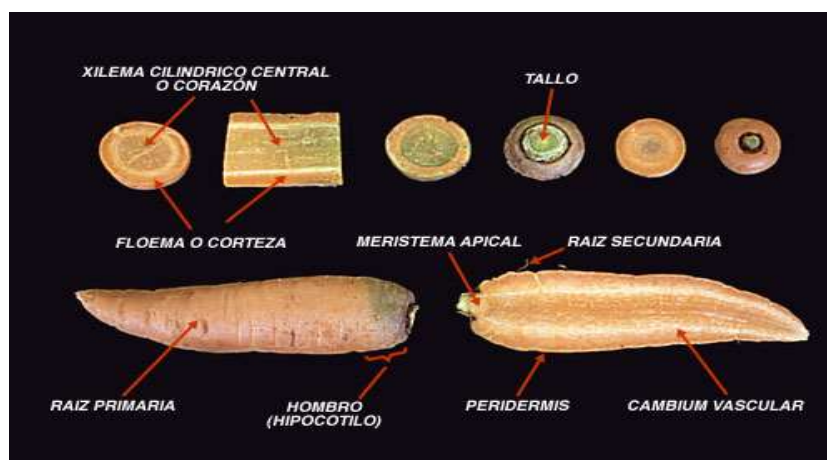


Figura 3.- Partes principales de la raíz de la zanahoria

A pesar de que hay diversos factores que señalan la diversidad en la especie, la forma de la raíz varía notablemente entre tipos. Esta característica es el criterio más habitual para agrupar los distintos cultivares de zanahoria disponibles. En la (figura 4) se detallan los principales tipos según la forma de la raíz, varios de los cuales toman el nombre de sus cultivares más representativos.

1.2 Propiedades de la zanahoria

Los principales compuestos presentes de la zanahoria son: en la raíz, glucosa y sacarosa, mucílagos y pectina, vitaminas (A, B1, B2, C, D, E, K), minerales y oligoelementos (cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, azufre, zinc, selenio, sodio), proteínas y sobre todo carotenos (provitamina A) del tipo alfa,

beta y gama, (que en el intestino se transforman en vitamina A o retinol); en las semillas, el aceite esencial contiene pineno, limoneno, carotol, daucol, p-cymol, dipenteno, geraniol, alfa y beta cariofileno, ácido isoburítico y asanona; por otra parte el jugo de zanahoria contiene azúcares cristalizables y no cristalizables, una pequeña cantidad de almidón, albumen, aceites volátiles (en los que recaen las propiedades medicinales) que son fragantes, aromáticos y estimulantes, jalea vegetal o pectina, ácido málico y un principio neutro, cristizable, de color rojo rubí, inodoro y sin sabor llamado carotina. Otras especies químicas presentes en la zanahoria son el ácido fólico y pequeñas cantidades de niacina, piridoxina, tiamina y riboflavina; contiene además ácidos caféico y ferúlico fundamentalmente, compuestos que han demostrado tener una importante acción antioxidante, así como cantidades menores de ácido clorogénico y *p*-cumárico. También aporta ciertas cantidades de fitoesteroles, siendo el mayoritario el beta-sitosterol, seguido del stigmasterol y campesterol, que tienen la capacidad de bloquear la absorción del colesterol, facilitando su excreción, y disminuyendo, por tanto sus niveles en sangre [3]. En la tabla 1 se muestra una composición aproximada de la zanahoria por cada 100 g [2].

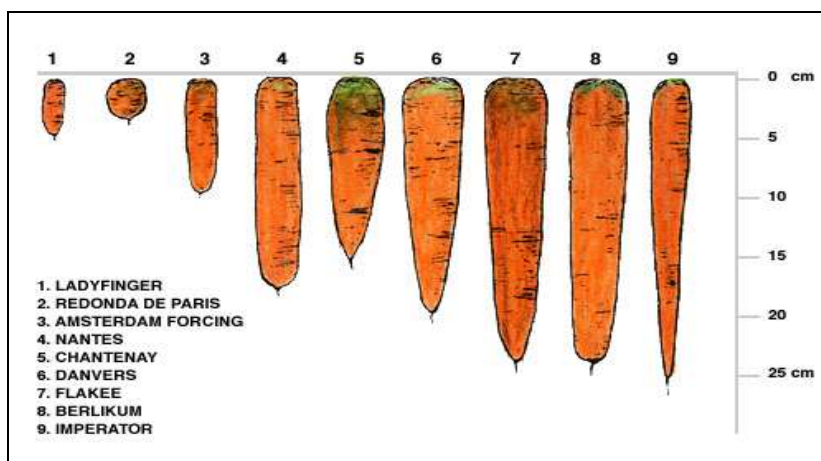


Figura 4. Tipos de zanahoria

Tabla 1. Composición aproximada por cada 100 g de porción comestible de zanahoria.

Constituyentes	Crudas
Agua	87.7 g
Grasas	0.19 g
Hidratos carbono	10,14 g.
Fibra	3 g
Potasio	323 mg
Fósforo	44 mg
Sodio	35 mg
Calcio	27 mg
Magnesio	15 mg
Vitamina C	9.3 mg
Vitamina A	28000 IU
Vitamina B 6	0.14 mg
Niacina	0.92 mg
Ácido fólico	14 mg
Energía Kcal	43 Kcal

Las zanahorias son ricas en carotenos, unos compuestos que el hígado transforma en vitamina A. Entre estos destaca el β -caroteno, el cual aparece en frutas y verduras de color anaranjado y verde fuerte, como las coles, las papas, las calabazas, los albaricoques y las espinacas, o en frutos como el mango y el melón. Parece prevenir la aparición de ciertos cánceres, especialmente el de pulmón y el de boca o impedir el desarrollo de células cancerosas. Su ingestión protege contra la acción destructiva de los radicales libres, agentes producidos por causas externas como la contaminación o por causas internas del propio organismo, que atacan las células produciendo enfermedades degenerativas, como un prematuro envejecimiento, la mala salud arterial o el cáncer [2]. Sin embargo, a pesar de todas sus bondades, estudios realizados en fumadores que tomaban suplementos de β -carotenos demostraron cómo la incidencia de cáncer de pulmón era mayor en ellos que en fumadores que no tomaban este componente. Todo indujo a los médicos a desaconsejar su ingesta por otro

procedimiento que no fuera a través de los alimentos. Así, no resulta prudente tomar este componente aislado o en combinación con otros suplementos vitamínicos hasta que se realicen estudios más concluyentes sobre el tema. De igual forma, se recomiendan cuidados con la ingesta de alimentos que contienen β -carotenos, ya que esto conlleva a una pigmentación amarillenta de la piel, especialmente en la palma de la mano, que disminuye a medida que se deja de comer estos alimentos en gran cantidad [4].

La zanahoria contiene también α -caroteno, cuyos niveles séricos se han relacionado con la presencia de enfermedad coronaria y formación de placa arterial. Otros carotenoides sin actividad pro vitamínica A están presentes en la zanahoria, entre los cuales se encuentra la luteína, cuya baja ingesta ha sido relacionada con bajos niveles en suero sanguíneo lo que ocasiona un mayor riesgo de infarto de miocardio, así como un riesgo más elevado de infarto cerebral [3,4].

La zanahoria suministra considerables cantidades de mucina, una sustancia que sirve como ungüento y lubricante para las membranas mucosas. El jugo posee importantes cualidades, algunas de las cuales comparte con las de otros vegetales, y otras son propias, pues es esencialmente alcalinizador, antiséptico, excelente para los desordenes digestivos, el adelgazamiento, erupciones cutáneas, acidosis, debilidad del cabello y ojos, y condiciones ulcerosas. Sus propiedades son ampliamente explicadas por los siguientes factores:

- Su capacidad para contrarrestar los ácidos y toxinas del organismo mediante el calcio, sodio, potasio, magnesio, etc.
- Su extraordinaria cualidad como fuente de vitaminas, particularmente de la vitamina A o antiinfecciosa.

En resumen, además de los compuestos con aporte nutricional, la zanahoria contiene sustancias bioactivas que son indispensables a largo plazo para la salud, intervienen ejerciendo un efecto protector del sistema circulatorio, reductor de la presión sanguínea, regulador de la glucemia y la colesterolemia, reductor del riesgo de cáncer y de la respuesta defensiva inmunitaria del cuerpo. Los poliacetilenos, carotenoides e isocumarinas están en el grupo de los compuestos bioactivos y tienen un papel significativo dentro de las propiedades de la zanahoria que promueven la salud. Los poliacetilenos del tipo falcarinol, falcarindiol, y falcarindiol-3-acetato son un grupo de compuestos biológicamente activos para un amplio rango de microorganismos [5]. Exteriormente puede utilizarse para curar los problemas de la piel, como eczemas, heridas o quemaduras solares. Es muy útil para paliar la acción destructiva de los rayos ultravioletas, motivo por el cual forma parte en la composición de muchos filtros solares [4].

1.3 Antimicrobianos en plantas

Los extractos de plantas se han utilizado desde hace siglos para el tratamiento de un gran número de procesos patológicos [6].

Probablemente una de las primeras drogas que se transformó en una droga moderna a finales del siglo XVIII, fue la digital (*Digitalis purpurea* L.), lo cual ilustra los principios de la farmacología moderna [7].

Posteriormente se inició la era de la quimioterapia moderna, cuando en 1928 Sir Alexander Fleming, evidenció que una sustancia producida por el hongo *Penicillium notatum* que había contaminado una placa con crecimiento de *Staphylococcus aureus*, inhibió el desarrollo de la bacteria. Desde ahí la quimioterapia tuvo un gran desarrollo con el descubrimiento de nuevos antibióticos casi siempre aislados, purificados y procesados industrialmente a partir de fuentes naturales [8].

En cuanto a las propiedades antimicrobianas de algunas plantas, estas se atribuyen fundamentalmente a algunos de sus componentes, entre los que destacan terpenos, aceites esenciales, cumarinas, fenólicos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas ácidos e isoflavonoides [6].

Por ejemplo los aceites esenciales se pueden aislar de diferentes partes de la planta:

- En las hojas (ajenjo, Albahaca, eucalipto, hierbabuena, mejorana etc.)
- En las raíces (azafrán, jengibre, valeriana sándalo, etc.)
- En el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.)
- En las semillas (anís, hinojo, comino, etc.)
- En el tallo (canela, carrapí, etc.)
- En las flores (árnica, lavanda, manzanilla, tomillo, etc.)

Los compuestos activos son usualmente terpenoides con la excepción del cinamaldehído; otros son compuestos fenólicos como timol, carvacrol y eugenol.

Estudios *in vitro* han demostrado que la mayoría de los aceites esenciales de las hierbas y especias inhiben el crecimiento microbiano así como la producción de toxinas, al dañar las propiedades estructurales y funcionales de las membranas [9]. Una gran variedad de bacterias, gram positivas, gram negativas, levaduras y hongos se ven afectadas por una amplia gama de aceites esenciales de plantas. Los ejemplos bien conocidos incluyen los aceites esenciales de la pimienta inglesa, almendra, laurel, alcaravea, clavo, cilantro, comino, ajo, pomelo, limón, mandarina, cebolla, orégano, romero, salvia, tomillo y nuez moscada [10].

El orégano (*Origanum spp.*) por ejemplo contiene timol y carvacrol y han sido divulgadas como agentes muy activos *in vitro* contra varios hongos micotoxigénicos y contra algunos agentes de enfermedades de cítricos [10].

El crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* fueron inhibidos por el aceite esencial del orégano en caldos de cultivo. Sin embargo, cuando estos aceites se probaron en alimentos tales como la berenjena y mayonesa se observaron reacciones tales como el incremento de pH, incremento de la temperatura y para el caso de las emulsiones separación del aceite usado [10].

Los extractos de especies de ajo inhiben el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus parasiticus*, *A. niger*, *A. flavus* y *A. fumigatus* y muchas otras, hongos deterioradores de granos, legumbres y alimentos procesados. El sinergismo entre la nisina y el extracto acuoso del ajo en la inhibición de *L. monocytogenes*. La actividad de los extractos del ajo durante el almacenamiento y al ser calentados; los extractos acuosos de jugo crudos son más activos que los extractos de etil acetato, éter, cloroformo o etanol [9].

El jugo de betabel presenta ligera actividad antimicrobiana contra grupos patógenos de *E. coli* enteroinvasivo, enteropatógeno, enterotixigénico y *S. Typhimurium* [9].

Otros estudios han reportado el efecto bactericida de la pimienta contra *S. aureus*, *Salmonella sp.*, *P. aeruginosa*, *Proteus sp.*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis.*, *Serratia sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.* y *Aspergillus flavus* [9].

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

Diversos estudios han demostrado que los alimentos ricos en pigmentos como el caroteno tienen la capacidad de eliminar las toxinas del organismo, disolver los cálculos biliares y prevenir ciertas enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y el envejecimiento celular debido a sus propiedades antioxidantes [11].

En los vegetales, las sustancias con efecto antimicrobiano pueden localizarse en diferentes partes, incluidas las hojas, tallos, semillas, frutos y raíces. Algunas de estas sustancias son constitutivas de los fluidos o tejidos, mientras que otras se generan en respuesta a infecciones y a ciertas condiciones de estrés provocadas por diversos factores. Estas sustancias antimicrobianas, pueden tener efecto variado sobre los microorganismos; algunas muestran un amplio espectro de inhibición, otras solo afectan a ciertos grupos, Gram positivas o Gram negativas; por ejemplo, diversos estudios han demostrado que las verduras como la col, el rábano, la coliflor, espinacas o col de Bruselas, generan sustancias antimicrobianas; principalmente derivados del ácido hidroxicinámico [11].

Es común entre las plantas de la familia *Umbelleferae* como el perejil, el apio y las zanahorias y *Rutaceae*, como la toronja, limas y naranjas, la producción de fitoalexinas, algunas de ellas del grupo de las furocumarinas. La producción de éstas sustancias se incrementa cuando estos vegetales entran en una condición de estrés por efecto de factores ambientales (cambios en la temperatura o exposición a iones metálicos) o microbianos (infección por bacterias u hongos). Otros compuestos naturales con actividad antimicrobiana incluyen las antocianinas, algunos derivados de las clorofilas, glucósidos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico y la cafeína [11].

Recientemente se ha observado que la zanahoria puede generar sustancias que afectan la viabilidad o desarrollo de microorganismos con importancia sanitaria: es así que los extractos de especias o verduras como la zanahoria podrían ser una alternativa de antimicrobianos naturales con aplicación en los alimentos [11].

Específicamente se ha observado un efecto germicida del jugo de zanahoria contra *Listeria monocytogenes* y aunque hasta hace tiempo se había sugerido que las fitoalexinas podrían ser las responsables de este efecto antimicrobiano, en la actualidad esto es severamente cuestionado [12]. Las fitoalexinas que se han identificado en la zanahoria son la 6-metoximeleina, eugenina, miristicina,

falcarinol y el falcarindiol, destacando como biológicamente activa la 6-metoximeleina, a la que investigaciones recientes le han atribuido además una actividad anticarcinogénica así como una acción preventiva en la coagulación de la sangre [13].

Por otro lado, Beuchat y Brackett observaron también el efecto antimicrobiano de la zanahoria sobre el desarrollo de *Listeria monocytogenes*. Las zanahorias enteras, rebanadas, cocidas y en jugo fueron inoculadas con *Listeria monocytogenes*. Después del periodo de incubación los resultados mostraron que en las zanahorias rebanadas y en el jugo había muy pocas poblaciones de *Listeria* en comparación con las zanahorias enteras y cocidas [14].

Un estudio realizado para evaluar la actividad antimicrobiana de la raíz de zanahoria contra las cepas de *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli*; mostró que los extractos alcohólicos inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo *Shigella flexneri* la cepa más sensible, mientras que el extracto acuoso únicamente mostró actividad sobre *Escherichia coli*. Debido a la naturaleza de los extractos que presentaron actividad es posible que el principio activo sea de carácter polar [15].

En otro estudio los extractos etanólicos de las zanahoria mostraron actividad antimicrobiana contra un amplio número de microorganismos; *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida lambica* y *Escherichia coli*. Se presume que dicha actividad podría ser debida a los componentes apolares. Los ácidos grasos saturados (ácido dodecanóico) y metil ésteres de ácidos grasos saturados (dodecanóico y pentanóico) fueron identificados y purificados de los extractos activos mediante cromatografía de gases acoplada a masas, los cuales pueden ser responsables de la actividad antimicrobiana [16].

En una reciente investigación se ha descubierto la presencia del ácido hexadecanóico, el cual es un ácido de cadena media-larga. La acción inhibitoria de estos tipos de ácidos no puede ser debida a su acción sobre el pH citoplasmático ya que no liberan suficientes protones. Las moléculas no disociadas de estos ácidos pasan muy rápidamente a través de las membranas biológicas. Su acción sería sobre la membrana, alterando su fluidez y estructura [17].

Debido a la discrepancia en cuanto al o los compuesto(s) causante(s) de la actividad antimicrobiana, el presente trabajo pretende contribuir a esta área del conocimiento analizando además la presencia de estos compuestos en las diferentes partes de la zanahoria (*Daucus Carota*).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Aislar, evaluar y caracterizar algunos compuestos con actividad antimicrobiana presentes en el jugo de cada una de las partes de la zanahoria (xilema, floema y peridermis).

2.2 Objetivos Particulares

1. Obtener los extractos de la peridermis, floema y xilema de la zanahoria
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de la peridermis, floema y xilema
3. Extraer y separar los compuestos presentes en los extractos activos mediante el empleo de técnicas cromatográficas convencionales.
4. Identificar algunos de los compuestos presentes en los extractos activos mediante métodos espectroscópicos.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología que se empleó para el desarrollo del proyecto se muestra en la figura 5, e involucra la compra, separación, molienda, obtención de extractos, evaluación de la actividad antibacteriana e identificación del compuesto con actividad antimicrobiana.

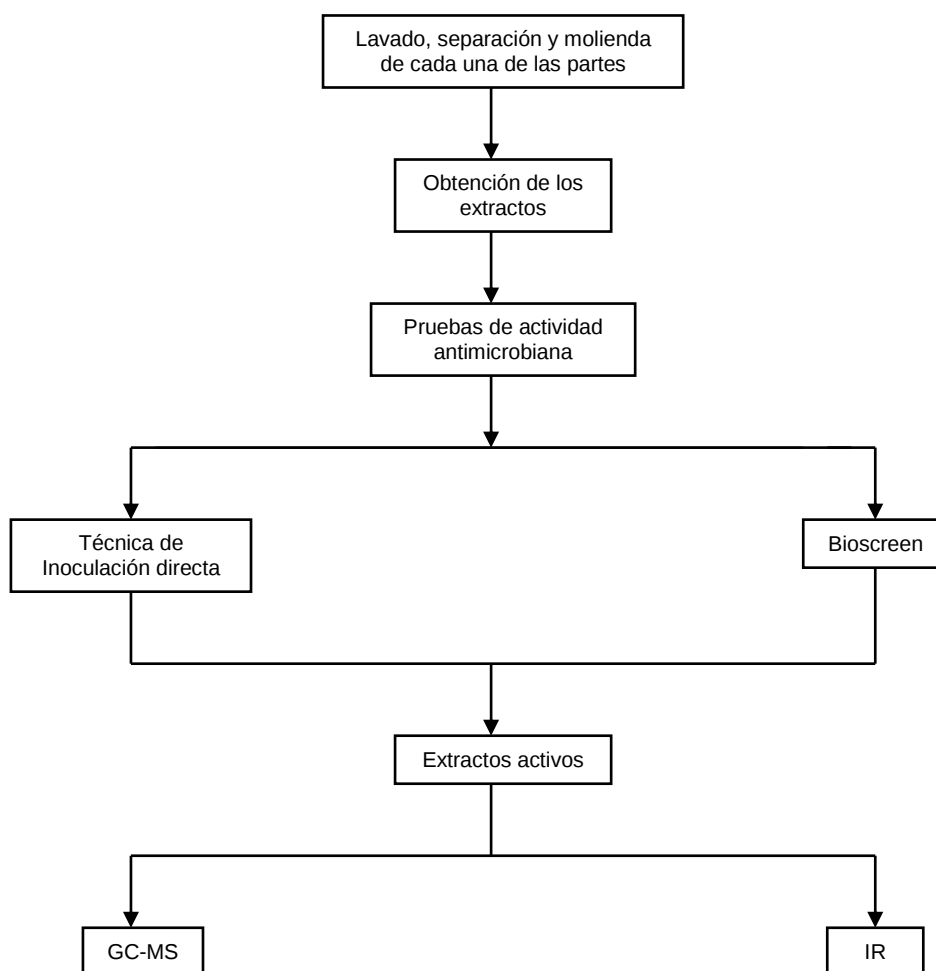


Figura 5.- Metodología seguida en este trabajo

3.1. Materiales, equipos y reactivos

Todas las soluciones acuosas se prepararon utilizando agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega/\text{cm}^{-1}$) obtenida de un desionizador marca Millipore, modelo Academia; los reactivos fueron grado analítico:

Reactivos

- Hexano (J.T.Baker 96%).
- Alcohol etílico absoluto (Técnica Química 99.02%).
- Metanol (J.T.Baker 99.9%).
- Acetona (Técnica Química 99.9%).
- Cloroformo 99%
- Acetato de etilo.
- Caldo Trypticaseína de soya o Mueller-Hinton
- Solución salina isotónica 0.85%
- Agar base sangre
- Etalon 0.5 Mc Farland
- Rifampicina 1g/100 mL MeOH
- Peptona caseína 1g en 1L.

Materiales y Equipos utilizados:

- Asa de Inoculación
- Tubos de ensayo estériles
- Pinzas Estériles
- Cajas petri
- Sensidiscos
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo a 35°C
- Refrigerador de $2-8^{\circ}\text{C}$
- Vortex
- Rotavapor

- Lámpara UV
- Embudo de separación.
- Placas Merck de sílica gel G F254, de 1x5 cm.

3.2. Obtención de los jugos de las diferentes partes de la zanahoria y almacenamiento.

Este trabajo comenzó con la búsqueda de zanahorias tiernas y frescas de color naranja vivo, sin manchas y que no estuvieran blandas lo cual es un indicio de que han comenzado a deteriorarse.

Se adquirieron aproximadamente 2kg de zanahorias tipo *chantenay*; se lavaron perfectamente y las raíces comestibles se separaron en sus partes: peridermis (cáscara), floema (parte carnosa debajo de la cáscara) y xilema (parte dura y fibrosa central de la zanahoria, también conocida como corazón de la zanahoria). Posteriormente se obtuvieron los jugos de cada una de las partes mediante la ayuda de un extractor previamente lavado y desinfectado; se almacenaron en frascos herméticos previamente esterilizados, resguardados de la luz y se mantuvieron en congelación por aproximadamente tres meses y no hubo descomposición.

3.3. Extracción de componentes antimicrobianos

3.3.1. Elección de los disolventes para la extracción de componentes antimicrobianos.

La elección del disolvente idóneo para la extracción se realizó de acuerdo a la siguiente metodología [18]:

Inicialmente se realizaron experimentos de cromatografía en capa fina para elegir los disolventes adecuados que permitieran fraccionar los componentes del jugo de las partes de la zanahoria. Así, en placas Merck de sílica gel G F254, de 1x5 cm.,

se trazó la línea de origen a un 1cm de la base de la placa se colocaron muestras de aproximadamente 3 mm de diámetro del jugo de las respectivas partes de la zanahoria y se desarrollaron con solventes de distintas polaridades (tabla 2), utilizando como reveladores yodo elemental, lámpara de luz UV a 264 nm y ácido sulfúrico.

Tabla 2. Disolventes utilizados para la obtención de los extractos

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

3.3.2 Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos se realizó el procedimiento siguiente [18]:

Se realizaron entre 6 y 7 extracciones sucesivas a 5 mL del jugo de las partes de la zanahoria (peridermis, floema y xilema) con porciones de 5 mL de disolvente. Posteriormente la fase orgánica se filtró, se concentró en el rotavapor para evitar que los restos de disolvente pudieran intervenir en los estudios antimicrobianos, y se refrigeró para evitar su descomposición. Algunos estudios se realizaron agregando 3mL de Tween 20 al 1% y en otros los extractos se evaluaron dejándolos en solución acuosa.

3.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos se seleccionaron 5 cepas obtenidas del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo: *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomona aeruginosa* (Bacterias Gram negativas), *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*

(Bacterias Gram positivas). Se mantuvieron en refrigeración en tubos de agar inclinado de soya y tripticaseína. Se consideraron estas bacterias por el nivel de seguridad biológica que requieren para su manejo, el cual es de 2, y que permite manipularlos en el laboratorio.

Para llevar a cabo los experimentos de evaluación antimicrobiana, se prepararon con 24 horas de anticipación suspensiones de bacteria de concentración 1×10^8 UFC/ml (células/mL) y sus diluciones de concentraciones diferentes dependiendo de la técnica a utilizar.

La mayoría de los métodos están basados en aquéllos que se utilizan para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos. Los métodos utilizados para evaluar la actividad de extractos de plantas sobre bacterias y hongos suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación [19].

Los métodos comúnmente utilizados en laboratorio por su sencillez y rapidez, son: la técnica de sensidiscos en agar, la cual es utilizada para generar datos cualitativos principalmente, y los métodos de dilución en medio líquido de cultivo y en agar; ambos métodos nos permiten conocer datos cuantitativos [19].

Las técnicas empleadas para evaluar la capacidad bacteriana fueron la técnica de difusión en discos, técnica de pozos, técnica de inoculación directa y la técnica de bioscreen. Estas se describen a detalle en el anexo 2.

3.5 Fraccionamiento de los extractos activos

3.5.1 Extracción líquido-líquido.

El jugo de las partes de la zanahoria (peridermis, floema y xilema), se sometió a 6 o 7 extracciones sucesivas líquido-líquido con acetona, en una relación de 5 mL de jugo con 5 mL de disolvente. El extracto se concentró y se disolvió en hexano

con la finalidad de evitar la presencia de los azúcares para posteriormente eluir a través de la columna. Todo se mantuvo en refrigeración para evitar su descomposición.

3.5.2 Cromatografía en columna.

Para la separación de los diversos compuestos se utilizó una columna cromatográfica de vidrio empacada con fase estacionaria C18 (Alltech, 1g de fase estacionaria).

Los pasos que se siguieron para la separación fueron los siguientes:

- ✓ Obtención del concentrado de los jugos extraídos con acetona
- ✓ Activación de la columna con 5mL de MeOH y posteriormente con 10 mL de H₂O desionizada.
- ✓ Elución de 0.5 mL de una mezcla del concentrado y 1 mL de hexano. Se empleó para la elución 1 mL de cada uno de los disolventes mostrados en la tabla 3, comenzando por el menos polar (hexano) hasta el metanol.
- ✓ Obtención y concentrado de las fracciones.

Tabla 3.- Solventes utilizados para la cromatografía en columna.

Fracción	Solventes	Polaridad
1	Hexano	1.90
2	Hexano:Acetato de etilo (9:1)	2.31
3	Hexano:Acetato de etilo (8:2)	2.72
4	Hexano:Acetato de etilo (7:3)	3.13
5	Hexano: Acetato de etilo (6:4)	3.54
6	Hexano:Acetato de etilo (5:5)	3.95
7	Acetato de etilo	6.0
8	Acetato de etilo:Etanol (7:3)	11.58
9	Acetato de etilo:Etanol (4:6)	17.16
10	Acetato de etilo:Etanol (1:9)	22.74
11	Etanol	24.6
12	Etanol:Metanol (7:3)	27.03
13	Etanol:Metanol (4:6)	29.46
14	Metanol	32.70

3.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de cada uno de las fracciones aisladas.

Las fracciones colectadas se concentraron, y según su polaridad se solubilizaron en solución salina isotónica o en mezcla de tween 20 al 1% con agua y fueron sometidas a evaluación antimicrobiana mediante las técnicas de sensidiscos, pozos, inoculación directa y bioscreen contra las bacterias *Listeria Monocytogenes*, *Pseudomona aureoginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* y *Vibrio Cholera*.

3.7 Caracterización de los compuestos con actividad antimicrobiana.

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

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de componentes antimicrobianos

Con los jugos así obtenidos, se realizaron extracciones con diversos disolventes, elegidos previamente mediante un estudio por cromatografía en capa fina los cuales se muestran en la tabla 2 con su respectiva polaridad. Los solventes anteriormente mencionados mostraron una buena separación de los compuestos presentes en el jugo de cada fracción, por lo que se procedió a realizar la extracción líquido-líquido con cada uno de ellos y posteriormente someter a evaluación antimicrobiana cada uno de los extractos.

4.2 Evaluación antimicrobiana

4.2.1 Técnicas para la evaluación antimicrobiana

Con los diferentes extractos obtenidos se realizaron las pruebas de actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco, técnica de pozos y técnica de inoculación directa, arrojando los resultados que se muestran en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Extractos que presentaron actividad contra la *Listeria Monocytogenes*

Técnica	Peridermis	Xilema	Floema
Inoculación Directa	Acetona EtOH:Acetona(1:1)	Acetona EtOH:Acetona(1:1)	EtOH:Acetona (1:1)
Pozos	-	EtOH	-
Sensidiscos	-	-	-

Tabla 5. Extractos que presentaron actividad contra *Vibrio Cholerae*

Técnica	Peridermis	Xilema	Floema
Inoculación Directa	Acetona	Acetona:EtOH (1:1)	Acetona:EtOH (1:1)
Pozos	-	EtOH	-
Sensidiscos	-	-	-

En la técnica de discos en un principio los extractos fueron disueltos en una solución de Tween 20 al 1%. Sin embargo, transcurridas las 24 horas de incubación no se observó ningún halo de inhibición ya que los extractos no inhibieron el crecimiento microbiano. Para eliminar la posible interferencia de la solución de Tween 20, se realizaron los mismos experimentos pero utilizando los extractos concentrados del jugo de zanahoria disueltos en agua desionizada.

Después del tiempo de incubación nuevamente ninguno de los extractos presento inhibición. Como conclusión podemos tener que quizá las partículas suspendidas en los extractos se queden impregnados sobre el disco de papel filtro y por lo tanto no difunden hacia el agar. Otra posibilidad es que algún componente de las soluciones (como el Tween 20) interfieran en la acción de los extractos, pero las causas exactas aún no han sido establecidas.

Los resultados presentados en las tablas 4 y 5 muestran que la fracción de acetona inhibe completamente el crecimiento de ambas bacterias, por lo que se pensó que los compuestos responsables de dicha actividad tienen una polaridad semejante a la de la acetona.

4.3 Cromatografía en columna

Con los jugos obtenidos, se realizaron extracciones con acetona como disolvente, elegido de acuerdo a estudios reportados previamente [18]. Así, se realizaron 6 extracciones de 5mL de acetona con 5mL de jugo; posteriormente los extractos se concentraron para eliminar por completo el disolvente. La figura 6 muestra las imágenes de cada extracción con acetona las cuales se mencionan en el apartado 3.5.2. Es interesante notar que en la fracción 2 en todos los casos de la serie se distinguen cristales de color rojo, los cuales son muy probablemente carotenos.

Fracción de la zanahoria	Extracciones con acetona
Peridermis	
Floema	
Xilema	

Figura 6. Extracciones con acetona de cada fracción de la zanahoria

El concentrado de cada una de las extracciones con acetona se fraccionó eluyéndolo por la columna C18 siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5.2 (tabla 3). Posteriormente cada fracción se concentró y se realizaron pruebas para determinar su actividad antimicrobiana, mediante la prueba de inoculación directa y bioscreen con el fin de que la bacteria esté en contacto directo con la muestra.

4.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de cada uno de los compuestos aislados por inoculación directa.

Las cepas empleadas para la prueba fueron las siguientes: *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Los resultados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6.- Extractos que presentaron actividad mediante la técnica de inoculación directa*.

Cepa	Fracción activa	% de inhibición
<i>Vibrio cholerae</i>	C7	90
<i>Salmonella Typhimorium</i>	C11	90
<i>Listeria monocytogenes</i>	F8	90
<i>Staphylococcus aureus</i>	F9	50
	X2	90
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	C4	50
	F1	90

* C=Peridermis; F=Floema; X=Xilema.

Para obtener el porcentaje de inhibición se hizo a simple vista ya que el extracto se consideró activo cuando no hubo desarrollo del microorganismo, en caso contrario, el extracto se consideró inactivo. La metodología empleada en esta técnica se muestra en el anexo 2.

4.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos por la técnica del bioscreen

Con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos por la técnica de inoculación directa, los extractos igualmente se evaluaron utilizando la técnica de bioscreen. Las gráficas de crecimiento bacteriano obtenidas por la técnica proporcionan un reflejo claro de la actividad antibacteriana cuando se compara el comportamiento de un control contra las muestras a evaluar. De esta forma, se dice que una fracción tendrá actividad antimicrobiana si su densidad óptica (la cual

es proporcional al desarrollo de microorganismos) es menor a la del control. Un ejemplo de estos gráficos se muestra en la figura 7, mientras que en la tabla 7 se presentan los resultados para todas las cepas.

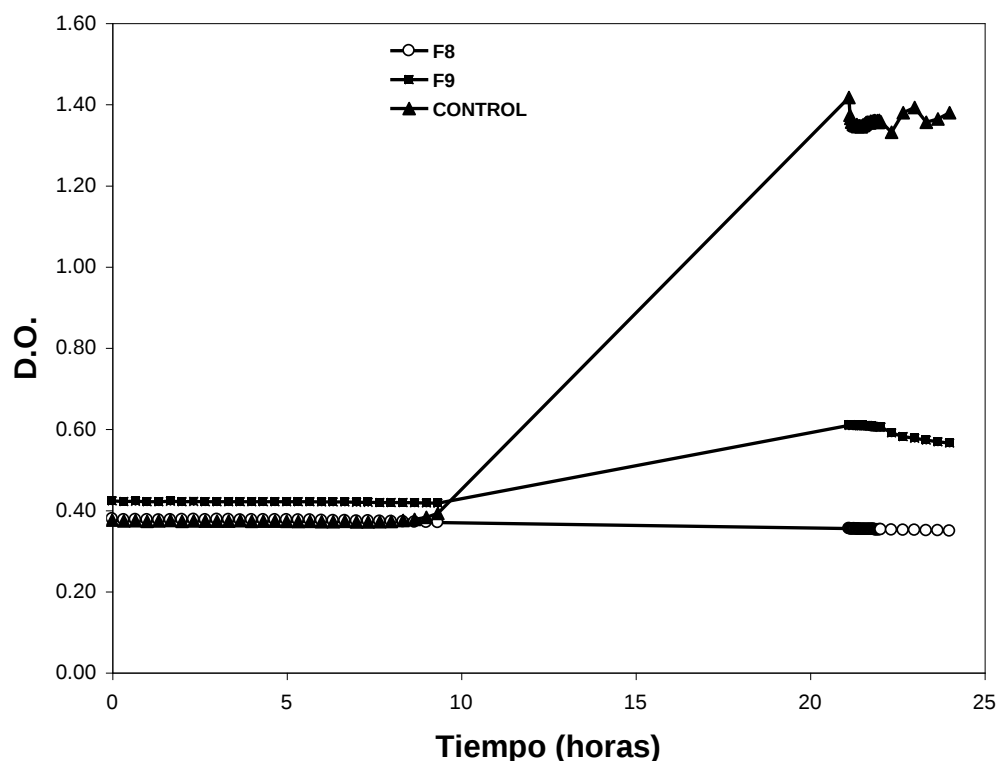


Figura 7. Cinética del crecimiento microbiano de las fracciones F8 y F9 activas contra *Listeria Monocytogenes*

Tabla 7. Resultados de la técnica del bioscreen

Cepa	Fracción activa
<i>Vibrio cholerae</i>	F1, F9, X1, X3, X4, X5, X6, X7, X8, X9, X10, X11
<i>Salmonella Typhimorium</i>	C11
<i>Listeria monocytogenes</i>	F3, F4, F5, F7, F8, F11, X3, X5, X6, X7, X10, X11
<i>Staphylococcus</i>	F9, X2
<i>Pseudomona Aeruginosa</i>	C4, F1

En la figura 7 muestra que las fracciones F8 y F9 son activas contra las bacterias bajo estudio debido a que su densidad óptica es mucho menor que la del control (blanco-medio de cultivo más la bacteria), es decir durante el transcurso del tiempo la densidad óptica del control aumenta progresivamente indicando el crecimiento del microorganismo, mientras que la densidad óptica de las fracciones ensayadas permanece constante lo cual indica que no hay crecimiento del microorganismo.

Por último, en la tabla 8, se muestran las coincidencias positivas por ambas técnicas de evaluación antimicrobiana (inoculación directa y bioscreen).

Tabla 8. Tabla de coincidencias positivas para ambas técnicas

Cepa	Fracción activa
V. cholerae	-
Salmonella Typhimorium	-
Listeria monocytogenes	-
Staphylococcus	F9, X2
Pseudomona Aeruginosa	C4, F1

Con base en la tabla 8 se procedió a caracterizar únicamente los compuestos presentes en las fracciones que dieron resultados positivos por la técnica de inoculación directa y bioscreen, por ser los más confiables de los obtenidos en las pruebas antimicrobianas.

4.6 Caracterización de los compuestos con actividad antimicrobiana.

Las fracciones que mostraron actividad antimicrobiana tanto por inoculación directa y bioscreen fueron analizadas por diversas técnicas: espectroscopia de infrarrojo (IR) y espectrometría de masas, con el fin de identificar a la o las especies responsables de dicha actividad.

4.6.1 Espectroscopia de infrarrojo (IR)

4.6.1.1 Fracción 1 del floema (F1)

En el espectro de infrarrojo de esta fracción se observan bandas de absorción a 2925.53 cm^{-1} y 2855.12 cm^{-1} para el alargamiento de C-H y a 1452.92 cm^{-1} y 1455.63 cm^{-1} para las vibraciones de deformación angular de los grupos CH_2 . Otras bandas a 1377.59 cm^{-1} y 771.28 cm^{-1} se deben al balanceo de los grupos CH_2 y del grupo CH_3 y una banda en 1733.08 cm^{-1} que representa la vibración de tensión de C=O. Otra banda observada a 1270.66 cm^{-1} representa la vibración de tensión de C-O de ácidos carboxílicos. La banda 2322.84 cm^{-1} es la correspondiente al cloroformo ya que fue el disolvente utilizado para la espectroscopia de infrarrojo (figura 10).

4.6.1.2 Fracción 9 del floema (F9)

El análisis de los datos para este espectro, muestra la presencia de bandas de absorción a 2997.01 cm^{-1} y 2926.67 cm^{-1} y 2855.97 cm^{-1} para el alargamiento y flexión C-H. A 1463.77 cm^{-1} y 1379.51 cm^{-1} para las vibraciones de deformación angular de los grupos CH_2 . A 1379.51 cm^{-1} , 741.64 cm^{-1} y 771.08 cm^{-1} se deben al balanceo de los grupos CH_2 y del grupo CH_3 . Otras bandas presentes son las correspondientes a una banda de absorción ancha a 3368.13 cm^{-1} correspondiente a la tensión de O-H, otras a las del alargamiento C=O a 1729.86 cm^{-1} y otra banda observada a 1273.79 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión de C-O de ácidos carboxílicos, a 1072.84 cm^{-1} y 1123.42 cm^{-1} debido a la vibración de tensión C-OH en alcoholes (espectro 1, anexo 1).

4.6.1.3 Fracción 4 de la peridermis (C4)

Las bandas de absorción características de este espectro se observan a 2924.91 cm^{-1} y 2854.38 cm^{-1} las cuales representan el alargamiento C-H y a 1453.74 cm^{-1} y 1378.94 cm^{-1} para las vibraciones de deformación angular de los grupos CH_2 ... Otras bandas a 1378.94 cm^{-1} y 726.83 cm^{-1} se deben al balanceo de los grupos CH_2 y del grupo CH_3 . Otra banda importante que se puede observar es la

correspondiente a la tensión O-H que se observa en 3361.38 cm^{-1} . Otro dato importante es la banda de absorción a 1732.58 cm^{-1} característica del alargamiento de C=O. Asimismo, se muestra una banda a 1276.22 cm^{-1} característica de la vibración de tensión de C-O de ácidos carboxílicos (espectro 2, anexo 1).

4.6.1.4 Fracción 2 del xilema (X2)

En este espectro se observan bandas a 2957.34 cm^{-1} , 2926.22 cm^{-1} y 2855.05 cm^{-1} que corresponden al alargamiento C-H y a 1453.57 cm^{-1} y 1379.47 cm^{-1} para las vibraciones de deformación angular de los grupos CH_2 . Otras bandas a 1379.47 cm^{-1} y 741.02 cm^{-1} se deben al balanceo de los grupos CH_2 y del grupo CH_3 . A 1731.68 cm^{-1} se observa la banda de alargamiento C=O y se muestra una banda a 1273.21 cm^{-1} característica de la vibración de tensión de C-O de ácidos carboxílicos. Otra banda a 1072.74 cm^{-1} y 1123.12 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión C-OH en alcoholes (espectro 3, anexo 1).

4.6.2 Espectrometría de masas

Del pico con mayor abundancia de los cromatogramas correspondiente para cada una de las fracciones activas, se obtuvieron los espectros de masas respectivos. Cabe señalar que no se hizo ningún proceso de purificación previo de las fracciones.

4.6.2.1 Fracción 1 del floema (F1)

MS (IE, 70 eV) m/z, 256(14.7), 227(2.94), 213(8.8), 199(5.88), 185(9.55), 171(11.76), 157(14.70), 129(32.35), 115(16.17), 97(19.11), 83(27.99), 73(94.11), 60(100). (Figura 12).

4.6.2.2 Fracción 4 de la peridermis (C4)

MS (IE, 70 ev) m/z, 256(52.23), 239(16.4), 213(10.44), 185(11.94), 171(10.44), 157(11.94), 129(20.89), 111(16.41), 102(92.53), 83(37.31), 71(58.20), 57(100). (Cromatograma 2, Anexo 1)

4.6.2.3 Fracción 2 del xilema (X2)

MS (IE, 70 ev) m/z, 256(50.7), 239(25.37), 213(10.44), 185(13.43), 171(13.43), 157(13.43), 129(20.89), 115(16.41), 102(88.06), 83(37.31), 71(44.77), 60(100). (Cromatograma 3 , Anexo 1)

4.6.3 Identificación de los compuestos con actividad antimicrobiana.

4.6.3.1 Ácido hexadecanóico

De acuerdo con la información obtenida a través del análisis espectroscópico de las fracciones, y de la comparación de los espectros con lo reportado en la literatura se estableció la posibilidad de que el compuesto con actividad antimicrobiana de las fracciones analizadas correspondiera con el ácido palmítico (ácido hexadecanóico, $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{14} \text{CO}_2\text{H}$) (figura 8).

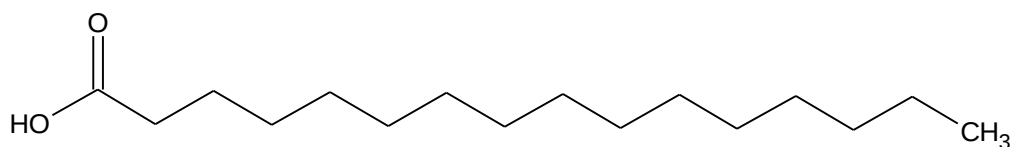


Figura 8. Estructura del ácido hexadecanóico

Así en las figuras 9 y 10 se muestran respectivamente los espectros de infrarrojo reportado y experimental para la fracción F1 del ácido hexadecanóico. Puede observarse que en ambos espectros están presentes las bandas características de absorción de los ácidos grasos, principalmente las que corresponden a la vibración de tensión de C-O de ácidos carboxílicos en la región de 1210 – 1320 cm^{-1} , vibración de tensión de C=O de ácidos carboxílicos (1700 – 1730 cm^{-1}), flexión de C-H en alcanos (2980-2850 cm^{-1}), deformación de CH_2 (1470-1450 cm^{-1})

y deformación del CH₂ (4 o más) (~720 cm⁻¹). Los espectros correspondientes a las fracciones F1, F9, C4 y X2 que fueron comparados con el espectro de IR reportado del ácido hexadecanóico se muestran en el anexo 1.

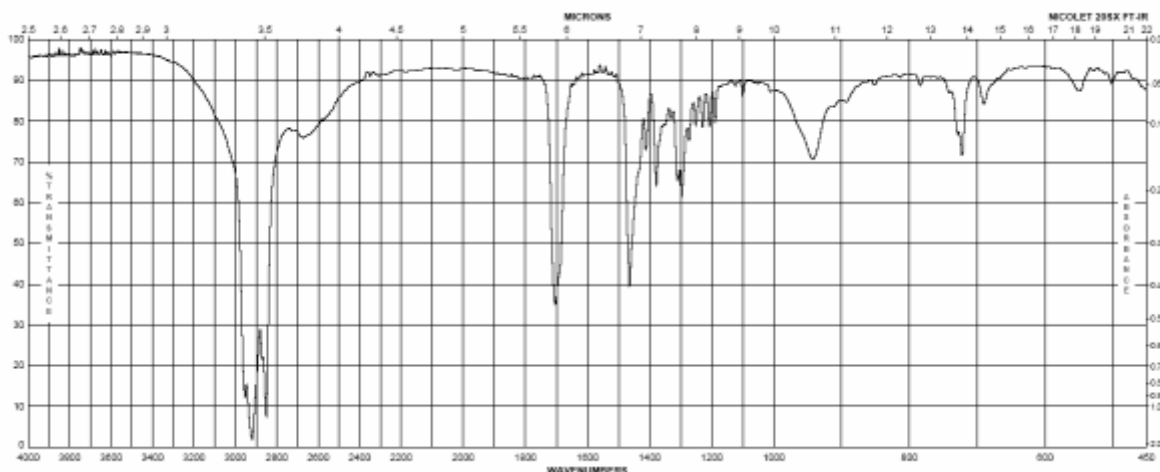


Figura 9. Espectro IR reportado para el ácido hexadecanóico. Datos obtenidos en:

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

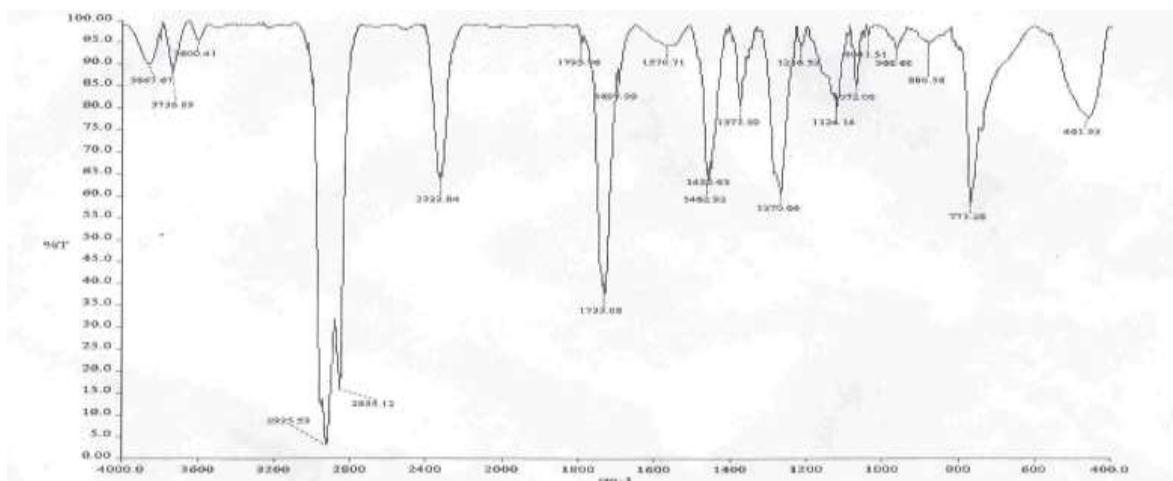


Figura 10. Espectro de IR para la fracción F1

De igual forma, al compararse los respectivos espectros de masas con el reportado en la literatura para el ácido palmítico (figura 11), se observa la coincidencia en un ión molecular (M⁺) de relación m/z de 256.

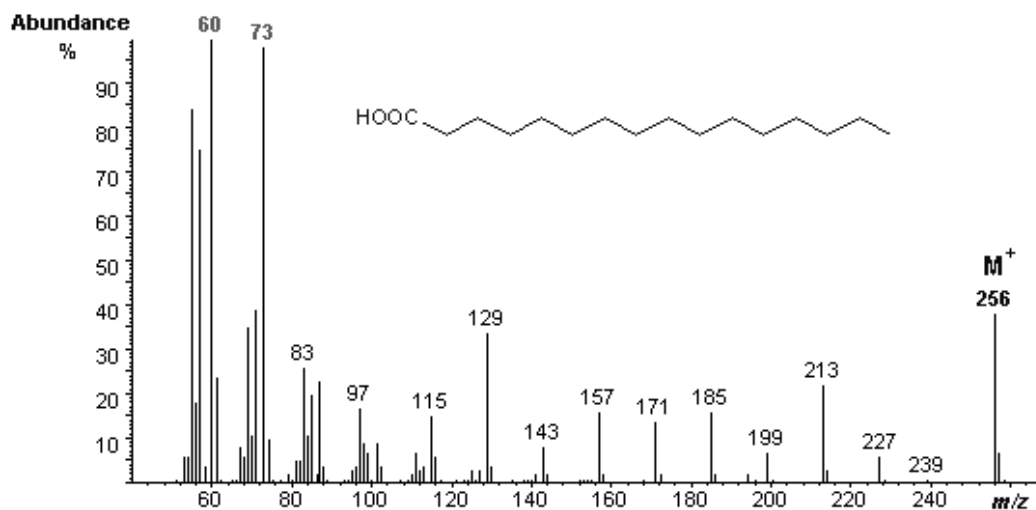


Figura 11. Espectro de masas reportado para el ácido hexadecanóico. Datos obtenidos en: <http://www.lipidlibrary.co.uk/ms/ms21/#top>

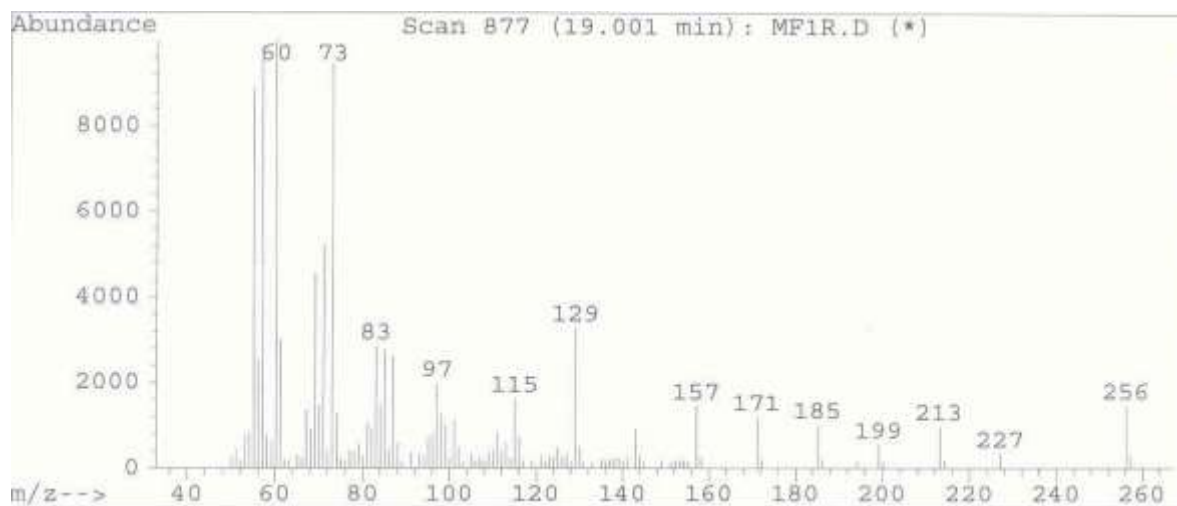
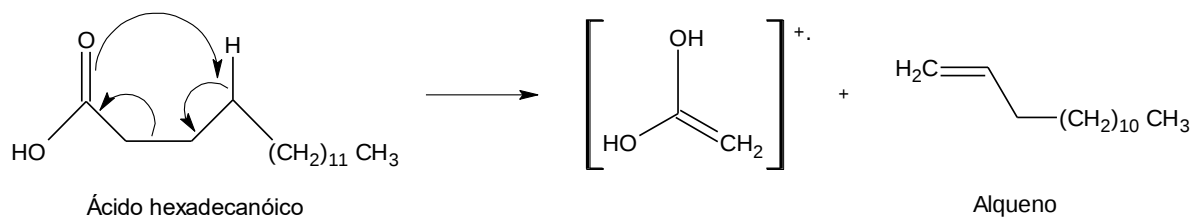
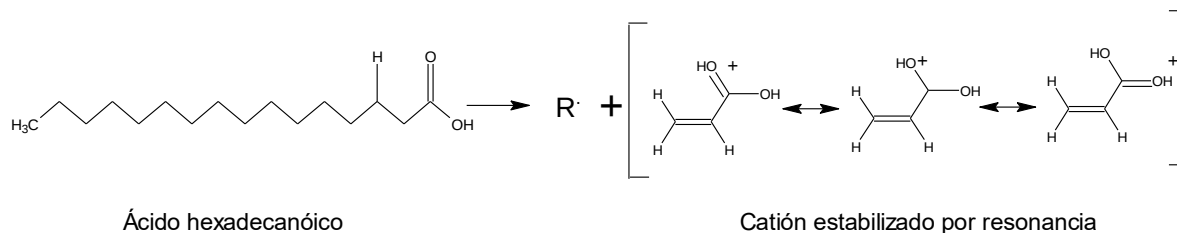


Figura 12. Espectro de masas para la fracción F1

En la figura 11 se representa el espectro de masas del ácido hexadecanóico. El pico base a m/z = 60 corresponde al fragmento obtenido por la pérdida de su alqueno, vía reordenamiento McLafferty (Figura 13). El pico fuerte a m/z = 73 corresponde a la pérdida de un radical con reordenamiento para dar lugar a un catión estabilizado por resonancia (figura 14).

**Figura 13.** Arreglo de McLafferty**Figura 14.** Pérdida de un grupo alquilo.

Cabe destacar que en los espectros de infrarrojo también están presentes otras bandas que pueden ser debidas a la presencia de agua y de otros compuestos que no fueron posibles de identificar debido a su menor concentración. Ante la posibilidad de la presencia de ésteres de ácidos grasos [18], se buscó en los espectros IR de las fracciones obtenidas la presencia de tres bandas características que indicaran la presencia del éster (1250 cm^{-1} , 1205 cm^{-1} y 1175 cm^{-1}); al realizar este análisis, dichas bandas no pudieron observarse en los IR's correspondientes.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. De entre las técnicas no instrumentales que resultó más eficiente para evaluar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos obtenidos fue la de inoculación directa ya que el extracto estaba en contacto directo con la bacteria y así se eliminan las posibles interferencias como el papel filtro en el caso de la técnica de sensidiscos.
2. El compuesto que presentó actividad antimicrobiana es afín a los disolventes con polaridad entre 11.58 – 17.16 principalmente. Debido a esto, el presente estudio se realizó con el fraccionamiento de dichos extractos hasta aislar, evaluar y caracterizar los antimicrobianos naturales presentes en la zanahoria.
3. En la caracterización de los compuestos presentes en el extracto activo del jugo se propuso al ácido hexadecanóico como el posible responsable de dicha actividad.
4. Basándose en los resultados obtenidos y presentados en este trabajo, se observa que los compuestos con mayor actividad antibacteriana se encuentran principalmente en el floema de la zanahoria (lo cual no era lo esperado, sino la peridermis ya que por ser la parte más expuesta al medio ambiente requiere altos contenidos de bactericidas naturales) en segundo lugar en el xilema y finalmente en la peridermis.

REFERENCIAS

Referencias

- [1]. Historia de las zanahorias. Disponible en: <http://www.herfruit.es/historia.html> (2006).
- [2]. Martínez V., El mundo de las plantas. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/zanahorias.htm> (1996-2006).
- [3]. Zanahoria (*Daucus carota* L.). Disponible en: http://www.alcentral.com.ar/fh_zanahoria.html (2008).
- [4]. Principios medicinales. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalesprincipios.htm> (1999-2008).
- [5]. U. Kidmose, S. L. Hansen, L. P. Cristensen, M. Edelenbos, R. Norbaek, J. *Food Sci.*, 69 (2004) 388-394.
- [6]. Shiva Ramayoni Carlos Martín, Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. (2007).
- [7]. P. Goldman. *Ann. Intern. Med.*, 135 (2001) 594-600.
- [8]. B. R. Santiago, E. Sada, R. H. Pando, V. Tsutsumi, *Salud Pública Méx.*, 48 (2006) 62-71.
- [9]. Mendoza Tolentino Angélica, Efecto antimicrobiano del extracto acuoso de un vegetal sobre microorganismos de importancia en alimentos. Licenciatura en Química en Alimentos (2008).

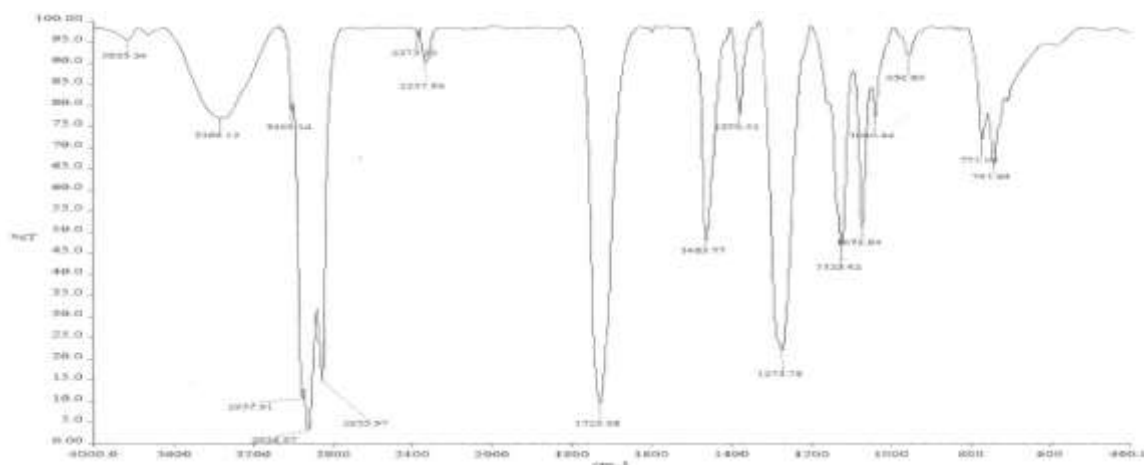
- [10]. S. Soller, *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Woodhead Publishing. (2003).
- [11]. Plantas curativas. Disponible en:
<http://webcolombia.com/plantascurativas/introduccion.htm> (2003).
- [12]. M. K. Larsen, L. P. Christensen, W. Vach, J. Hottinga, K. Brandt, *J. Agric. Food. Chem.*, 53 (2005) 1823-1827.
- [13]. S.G. Yates, and R.E. England., *J. Agric. Food. Chem.*, 30 (1982) 317-320.
- [14]. L.R. Beuchat, R.E. Brackett, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (1990), 1734-1742.
- [15]. Prevalencia de *Listeria monocytogenes*. Disponible en:
<http://www.ciad.mx/boletin/enefeb2003/DeteccionyPrevalenciadeListeria.pdf>
- [16]. Babic I., Nguyen-the C., Amiot M.J., *Appl. Bacteriol.*, 76 (1994) 141- 165.
- [17]. Ingredientes antimicrobianos. Disponible en:
<http://www.higienealimentaria.com/jornadalucta/ingredientes%20antimicrobianos.pdf> (2004)
- [18]. Martínez Ángeles Karemi, Aislamiento, evaluación y caracterización de fracciones antimicrobianas del jugo de zanahoria fresco y almacenado. Licenciatura en Química. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. (2006).
- [19]. K. A. Hammer, Carson, C. F. Riley., *J. Appl. Microbiol.*, 86 (1999) 985-990.

ANEXO 1

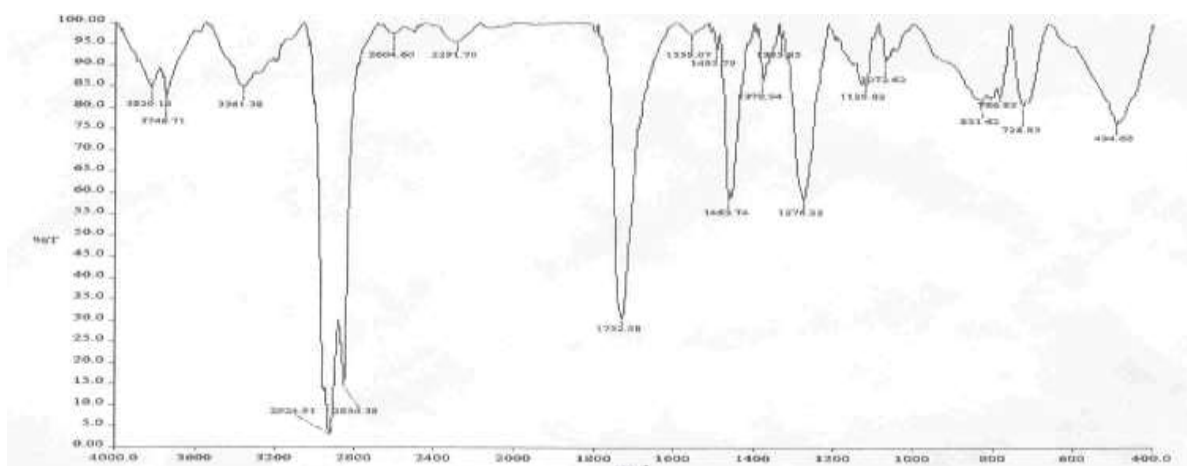
Anexo 1

Espectros de IR y MS para los extractos con actividad antimicrobiana

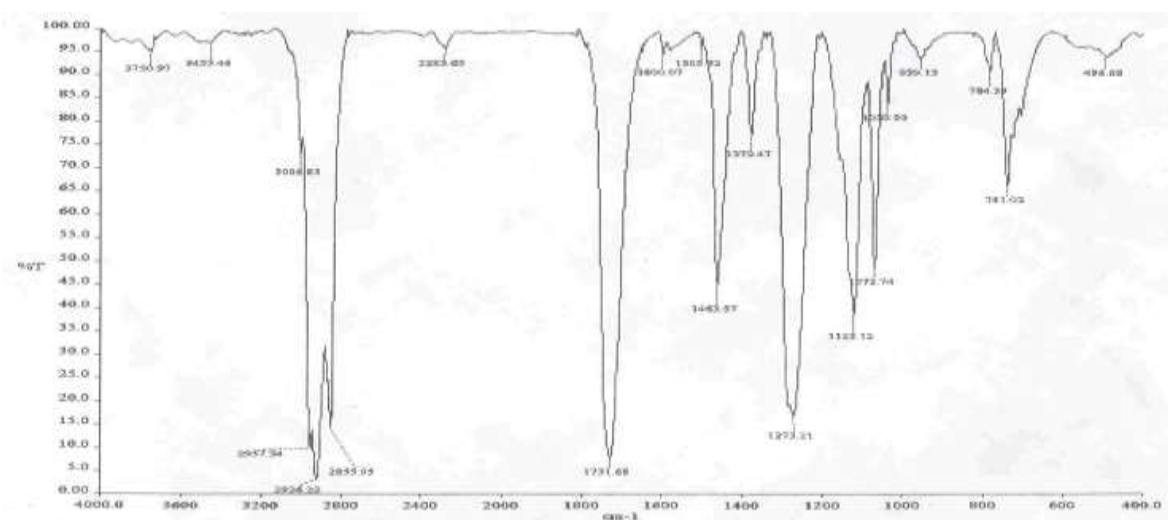
A.1.1 Espectros de IR



Espectro 1. Espectro de IR en película sobre CsI para la fracción F9

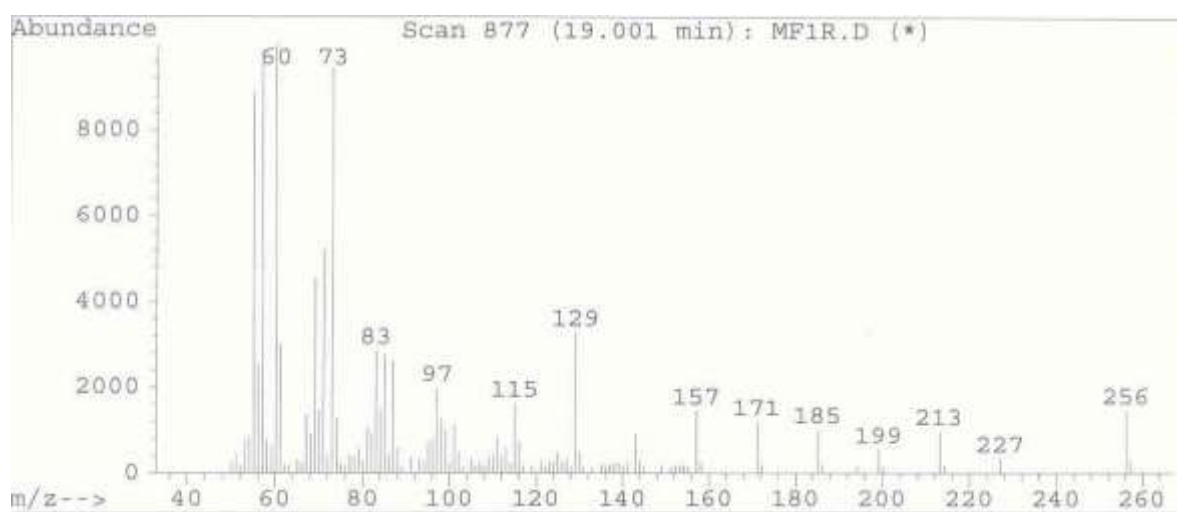
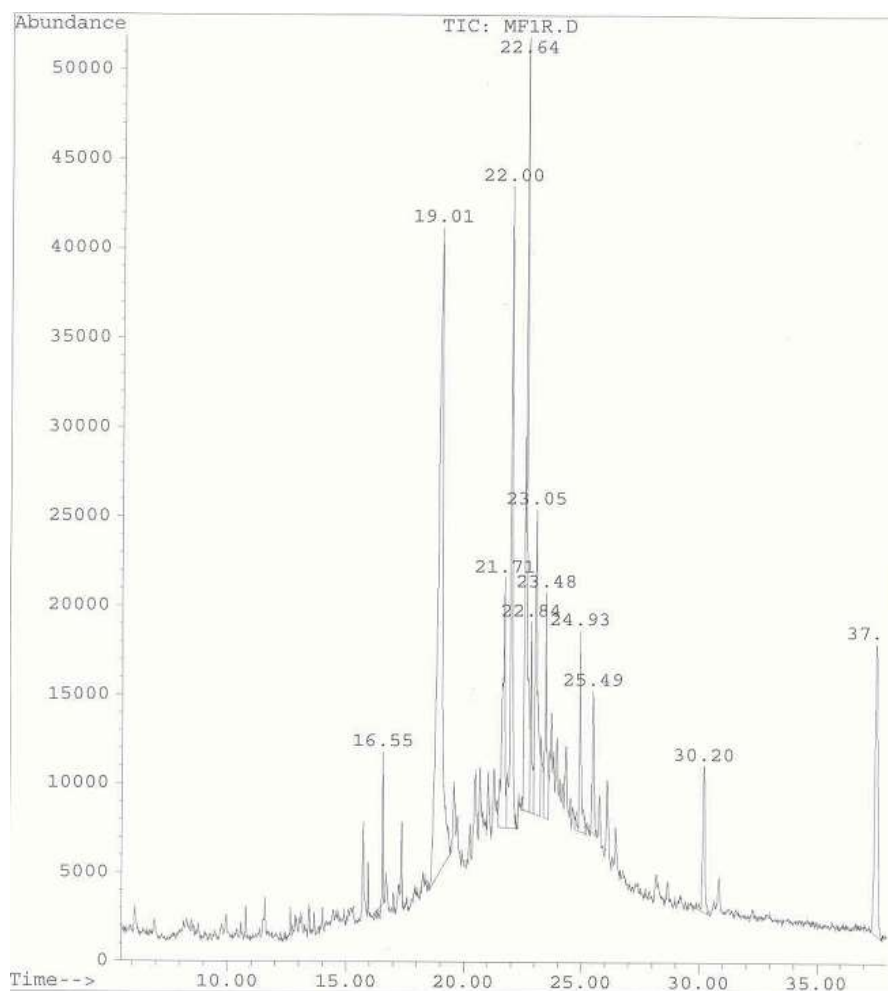


Espectro 2. Espectro de IR en película sobre CsI para la fracción C4

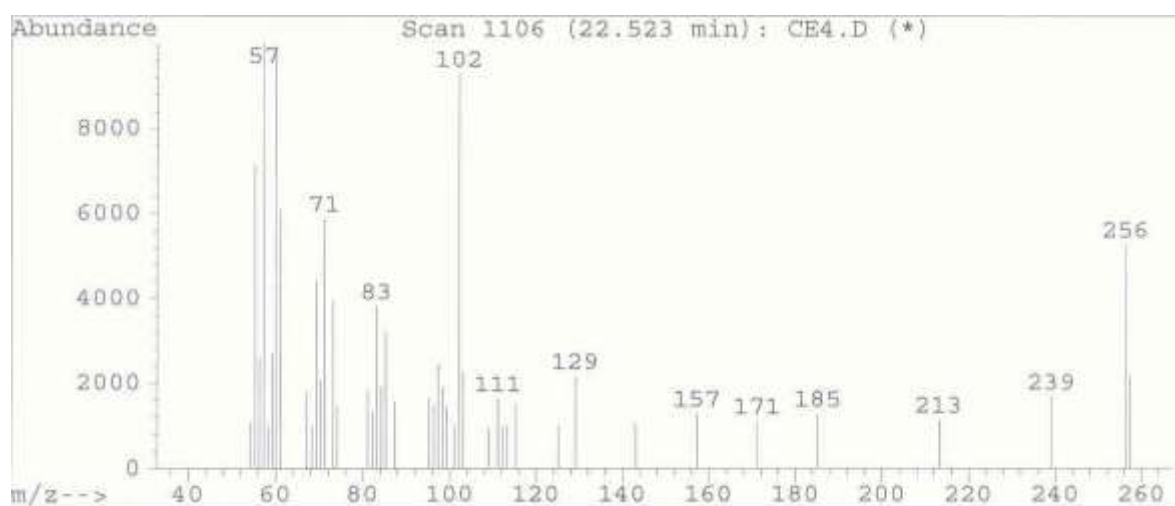
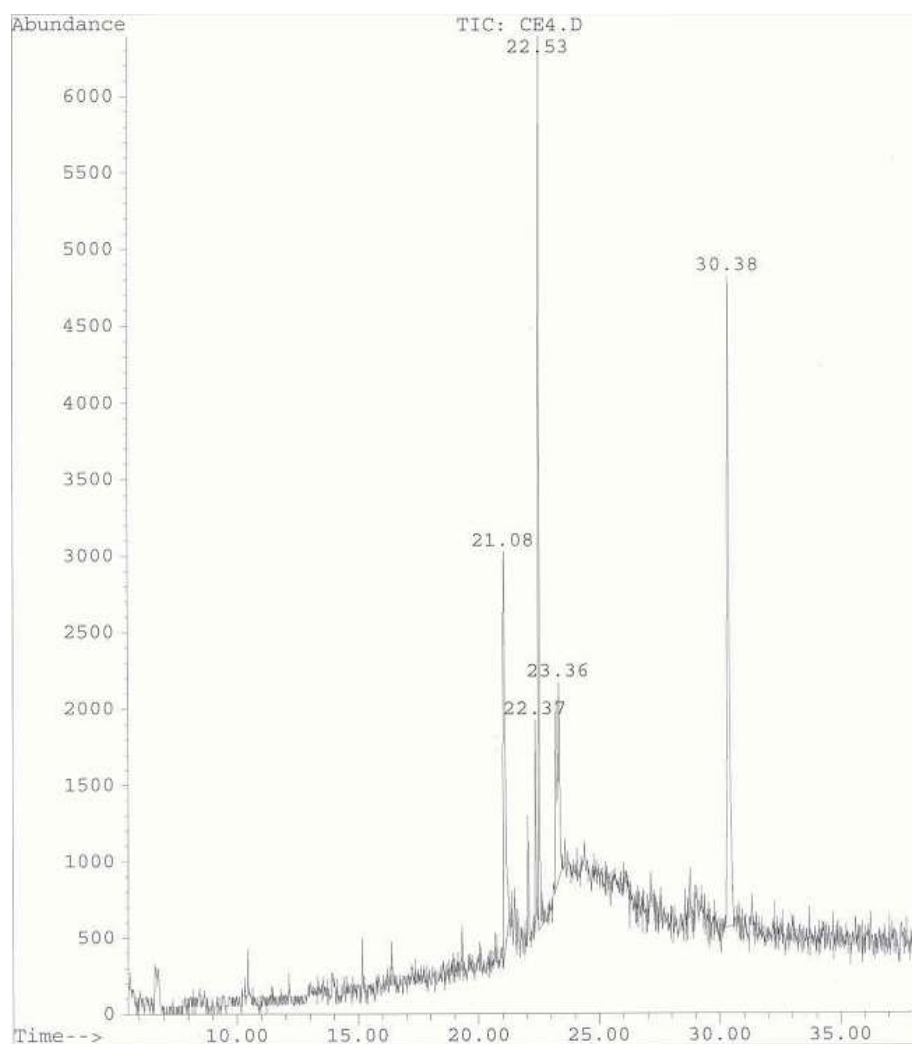


Espectro 3. Espectro de IR en película sobre CsI para la fracción X2

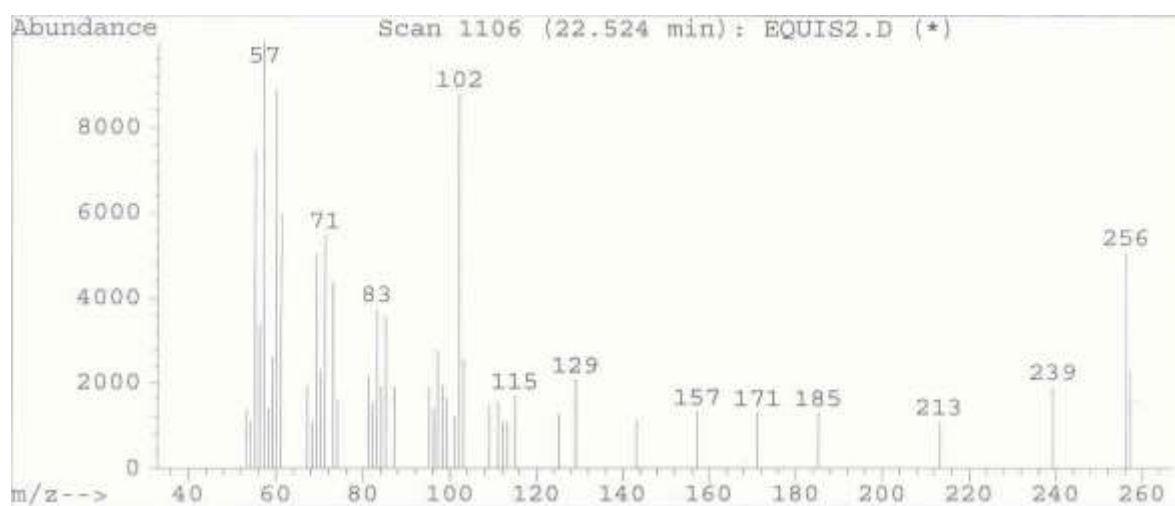
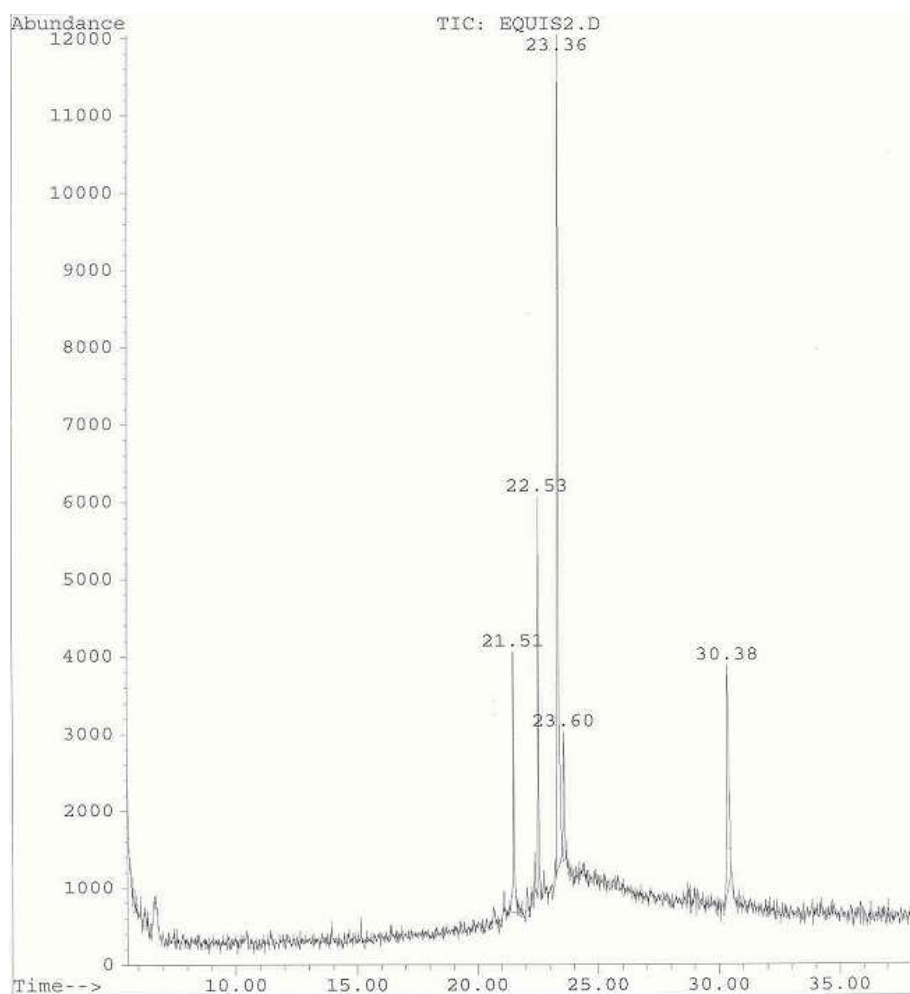
A.1.2 Cromatogramas



Cromatograma 1. Cromatograma de la fracción F1, obtenido en un GC-MS. Condiciones descritas en el apartado 3.7



Cromatograma 2 . Cromatograma de la fracción C4, obtenido en un GC-MS.



Cromatograma 3. Cromatograma de la fracción X2, obtenido en un GC-MS.

ANEXO 2

Anexo 2

Técnicas empleadas para la evaluación antimicrobiana

A.2.1 Preparación del inóculo

A partir de un cultivo puro de cada microorganismo, en un tubo inclinado conteniendo TSA se sembraron las cepas de prueba por estría cruzada en placas de TSA incubándose a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se seleccionaron de cuatro a cinco colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico de un cultivo en placa. Se tocó la superficie de cada colonia con un asa de siembra y la biomasa se transfirió a un tubo que contenía de 4 a 5 mL de caldo TSA y nuevamente se incubó a 37°C durante 18 horas.

Al observarse el crecimiento en medio líquido de los microorganismos de prueba, se procedió a ajustar la turbidez del inóculo con solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland (que equivale a tener una concentración de 1.5×10^8 células/mL), por comparación visual con el estándar, con el fin de estandarizar el inóculo de cada ensayo. Cabe aclarar que el nefelómetro de Mc Farland es un estándar de turbidez que permite estimar la concentración de bacterias en una suspensión. La metodología se muestra en la figura 15.



Figura 15.- Preparación del inóculo

A.2.2 Técnica de difusión en discos

Los experimentos para evaluar la actividad antimicrobiana comenzaron realizándose con la técnica más común y utilizada (por su sencillez, economía y rapidez) que es la de difusión en discos.

A.2.2.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo fue de TSA-rifampicina, el cual se preparó de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. Posteriormente a este medio se le adicionó rifampicina, el cual es un antibiótico que sirve para evitar la presencia de otros microorganismos en los medios de cultivo de los experimentos y posibles interferencias. Se colocó en cajas petri estériles con la finalidad de dejarlo enfriar [6].

A.2.2.2 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó partiendo de una solución salina de colonias aisladas de una placa de agar de 18 a 24 hrs. (agar base sangre). La suspensión se ajustó hasta 0.5 McFarland de turbidez [6].

A.2.2.3 Inoculación de las placas

En una caja petri estéril se vertió agar TSA con rifampicina (antibiótico) el cual se dejó enfriar un poco. Sobre la superficie del agar se adicionaron 100 µL de cada cepa (cada una en diferente caja) con una concentración de 1×10^4 células/mL, la cual se obtuvo mediante diluciones de la suspensión celular de 1×10^8 UFC/mL (células/ml) anteriormente preparada (figura 15). La suspensión se distribuyó perfectamente sobre la superficie con un asa de vidrio en forma de L para evitar excesos de densidad del inóculo y para quitar el exceso de humedad de la superficie antes de aplicar el disco con la muestra.

La finalidad de utilizar concentraciones tan bajas de bacteria fue para poder apreciar si inicialmente había inhibición. Adicionalmente se realizaron

experimentos con concentraciones más altas en donde no fue posible observar alguna inhibición.

A.2.2.4 Aplicación de los discos sobre las placas inoculadas

Posteriormente, los discos de papel filtro poroso de 0.5 cm. de diámetro se dispersan sobre la superficie del agar. Cada disco se presionó fuertemente para asegurar contacto pleno con la superficie del medio de cultivo (no se deben colocar mas de 12 discos en una caja petri). Finalmente, sobre dichos discos se colocaron 20μL del extracto de cada jugo previamente concentrados y disuelto en un poco de agua (Figura 16).

Las cajas se invirtieron y se incuban a 37°C durante 24 hr.

Después del tiempo de incubación, se procedió a la lectura de las placas donde se consideró un resultado positivo cuando se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco.

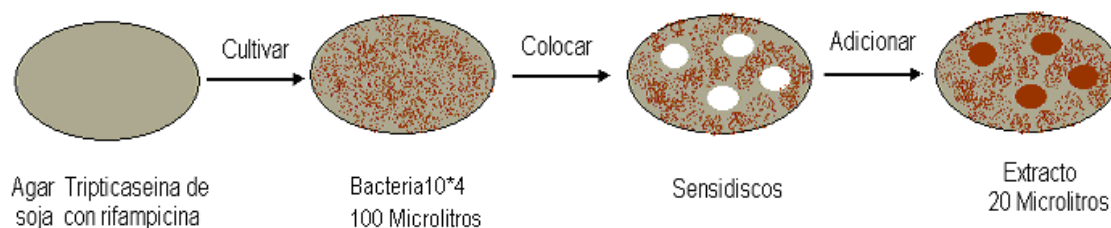


Figura 16.- Diagrama de la técnica de los sensidisks para evaluar la actividad antimicrobiana.

A.2.3 Técnica de Pozos

En esta técnica, es prácticamente igual que la de discos descrita anteriormente: se preparó una solución de concentración de bacterias igual a 1×10^4 UFC/mL; de esta solución se tomaron 100μL y se colocaron en una caja petri estéril. Sobre esta solución se adicionó el medio de cultivo de TSA con rifampicina y se mezcló todo perfectamente hasta que el medio de cultivo se gelificó y se realizaron pozos de

0.5cm de diámetro (la cantidad de pozos máxima es de 6). Finalmente, en cada pozo se adicionaron 100µL de cada uno de los extractos de los jugos de las diferentes partes de la zanahoria y se incubaron a 37°C durante 24 hr (Figura 17).

Después del tiempo de incubación, se procedió a la lectura de las placas donde se consideró un resultado positivo cuando se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco.

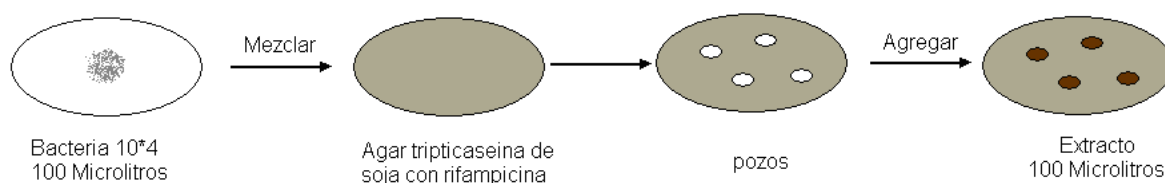


Figura 17.- Diagrama de la técnica de pozos para evaluar la actividad antimicrobiana.

A.2.4 Técnica de inoculación directa

Para llevar a cabo los experimentos mediante esta técnica, a 20 µL del extracto del jugo de zanahoria previamente concentrado, se le agregaron 100µL de la bacteria con una concentración de 1×10^4 UFC/mL en cada uno utilizando un vortex, se agitó la mezcla y se dejó en refrigeración durante 24 hr. Al siguiente día, esta suspensión extracto-bacteria, se colocó en una caja estéril y se mezcló con la solución TSA- rifampicina moviendo para que se mezclara perfectamente, finalmente se incubó esta mezcla a 37°C durante 24 hr (Figura 18).

Para obtener el porcentaje de inhibición se hizo a simple vista ya que el extracto se consideró activo cuando no hubo desarrollo del microorganismo, en caso contrario, el extracto se consideró inactivo.

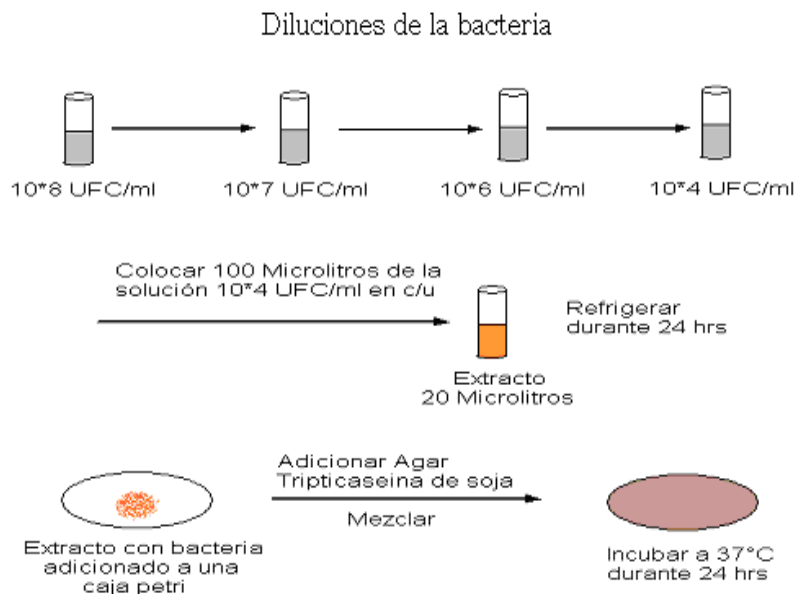


Figura 18.- Diagrama de la técnica de inoculación directa para evaluar la actividad antimicrobiana.

A.2.5 Técnica del bioscreen

Los extractos que mostraron actividad antimicrobiana mediante la técnica de inoculación directa se evaluaron mediante la técnica de bioscreen para seguir la cinética del crecimiento microbiano.

El bioscreen proporciona una medición de la densidad óptica, la cual indica el desarrollo de los microorganismos. La turbidez que presenta el caldo es proporcional al crecimiento de los microorganismos.

Para llevar a cabo la medición de la actividad antimicrobiana mediante esta técnica, los extractos se diluyeron en agua y en 0.5mL de solución salina isotónica, se colocaron en los pocillos de la microplaca y se les agregó 300μl de caldo TSA con rifampicina + 100μL del extracto de zanahoria correspondiente + 20μl de la bacteria con la concentración correspondiente para cada bacteria mostrada en la tabla 9. Posteriormente se encuba a 37°C durante 24 horas con un

pequeño precalentamiento de 5 min. Hasta llegar a la temperatura requerida, tomando la lectura de absorbancia en intervalos de 20 min. Dichas lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 600 nm. El control que se utilizó contenía caldo TSA, bacteria y rifampicina. Luego del tiempo del estudio, el *bioscreen* proporcionó los datos de densidad óptica de cada celda con los cuales se construyeron gráficas de crecimiento microbiano.

Tabla 9.- Concentraciones de las bacterias usadas en la técnica del bioscreen.

Bacteria	Concentración
<i>Vibrio cholerae</i>	1*10 ³ células/mL
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1*10 ⁴ células/mL
<i>Listeria monocytogenes</i>	1*10 ⁴ células/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	1*10 ⁴ células/mL
<i>Salmonella Typhimorium</i>	1*10 ⁴ células/mL

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Definiciones y Abreviaturas

Antibiótico: Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos.

Bioseguridad: Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del ambiente, frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánico.

Cepa: Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.

Colonia: Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.

Concentración inhibitoria mínima (CIM): Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cado de 18- 24 horas de incubación.

Escala de Mc. farland: Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de difusión de disco es 0.5

Esterilización: Proceso valido que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana incluyendo endoesporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos físicos, químicos o gaseosos.

Fitoalexinas: Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular producto del metabolismo secundario de las plantas. La producción de fitoalexinas es producido por el patógeno. Son compuestos químicos como los isoflavonoides y furocumarinas, entre otros.

Incubación: mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación.

Inóculo: Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.

Medio de cultivo: Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana *in vitro*.

Resistente (R): categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Las cepas bacterianas incluidas en esta categoría no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo, poseen comúnmente mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficiencia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada.

Sensidiscos: discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por difusión de disco.

Agar Soja Trypticaseína (TSA): Es un medio sólido, muy rico en nutrientes. Permite la multiplicación abundante y satisfactoria de gérmenes de desarrollo difícil y exigentes.

Toxinas: sustancias producidas generalmente por microorganismos (bacterias y hongos) con capacidad de provocar un cuadro patológico en animales y/o personas.

UFC: Unidad formadora de colonias