

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE VEGETALES  
FERMENTADOS CON *Rhizopus oligosporus* CONTRA BACTERIAS  
ENTEROPATÓGENAS.

Por

Q.F.B. ALEJANDRINA MONTES QUIROZ

Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Microbiología.

Enero, 2009

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS  
FERMENTADAS CON *Rhizopus oligosporus* CONTRA BACTERIAS  
ENTEROPATÓGENAS

Comité de tesis

---

Director de tesis: Dr. José Santos García Alvarado

---

Secretario: Dra. Norma Laura Heredia Rojas

---

Vocal: Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la dirección del Dr. J. Santos García A. y la codirección de la Dra. Norma L. Heredia R. y el Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna; mediante el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para el Proyecto “Conacyt” SEP-2004-C01-47128 a cargo del Dr. J. Santos García A.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN) por el apoyo que me brindaron al otorgarme una beca para la realización de mis estudios de maestría.

A la Dra. Norma L. Heredia y al Dr. José Santos García por la asesoría, atinada dirección y el apoyo en general en la elaboración de esta tesis.

A mis padres, tíos, primos y a mi abuela, quienes me han dado la fuerza y el valor para alcanzar mis objetivos. En especial a mi madre, quien no sólo es mi fuente de inspiración y fortaleza, sino también mi mejor consejera y amiga.

Un agradecimiento especial al M. C. Eduardo Sánchez, por todo su apoyo, por los comentarios a mi trabajo de tesis que la enriquecieron y por la revisión de la misma. Y gracias por su amistad.

A mis queridos amigos y compañeros en el laboratorio, quienes me brindaron una luz en momentos difíciles: M. C. Luisa Solís, M. C. Diana Valtierra, Q.F.B Emilio Carranza, Q.F.B Mayra Gómez, Q.B.P Sandra L. Castillo, M. C. Rosa María Casillas, M. C. Fabiola Venegas, Biól. Esteban Maldonado, Aldo G. Galván, Q.B.P Nereida Rivera, Alma Solís, Q.B.P Brenda del Ángel, Q.F.B Nidia Orué y Mayra Casas, quienes me ofrecieron su amistad y apoyo durante esta etapa de mi vida, además de contribuir a mi crecimiento profesional, personal y espiritual.

A la Dra. María de Jesús Duran y al Dr. Francisco Zambrano, quienes con sus consejos y enseñanzas me alentaron a seguir este camino.

A mis apreciadas amigas del bachillerato y la universidad: Q.F.B Selene Amezcua, Q.F.B Tanny R. Hernández y Q.F.B Laura G. Medina.

Y especial y sinceramente a Dios, por darme vida, salud, lucidez y fuerza para empezar a descubrir de lo que soy capaz de hacer.

## DEDICATORIA

El esfuerzo, el empeño y el amor a mi trabajo lo dedico a mi madre, quien aunque no siempre comprende mis sueños, los acoge, me alienta y me ayuda a pelear por ellos; a mi padre, que hoy alcanza uno de sus sueños conmigo; a mis tíos: Alejandra, Francis, Loren, Estela, Rafael, Rubí y Everardo, quienes piden a Dios por mi bienestar y mi pronto regreso; a mis primos: Daniel, Miletzi, Ulises, Iván y Kimberly, a quienes espero que sirva de inspiración para alcanzar las metas que se propongan; a mi abuelita Ángela, quien es mi segunda madre y que siempre ha velado por mí. Y a mi abuelo Jesús que yace junto al creador.

A mi muy querida amiga Diana, quien fue uno de mis mayores apoyos durante mi maestría y compañera durante las largas jornadas del trabajo experimental. Una persona a quien aprendí a querer, respetar y admirar por su carácter, decisión y tenacidad. Gracias Diana por todos tus consejos y tu amistad.

A mis amigos del laboratorio, con quienes pasé momentos muy divertidos y otros no tanto, y quienes me enseñaron tantas cosas útiles en este oficio y para la vida en general: M. C. Eduardo Sánchez, M. C. Luisa Solís, Q.F.B Emilio Carranza, Q.F.B Mayra Gómez, Q.B.P Sandra L. Castillo, M. C. Rosa María Casillas, M. C. Fabiola Venegas, Biól. Esteban Maldonado, Aldo G. Galván, Q.B.P Nereida Rivera, Alma Solís, Q.B.P Brenda del Ángel, Q.F.B Nidia Orué y Mayra Casas.

A Dios y a la Virgen de Guadalupe, que han estado siempre conmigo cuidándome y velando por mí.

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVO GENERAL.....	23

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
7. ANTECEDENTES.....	25
7.1 Fermentación. Generalidades.....	25
7.1.1 Papel de la fermentación en el procesamiento de alimentos.....	26
7.2 Fermentación en estado sólido. Generalidades.....	27
7.2.1 Aplicaciones.....	28
7.2.2 Ventajas y desventajas.....	30
7.2.3 Potencializador de la actividad antioxidante y antimicrobiana.....	31
7.3 Enfermedades transmitidas por los alimentos.....	31
7.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	33
7.3.1.1 Características generales.....	33
7.3.1.2 Listeriosis.....	34
7.3.2 <i>Salmonella enteritidis</i> serovariedad Typhimurium.....	35
7.3.2.1 Características generales.....	35
7.3.2.2 Enterocolitis.....	37
7.3.3 <i>Campylobacter jejuni</i> .....	37
7.3.3.1 Características generales.....	37
7.3.3.2 Campylobacteriosis.....	39
7.3.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	40
7.3.4.1 Características generales.....	40
7.3.4.2 Características de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	41
7.4 Uso de plantas: compuestos antimicrobianos de origen natural.....	42
7.5 Fenoles fitoquímicos: compuestos antioxidantes.....	44
7.5.1 Fuentes de antioxidantes.....	45
7.5.2 Actividad antimicrobiana de los fenoles.....	45
8. MÉTODOS.....	48
8.1 Colecta de vegetales y/o plantas comestibles.....	48



8.2 Obtención de extractos.....	49
8.3 Microorganismos, condiciones de cultivo y preparación del inóculo.....	50
8.4 Ensayos preliminares de la actividad antimicrobiana.....	51
8.5 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	52
8.6 Fermentación en estado sólido de vegetales con actividad antimicrobiana....	54
8.7 Extracción de compuestos fermentados.....	55
8.8 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos fermentados.....	55
8.9 Identificación de grupos químicos de los extractos.....	56
8.9.1 Hidrocarburos insaturados.....	56
8.9.2 Saponinas.....	56
8.9.3 Flavonoides.....	56
8.9.4 Sesquiterpenlactonas.....	56
8.9.5 Carbohidratos.....	57
8.9.6 p-benzoquinonas.....	57
8.9.7 Alcaloides.....	57
8.9.8 Cumarinas.....	58
8.9.9 Aldehídos y cetonas.....	58
8.9.10 Cloruros.....	58
8.9.11 Taninos.....	59
8.10 Determinación de fenoles totales.....	59
8.11 Análisis estadístico.....	59
8.12 Diagramas de flujo de los métodos utilizados.....	60
9. RESULTADOS.....	66
9.1 Ensayos preliminares de la actividad antimicrobiana.....	66
9.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	76
9.3 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos fermentados.....	77
9.4 Identificación de grupos químicos de los extractos.....	81

9.5 Determinación de la concentración de fenoles totales.....	85
10. DISCUSION.....	86
11. CONCLUSIONES.....	96
12. LITERATURA CITADA.....	98
13. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	114

## LISTA DE TABLAS:

Tabla	Página
1. Papel que juega la fermentación en el procesamiento de alimentos.....	26
2. Ejemplos de la utilización de la fermentación en estado sólido.....	28
3. Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido.....	30
4. Plantas analizadas.....	48
5. Preparación de la placa multipozos para la determinación de la CMB.....	53
6. Activación de cepas bacterianas empleadas.....	61
7. Efecto antimicrobiano de extractos de plantas comestibles (hojas, semillas, tallos, frutos y raíces) mediante el método de difusión en pozo en agar sobre el crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> 5653, <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43894, <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 y <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.....	67
8. Concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos etanólicos seleccionados contra <i>C. jejuni</i> 5653, <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894, <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>L. monocytogenes</i> Scott A.....	76
9. Comparación de la CMB del extracto de fresa durante los días 0, 4, 8, 12 y 16 de la fermentación en estado sólido con <i>R. oligosporus</i> , contra cuatro cepas enteropatógenas.....	78
10. Comparación de la CMB del extracto de ciruela durante los días 0, 4, 8, 12 y 16 de la fermentación en estado sólido con <i>R. oligosporus</i> , contra cuatro cepas enteropatógenas.....	79
11. Comparación de la CMB del extracto de limón durante los días 0, 4, 8, 12 y 16 de la fermentación en estado sólido con <i>R. oligosporus</i> , contra cuatro cepas enteropatógenas.....	80
12. Grupos funcionales presentes en los extractos de la fresa, ciruela y limón colima y sus extractos fermentados.....	82

13. Contenido de fenoles totales en extractos etanólicos de fresa, ciruela y limón colima.....85
15. Contenido de fenoles totales en los extractos de fresa, ciruela y limón colima durante los días 0, 4, 8, 12 y 16 de la fermentación con *R. oligosporus*.....85

**LISTA DE FIGURAS:**

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Mecanismos propuestos del efecto antimicrobiano de fenoles fitoquímicos en células procariotas.....	46
2. Microplaca de 96 pozos usada para determinar la concentración mínima bactericida (CMB).....	53
3. Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de vegetales por el método de difusión en pozo en agar con la cepa de <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894.....	72
4. Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de vegetales por el método de difusión en pozo en agar con la cepa de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028.....	73
5. Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de vegetales por el método de difusión en pozo en agar con la cepa de <i>L. monocytogenes</i> Scott A.....	74
6. Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de vegetales por el método de difusión en pozo en agar con la cepa de <i>C. jejuni</i> 5653.....	75
7. Placa de porcelana que muestra las reacciones colorimétrica realizadas para la determinación de grupos funcionales de un extracto de <i>Fragaria</i> spp. (Fresa) bioprocesado por <i>R. oligosporus</i> .....	83
8. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de la concentración de fenoles totales.....	84

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

C.D.C	Centro de Control y Prevención de Enfermedades.
C.M.B	Concentración mínima bactericida
C.M.I	Concentración mínima inhibitoria
°C	Grados Celsius
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
μ	Micra(s)
μL	Microlitro(s)
μm	Micrómetro(s)
mg	Miligramo(s)
mg GAE/g	Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca
mg/mL	Miligramo por mililitro(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
N	Normalidad
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standard
-	Negativo
>	Mayor que
<	Menor que
PBS	Amortiguador de fosfatos
+	Positivo
pH	Potencial de hidrógeno
%	Porcentaje
ppm	Partes por millón
SSF	Fermentación en estado sólido
UFC/g	Unidades formadoras de colonias por gramo

UFC/mL

Unidades formadoras de colonias por mililitro

v/v

Volumen/Volumen

## RESUMEN

Históricamente las plantas han provisto una fuente de agente antimicrobianos, existe un gran interés en el uso de estos compuestos como aditivos de alimentos, para retrasar el inicio del deterioro o para controlar el crecimiento de patógenos transmitidos por alimentos. En recientes investigaciones se ha demostrado que la actividad antimicrobiana y el contenido de fenoles totales presentes en plantas se incrementa cuando estas son fermentadas con *Rhizopus oligosporus*.

En este estudio se evaluó la actividad antimicrobia de 30 plantas comestibles. Aquellas que mostraron una mayor actividad (fresa, ciruela y limón) se les determinó la concentración mínima bactericida (CMB). Las bacterias enteropatógenas estudiadas fueron *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*. La concentración de fenoles totales de estas plantas también fue determinada. Las plantas seleccionadas fueron esterilizadas y fermentadas en estado sólido por *Rhizopus oligosporus* por 16 días; durante el curso de la fermentación se obtuvieron extractos cada cuatro días, a los cuales se les determinó la CMB para cada bacteria. Finalmente, se realizó la determinación parcial de los grupos químicos presentes en los extractos antes y después de la fermentación mediante reacciones colorimétricas. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre la CMB de los diferentes días de la fermentación para ninguna de las plantas analizadas, al igual que la concentración de fenoles totales. Sin embargo, las CMB obtenidas de los extractos antes de la fermentación se incrementaron después de la esterilización de las plantas por calor. El mismo efecto se observó en la concentración de fenoles. De acuerdo con estos resultados, al parecer, el calor afecta la actividad antimicrobiana de las plantas y la concentración de fenoles. Por su parte, la identificación parcial de los grupos químicos presentes en los extractos estudiados mostró la presencia de taninos, saponinas, alcaloides, carbohidratos y cumarinas. Por todo lo anterior nosotros concluimos que son varios los mecanismos implicados en el efecto antimicrobiano de la fresa, la ciruela y el limón.



## ABSTRACT

Historically, plants have been sources of antimicrobial agents; there is a considerable interest in use of these compounds as food additives, to delay the growth of deteriorate microorganism or to control the growth of pathogens transmitted by foods.

Recent investigations have demonstrated that the antimicrobial activity and the concentration of total phenols present in plant extracts increased when the plant is fermented whit *Rhizopus oligosporus*. In the present study the antimicrobial activity of 30 edible plants was analyzed. These that showed the highest activity (strawberry, plum and Mexican lime) were subjected to analysis for the minimal bactericidal concentration (MBC). The enteropathogenic bacteria studied were *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. The concentration of total phenols of these plants was also determined. After that, the selected plants were sterilized and then were fermented in solid state fermentation by *Rhizopus oligosporus* for 16 days; during the course of the fermentation extracts were obtained every four days, then subjected to determination of MBC of each bacterium. Finally, we partially determine the chemicals groups presents in both kind of extracts (before and after the fermentation) by colorimetric assay.

The statistic analysis did not show significant differences between the MBCs obtained from the different days of fermentation for any of the three plants extracts. While, the concentration of total phenols did not vary in any test. However, the MBCs obtained from extracts before the fermentation increased after the heat sterilization of plants. The same effect was observed with the phenols content. Acoording with this result, it seemed, that heat affects the antimicrobial activity of plants and the concentration of total phenols. On the other hand, the chemical groups identified by colorimetric assay showed the presence of tannins, saponins, alkaloids, carbohydrates and coumarin. For all of this we conclude that there are several mechanisms implicated in the antimicrobial effects on the strawberry, plum and Mexican lime.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo el hombre ha buscado la manera de alargar la vida de los alimentos, manteniendo su calidad y su inocuidad. Hoy en día, este proceso es un arte que involucra a varias ciencias (Shafiur Rahman, 2008).

Para las industrias de alimentos la seguridad es la primera prioridad en la producción y conservación de comida. Un gran número de técnicas para la preservación de los alimentos han sido desarrolladas para satisfacer la demanda actual de alimentos listos para el consumo, como la congelación, esterilización, secado, uso de aditivos químicos, etcétera (Shafiur Rahman, 2008).

Los conservadores químicos han sido ampliamente utilizados por la industria de alimentos, no obstante, la negativa crítica del consumidor hacia estas sustancias, ha llevado a la exploración de nuevas alternativas más naturales que garanticen la inocuidad de los alimentos (Smid and Gorris, 2008).

Las plantas sintetizan un gran número de compuesto químicos con características antimicrobianas, muchos de estos compuestos han sido aplicados en el tratamiento de diferentes enfermedades. Además, se ha demostrado que gran parte de estas sustancias poseen cierta actividad frente a los microorganismos (Domingo y López-Brea, 2003).

La mayoría de los compuestos antimicrobianos son identificados como metabolitos secundarios, dentro de los cuales se incluyen: compuestos fenólicos simples, quinonas, taninos, cumarinas, alcaloides, flavonoides y compuestos relacionados (Smid and Gorris, 2008; Domingo y López-Brea, 2003).

En general, las hierbas, especias y varios de sus constituyentes antimicrobianos son sustancias GRAS (generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas en inglés), tanto por su uso tradicional sin registro alguno de daños a la salud o por pruebas

toxicológicas. Su aplicación en la protección de cosechas y la preservación de alimentos es facilitada por esta característica, pese a esto, las plantas continúan siendo una fuente poco explorada de agentes antimicrobianos naturales (Smid and Gorris, 2008).

En este estudio se evaluaron las propiedades antimicrobianas de extractos etanólicos y metanólicos de 30 plantas comestibles contra bacterias enteropatógenas transmitidas por alimentos como son *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*. Las plantas que presentaron mayor inhibición en placa contra estos patógenos fueron fermentadas en estado sólido por *Rhizopus oligosporus* por 16 días. Durante el transcurso de la fermentación, se realizó la obtención de extractos cada cuatro días, comenzando con el día 0 y terminando con el día 16. Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos antes y después de la fermentación, así como la concentración de fenoles totales. Finalmente se realizó una identificación parcial mediante ensayos colorimétricos de los grupos químicos funcionales presentes en los extractos antes y después de la fermentación.

## DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Una marcada tendencia en el consumo de comida preparada, se ha visto en los últimos años, debido en gran medida al rápido y atareado estilo de vida que actualmente lleva la sociedad. En un mundo competitivo y globalizado, los alimentos listos para el consumo, son una solución al alcance de la mayor parte de la población.

Sin embargo, la calidad de los alimentos y una reducción en la vida de anaquel de los mismos, puede ser propiciada por la contaminación bacteriana. Esto aunado al creciente número de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, representa grandes pérdidas económicas, no solo para la industria de alimentos, sino para toda la población involucrada en casos esporádicos o en brotes epidémicos (Conte *et al.*, 2007; Smith-Palmer *et al.*, 1998).

En México, para 2007, las diferentes instituciones de salud notificaron, 1,874 casos de brucelosis, 14,799 de shigelosis, 44,076 de tifoidea, 36,121 intoxicaciones alimentarias bacteriana, 122,956 de salmonelosis y paratifoidea y 4,616,080 de infecciones intestinales por otros organismos (Dirección General de Epidemiología, 2008).

Por todo lo anterior, la prevención de la contaminación microbiana es de gran importancia en el procesamiento de alimentos. Los aditivos sintéticos se han empleado durante mucho tiempo en la industria alimentaria para inhibir el crecimiento de microorganismos deteriorantes y patógenos (Conte *et al.*, 2007). No obstante, la ascendente negativa por parte del consumidor con respecto a este tipo de aditivos, ha llevado a la necesidad de la búsqueda de nuevas alternativas naturales, no tóxicas y seguras para la conservación de los alimentos.

## JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la búsqueda de posibles reemplazos de los bactericidas químicos en alimentos se ha incrementado. Las razones son múltiples e incluyen algunas relacionadas con temas como la preferencia del consumidor por alimentos naturales, cambios legislativos que imponen restricciones al uso de antibióticos y la detección de gérmenes resistentes a los mismos (Fisher and Philips, 2008). Las plantas son uno de los principales candidatos en esta búsqueda, debido a que éstas aportan una gran cantidad de compuestos químicos con carácter antimicrobiano, algunos de los cuales muestran una actividad *in vitro* comparable a la de los antibióticos o a los conservadores químicos (Domingo y López-Brea, 2003).

Dentro del arsenal antimicrobiano de las plantas se encuentran compuestos derivados del fenol (Domingo y López-Brea, 2003). Recientemente, se han propuesto estrategias para incrementar estos fenoles presentes en las plantas. Una de ellas es el bioprocesamiento de frutas y vegetales en estado sólido por un hongo grado alimenticio (Vattem *et al.*, 2005a). Se ha reportado que al fermentar en estado sólido frutas como el arándano, no sólo se ve incrementado el contenido de fenoles solubles, sino también la actividad antimicrobiana de esta fruta en baya contra *Helicobacter pylori* (Vattem *et al.*, 2005b).

Sin embargo, son pocas las investigaciones realizadas en este campo que explique las propiedades antimicrobianas propias de plantas fermentadas y previas a la fermentación contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*. Por ello, se requiere realizar una investigación para determinar la actividad antimicrobiana de plantas fermentadas y no fermentadas con *R. oligosporus* contra *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*.

## HIPÓTESIS

La fermentación en estado sólido de plantas y frutos por *Rhizopus oligosporus* incrementa la actividad antimicrobiana de éstas contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*, debido a un aumento del contenido de fenoles solubles totales.

### **OBJETIVO GENERAL**

Comparar la actividad antimicrobiana de plantas fermentadas por *Rhizopus oligosporus* y sin fermentar, contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar las plantas que presenten mayor inhibición en placa contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*.
2. Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos seleccionados contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*.
3. Establecer la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos obtenidos durante el curso de la fermentación en estado sólido de las plantas seleccionadas por *Rhizopus oligosporus*, contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*.
4. Identificar los grupos químicos funcionales que se encuentran en los extractos fermentados y sin fermentar.
5. Determinar el contenido de fenoles solubles totales que se encuentran en los extractos fermentados y sin fermentar.



## ANTECEDENTES

### 7.1 Fermentación. Generalidades

Después del secado, la fermentación es el método más antiguo de preservación de los alimentos, además proporciona una gran variedad de sabores, formas y otras sensaciones (Prajapati and Nair, 2003). La fermentación ha sido conocida y practicada por los humanos desde tiempos prehistóricos, mucho antes de descubrir y entender sus principios científicos (El-Mansi *et al.*, 1999).

A lo largo de muchos siglos la fermentación ha sido realizada como un arte; así, por ejemplo, la elaboración del vino se cree que se practicaba ya al menos 10,000 años a.C., mientras que los historiadores creen que los egipcios producían cerveza en los años 5000-6000 a.C. dejando germinar la cebada en vasijas de barro y después estrujándola, amasándola y finalmente remojándola con agua para obtener la bebida (Ward, 1991).

Durante la edad media, se desarrolló una gran variedad de comida y bebidas fermentadas debido a la disponibilidad de materias primas, de las condiciones ambientales y de los sabores preferidos por las personas de la localidad (Prajapati and Nair, 2003). Estas fermentaciones fueron preparadas por procesos desarrollados caseramente por observaciones accidentales del fenómeno natural sin conocimientos básicos de los cambios que ocurren, además ayudaban a preservar la comida (Joshi *et al.*, 1999; Steinkraus, 2002).

La fermentación consiste en un proceso de transformación simple de materias primas complejas en un rango de productos de valor agregado debido al crecimiento de microorganismos comestibles de quienes las enzimas, particularmente la amilasa, proteasa y la lipasa hidrolizan los substratos. Numerosos cambios bioquímicos ocurren durante la fermentación, formando componentes del sabor, aroma y textura placenteros

y atractivos de los alimentos para los consumidores humanos (Prajapati and Nair, 2003; Steinkraus, 2002).

#### 7.1.1 Papel de la fermentación en el procesamiento de alimentos

La fermentación juega cinco roles importantes en los procesos de alimentos los cuales son enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1  
Papel que juega la fermentación en el procesamiento de alimentos

<b>Papel que juega la fermentación en el procesamiento de alimentos</b>
❖ Enriquecimiento de la dieta humana a través del desarrollo de una amplia diversidad de sabores, aromas y texturas en la comida.
❖ Preservación de la comida a través de la fermentación ácido láctica, alcohólica, ácido acético, alcalina y la fermentación con alta concentración de sal o azúcar.
❖ Incremento del valor nutricional de la comida con vitaminas, proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales.
❖ Destoxificación durante el periodo de fermentación y destrucción de los factores antinutricionales.
❖ Reducción en el tiempo de cocción de los alimentos y requerimientos de combustible, por la transformación de componentes complejos a simples (catabolismo), así como la liberación de nutrientes encerrados en estructuras y células vegetales formadas por materiales diversos.

Fuente: Steinkraus, 2002; Potter and Hotchkiss, 1995.

La fermentación es realizada principalmente por dos grupos de microorganismos: bacterias y hongos (incluyendo levaduras). Hay tres características importantes que deben tener los microorganismos para que sean útiles en la fermentación (Desrosier, 2003).

- a. El microorganismo debe ser capaz de crecer rápidamente en un sustrato y medio adecuado y ser fácilmente cultivado en grandes cantidades.
- b. El organismo debe tener la capacidad de mantener constancia fisiológica bajo las condiciones anteriores y producir las enzimas esenciales de forma fácil y abundante con el objetivo de que los cambios químicos deseados puedan ocurrir.
- c. Las condiciones del medio circundante requerido para el crecimiento máximo y reproducción deben ser comparativamente simples.

## **7.2 Fermentación en Estado Sólido. Generalidades.**

Las fermentaciones en estado sólido ocurren espontáneamente en la naturaleza. La evidencia más común es el enmohecimiento del pan, la fruta, vegetales y parte del deterioro de los alimentos sólidos (Pérez Quilantan, 1996).

La fermentación en estado sólido ó SSF (del ingles “Solid State Fermentation”) es definida como un proceso de fermentación en el cual los microorganismos crecen en material sólido sin la presencia de líquido libre. En la SSF, la humedad necesaria para el crecimiento de los microorganismos existe en un estado absorbido o complejo de la matriz sólida (Krishna, 2005).

En años recientes, un término similar ha surgido. La fermentación en sustrato sólido, que ha sido empleado como sinónimo de SSF. De acuerdo con Pandey *et al.*, (2008), la fermentación en sustrato sólido deber ser usado para definir solo los procesos en los cuales el sustrato por si sólo actúa como fuente de carbono/energía, llevándose a cabo en ausencia o cercano a la ausencia de agua libre; mientras que la SSF la define como un proceso de fermentación que ocurre en la ausencia o cercano a la ausencia de agua libre, empleando un sustrato natural como en la definición anterior, o en un sustrato inerte usado como soporte.

El proceso de SSF es definido como un sistema de cuatro fases, la primera (la fase continua) es el aire o alguna otra mezcla de gases que usualmente fluye a través de una cama sólida; la segunda fase, es un soporte sólido; una solución de nutrientes constituye la tercera fase y finalmente, el microorganismo que crece interiormente en el soporte y/o en su superficie del mismo, representa la cuarta fase (Krishna, 2005).

### 7.2.1 Aplicaciones

La fermentación en estado sólido ha sido empleada principalmente para la producción de comida tradicional y bebidas alcohólicas, por ejemplo, en la elaboración del tempoh y ontjom en Indonesia, el vino shaoh sing y el licor kadiang en China; el miso, la salsa de soya y saké en Japón (Sato and Sudo, 2004). Así mismo, los egipcios la empleaban para la preparación de pan (Pandey *et al.*, 2008). Algunos ejemplos más de la utilización de la fermentación en estado sólido se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2  
Ejemplos de la utilización de la fermentación en estado sólido

Ejemplo	Substratos	Microorganismo (s) involucrados
Producción de hongos comestibles (europeos y orientales)	Paja, excremento de animales	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Volvariella volvacea</i>
Sauerkraut	Col	Bacterias ácido lácticas
Salsa de soya	Frijoles de soya y trigo	<i>Aspergillus oryzae</i>
Tempeh	Frijoles de soya	<i>Rhizopus oligosporus</i>
Ontjom	Cacahuete prensado	<i>Neurospora sitophila</i>
Quesos	Leche cortada	<i>Penicillium roquefortii</i>
Remoción de metales	Minerales de baja calidad	<i>Thiobacillus sp.</i>

Tabla 2 (continuación)

Ejemplo	Substratos	Microorganismo (s) involucrados
Ácidos orgánicos	Caña de azúcar , melaza	<i>Aspergillus niger</i>
Enzimas	Cáscara de trigo, etc.	<i>Aspergillus niger</i>
Abono	Mezcla de materia orgánica	Hongos, bacterias, actinomicetos
Tratamiento de desperdicios	Componentes de deshecho	Bacterias, hongos y protozoos

Fuente: Smith, 2004

Los principales grupos de microorganismos usados en la fermentación son hongos y bacterias. Los hongos filamentosos son los más importantes, ideales y mejor adaptados a la SSF. La buena tolerancia a la baja actividad acuosa (aproximadamente 0.7) y a la alta presión osmótica dan al hongo filamentosos grandes ventajas sobre los microorganismos unicelulares, en la colonización, la utilización de sustratos sólidos y en la utilización de nutrientes disponibles. Ellos son eficientes en la producción de enzimas, pueden promover aromas y sustancias saludables de interés en la industria alimentaria, y pueden actuar como antagonistas naturales para pesticidas en la agricultura (Krishna, 2005; Ward, 1991).

Los hongos más importantes implicados en las fermentaciones industriales se clasifican principalmente en dos grupos, los Zygomycotina, aseptados, como los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, y los Deuteromycotina, septados, como *Aureobasidium* y *Fusarium* (Ward, 1991).

### 7.2.2 Ventajas y desventajas

Existen ventajas y desventajas de las fermentaciones en estado sólido con respecto a las fermentaciones líquidas, estas son enlistadas en la Tabla 3.

Tabla 3  
Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido con respecto a las fermentaciones líquidas.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Medio natural y de bajo costo.</li> <li>❖ Bajo contenido de humedad de los materiales.</li> <li>❖ Economiza el espacio del birreactor.</li> <li>❖ Menor contaminación microbiana.</li> <li>❖ Frecuentemente no necesita esterilización.</li> <li>❖ Fácil flujo de procesamiento.</li> <li>❖ Los requerimientos de aireación pueden ser por una simple difusión de gas o por aireación intermitente.</li> <li>❖ Productibilidad a altos volúmenes y alta reproducibilidad.</li> <li>❖ Bajo gasto de energía comparada con los problemáticos tanques biorreactores.</li> <li>❖ El producto deseado puede ser extraído directamente del reactor e incluido directamente a la alimentación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Usualmente limitado proceso de crecimiento para organismos que toleran los bajos niveles de humedad.</li> <li>❖ Producción de calor metabólico en gran escala; son difíciles de monitorear los niveles de temperatura, biomasa, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.</li> <li>❖ El diseño de birreactores no está bien desarrollado.</li> <li>❖ Limitados productos.</li> <li>❖ Lento crecimiento de los microorganismos.</li> <li>❖ Dificultades en la agitación del substrato.</li> <li>❖ Dificultad en rápida determinación del crecimiento microbiano.</li> <li>❖ En algunos casos el substrato debe ser pretratado para su máximo aprovechamiento.</li> </ul>

Fuente: Wainwright, 1992; Pérez Quilantan, 1996.

### 7.2.3 Potencializador de la actividad antioxidante y antimicrobiana.

La fermentación en estado sólido es una innovadora estrategia para producir antimicrobianos de amplio espectro contra patógenos transmitidos por alimentos (Vattem *et al.*, 2005a). Por ejemplo, se han realizado estudios sobre la fermentación en estado sólido del arándano, el cual posee actividad antimicrobiana contra algunas bacterias patógenas como *E. coli* y *Helicobacter pylori*. Durante la SSF del arándano con hongos como *Rhizopus oligosporus* y *Lentinus edodes*, se incrementó los antioxidantes fenólicos e importantes fenoles fitoquímicos como el ácido elágico, el cual también es un antimicrobiano. El bioprocesamiento en estado sólido también aumentó la actividad antimicrobiana de los extractos contra *H. pylori*, *L. monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* y *E. coli* O157:H7 (Vattem *et al.*, 2004, 2005b).

Algo similar ocurre con la soya al ser fermentada por *R. oligosporus* y *L. edodes*, en este caso se demostró que durante la fermentación, los extractos enriquecen el contenido de fenoles, además, se incrementó la actividad inhibitoria de los extractos contra *L. monocytogenes* y *H. pylori* (McCue *et al.*, 2004, 2005). Así mismo, se ha publicado que al fermentar en estado sólido residuos de guayaba suplementados con harina de soya, se incrementa la actividad antioxidante de los extractos (Correia *et al.*, 2004).

## 7.3 Enfermedades transmitidas por alimentos

Los patógenos infecciosos o toxigénicos transmitidos a través de los alimentos han sido reconocidos por más de 100 años (Todd, 2001). Sin embargo, en las últimas décadas se ha incrementado dramáticamente el número de casos reportados de enfermedades asociadas con este tipo de bacterias (Smith-Palmer *et al.*, 1998).

Los microorganismos patógenos son responsables de un estimado de 323,000 hospitalizaciones cada año con un costo de \$7 a 10 billones de dólares anualmente. El

Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) estima que las pérdidas financieras de enfermedades causadas por patógenos alimenticios, incluyendo costos médicos y pérdidas en productividad, se encuentran en un rango de \$500 a \$2.3 millones de dólares anualmente (O'Bryan *et al.*, 2008).

En los países subdesarrollados las enfermedades gastrointestinales constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (Parrilla-Cerrillo *et al.*, 1993). En México, para 2007, las diferentes instituciones de salud notificaron, 1,874 casos de brucelosis, 14,799 de shigelosis, 44,076 de tifoidea, 36,121 intoxicaciones alimentarias bacteriana, 122,956 de salmonelosis y paratifoidea y 4,616,080 de infecciones intestinales por otros microorganismos (Dirección General de Epidemiología, 2008).

La contaminación de los alimentos puede ser endógena, o bien ocurrir en algún punto de su procesamiento. Por tanto, el agente etiológico debe existir en los animales, vegetales o medio ambiente donde se almacena, maneja o procesa el alimento. Generalmente los microorganismos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades, y deben encontrar en ellos las condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse hasta alcanzar los niveles necesarios para ser infectantes o producir la suficiente toxina para causar la enfermedad (Parrilla-Cerrillo *et al.*, 1993).

Las manifestaciones de las toxiinfecciones alimentarias son generalmente de tipo gastrointestinal, aunque no necesariamente, pues en muchos casos el cuadro clínico es principalmente de tipo extra-intestinal; por ejemplo: brucelosis, botulismo, etcétera (Parrilla-Cerrillo *et al.*, 1993).

Diferentes alimentos se han identificado en los brotes: huevos, carne, pollo, productos lácteos, frutas, verduras, etcétera; éstos varían de acuerdo a las características de cada país y de los patrones de producción y consumo entre la población (Parrilla-Cerrillo *et al.*, 1993).



Hoy en día es sabido que una gran variedad de patógenos en muchos tipos de comida pueden causar enfermedades y amenazar la vida. Dentro de las bacterias más frecuentemente transmitidas por alimentos se encuentran: *Staphylococcus aureus* (quien es productora de varias toxinas), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* (Todd, 2001; Smith-Palmer *et al.*, 1998).

### 7.3.1 *Listeria monocytogenes*

#### 7.3.1.1 Características generales.

*Listeria* spp. son bacterias ampliamente distribuidas en el ambiente, y pueden ser aisladas del suelo, agua, efluentes, una gran diversidad de comidas como carne y productos cárnicos, leche y productos derivados y hortalizas frescas, así como en heces fecales de animales y humanos (Farber and Peterkin, 1991; Vasseur *et al.*, 1999; Rocourt and Cossart, 1997).

El género *Listeria* incluye seis especies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi* y *L. welshimeri* (Li *et al.*, 2006). De las cuales *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, son potencialmente patógenas (Li *et al.*, 2006; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

*Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, mide de 0.4 a 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 0.5 a 2  $\mu\text{m}$  de largo, facultativo anaerobio, no formador de esporas, capaz de crecer entre los -0.4 y 50°C. (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2001). Su temperatura óptima de crecimiento se establece entre los 35 y los 37°C. Es catalasa positivo, oxidasa negativo y produce una  $\beta$ -hemólisis. Fermenta ramnosa, dextrosa, esculina y maltosa, pero no fermenta la xilosa y el manitol (Farber and Peterkin, 1991; Datta, 2003).

*Listeria monocytogenes* es activamente móvil gracias a cuatro flagelos peritricos. El grado de movilidad es dependiente de la temperatura, así, la bacteria presenta mayor

movimiento en un rango de temperatura de 20 a 25°C. Por arriba de 37°C, la producción de flagelos es reducida, y por ende, también su motilidad (Farber and Peterkin, 1991).

*L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir en condiciones adversas como la desecación, la refrigeración y los rayos ultravioleta, valores de pH tan bajos como 4.4 y concentraciones elevadas de NaCl (arriba de 10%) (Touré *et al.*, 2003; Rocourt and Cossart, 1997).

#### 7.3.1.2 Listeriosis.

*Listeria monocytogenes*, es el agente causal de listeriosis en humanos y animales, y es de principal interés para salud pública a debido a su gravedad y a la alta tasa de mortalidad reportada que frecuentemente está entre 30-40% (Datta, 2003). Existen 13 serovariedades de *L. monocytogenes* que pueden causar enfermedad, pero el 95% de los aislamientos humanos pertenecen a 3 serovariedades: 1/2a, 1/2b y 4b (Rocourt and Cossart, 1997).

Se estima que la infección causada por *Listeria monocytogenes* produce más de 2,500 casos anualmente en los Estados Unidos. Y su porcentaje de mortalidad es de aproximadamente un 17%. (Varma *et al.*, 2007). Datos microbiológicos y epidemiológicos demuestran que el principal vehículo de transmisión de esta bacteria es el consumo de comida contaminada (Rocourt and Cossart, 1997; Varma *et al.*, 2007).

Los pacientes inmunosuprimidos, los niños, la mujeres embarazadas y los ancianos son los grupos más afectados por esta enfermedad (Touré *et al.*, 2003; Dykes *et al.*, 2003). Basado en las poblaciones susceptibles, la listeriosis puede ser clasificada en dos grupos: la listeriosis neonatal y la listeriosis adulta (Datta, 2003).

En la listeriosis neonatal, las mujeres embarazadas suelen ser asintomáticas o presentarse síntomas como un leve resfriado, sin embargo las consecuencias para el feto

suelen incluir aborto espontáneo, muerte, nacimiento prematuro, septicemia neonatal grave y meningitis (Flores Hernández, 2006).

En adultos, la enfermedad se caracteriza por dos síndromes, un invasivo y otro no invasivo. La enfermedad invasiva incluye síntomas severos como meningitis, septicemia, bacteriemia primaria, endocarditis, infección del sistema nervioso central no meningítico, conjuntivitis y una enfermedad tipo influenza. La forma no invasiva de listeriosis causa diarreas, fiebre, dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas, vómito y dolores abdominales aún en adultos saludables (IRSI, 2005).

Aunque aún no ha sido determinada la dosis infecciosa de *L. monocytogenes*, se sabe que esta depende de varios factores incluyendo el estado inmunológico del individuo y del tipo de alimento implicado. En base a los estudios de brotes alimenticios algunos autores sugieren la dosis infecciosa de esta bacteria se encuentra entre  $10^3$  y  $10^6$  UFC/g (Datta, 2003; Flores Hernández, 2006; Rocourt and Cossart, 1997). Sin embargo no descartan que dosis bajas como  $10^2$  a  $10^4$  cel/g de alimentos puedan causar la enfermedad en poblaciones susceptibles (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

### 7.3.2 *Salmonella enteritidis* serovariedad Typhimurium

#### 7.3.2.1 Características generales.

*Salmonella* es uno de los patógenos más comúnmente implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos. En los Estados Unidos se ha estimado que causan aproximadamente 1.4 millones de casos anualmente (Logue *et al.*, 2003). En el 2007, en México las diferentes instituciones de salud reportaron 122,956 casos de salmonelosis y 44,076 de fiebre tifoidea (Dirección General de Epidemiología, 2008).

Existen varios problemas al hacer referencia a la nomenclatura del género *Salmonella*, y más en los últimos años que ha progresado gracias a la sucesión de

esquemas taxonómicos basados tanto en características bioquímicas y serológicas como en los principios de taxonomía numérica y de la homología del DNA (D'Aoust, 1997).

Clásicamente el género *Salmonella* incluía tres especies: *S. typhi*, *S. choleraesuis*, y *S. enterica*. A su vez, de acuerdo a la serotipificación de Kauffmann-White, eran clasificadas en diferentes serotipos en base a los antígenos O (somáticos) y H (flagelares) (Hanes, 2003). Además de un antígeno capsular (Vi) que posee *S. typhi* (D'Aoust, 1997).

Mediante estudios de hibridación del DNA-DNA Crosa y colaboradores demostraron en 1973, que todos los serotipos de *Salmonella* eran miembros de una sola especie genómica (Uribe *et al.*, 2006).

Actualmente el género *Salmonella* contiene dos especies distintas, designadas como *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Hanes, 2003). Cada especie a su vez es dividida en serovariedades (serotipos) definidas por su fórmula antigénica. (Uribe *et al.*, 2006). *Salmonella enterica* comprende más de 2,300 serovariedades, entre ellas Typhi y Typhimurium. (Lawley *et al.*, 2008).

*Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium es un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, anaerobio facultativo, en su mayoría móviles por medio de flagelos peritricos, no obstante, la serovariedad Gallinarum-Pullorum es aflagelada (D'Aoust, 1997). Estos organismos pueden crecer en un rango de temperatura desde los 8 hasta los 45°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento a 37°C. El pH óptimo de crecimiento de *Salmonella* es entre 6.5 a 7.5, pero poseen la capacidad de crecer en valores que van desde 4.5 a 9.0 (Hanes, 2003).

Son Oxidasa negativa, catalasa positiva, utilizan el citrato como fuente de carbono, no fermentan la lactosa o sacarosa, pero si la glucosa produciendo generalmente sulfuro de hidrógeno, reducen nitrato a nitrito, descarboxilan lisina y ornitina, y no hidrolizan la urea (D'Aoust, 1997).

*S. Typhimurium* es transmitida por alimentos, en especial los de origen animal como carne de pollo y huevos principalmente; en menor grado leche no pasteurizada y productos derivados; carne porcina y bovina. Las frutas frescas y vegetales son también fuentes potenciales de *Salmonella* (D'Aoust, 1997). La dosis infecciosa de *S. Typhimurium* para provocar los síntomas en humanos saludables es de  $10^5$  a  $10^8$  células (Jawetz *et al.*, 1987).

#### 7.3.2.2 Enterocolitis.

En humanos, *S. Typhimurium* no causa una enfermedad tan severa como la *S. Typhi* (causante de fiebre tifoidea). *S. Typhimurium* produce un síndrome denominado enterocolitis (antes “gastroenteritis”), el cual se manifiesta de 8 a 72 h después de la ingestión de estos microorganismos. La enterocolitis es generalmente caracterizada por dolor abdominal, náuseas, cefalalgias, vómito y diarrea profusa. Es común la fiebre de grado bajo, pero la crisis suele resolverse en dos o tres días (D'Aoust, 2001; Jawetz *et al.*, 1987).

Desafortunadamente los recién nacidos, los ancianos e individuos con deficiencias en el sistema inmune son particularmente sensibles a esta infección, y puede desencadenar severas infecciones sistémicas, e incluso puede ser fatal si no es tratada a tiempo con antibióticos (D'Aoust, 2001; Jawetz *et al.*, 1987).

#### 7.3.3 *Campylobacter jejuni*

##### 7.3.3.1 Características generales.

Desde el primer aislamiento de bacterias de este género en 1909, su taxonomía ha sido modificada dramáticamente. Inicialmente fueron llamadas *Vibrio fetusoid* por su forma curvada (Hu and Kopecko, 2003). Años más tarde Smith y Taylor lo nombraron *Vibrio fetus* (Butzler, 2004). En 1963 Sebald y Véron aplicando pruebas de Hugh y

Leifson para el metabolismo fermentativo y la proporción G + C en el DNA mostraron que *V. fetus* no estaba relacionado con otras especies de *Vibrio*, surgiendo así un nuevo género, *Campylobacter* (On, 2005).

Desde la reclasificación de los bacilos curvos en el nuevo género, la taxonomía de *Campylobacter* ha sido revisada. Usando la secuenciación del rRNA 16S, se separaron los géneros *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* y *Wolinella*, incluidos inicialmente en el género *Campylobacter*. Actualmente *Arcobacter* y *Campylobacter* están comprendidos en la familia Campylobacteraceae (Hu and Kopecko, 2003).

*Campylobacter* spp. es la fuente bacteriana más común de infecciones gastrointestinales en países industrializados. Aproximadamente dos millones de casos se presentan anualmente en los Estados Unidos de América (Solow *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2003).

El género *Campylobacter* incluye 16 especies, de las cuales tres puede ser divididas en subespecies (On, 2005). Las especies más frecuentemente asociadas con infecciones gastrointestinales en humanos son *C. jejuni*, *C. coli* y un poco menos extendida *C. lari* (Meldrum *et al.*, 2004; Baylis *et al.*, 2000).

*Campylobacter* spp. son bacilos gram negativos en espiral o curvos, no formadores de esporas. Miden de 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 0.5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo. Son activamente móviles gracias a un solo flagelo polar en uno o en ambos extremos. Las especies de *Campylobacter* son microaerofílicas, requieren del 3-15% de oxígeno y 3-5%  $\text{CO}_2$  para crecer. Todas las campylobacterias crecen a 37°C, pero las termofílicas crecen mejor a 42°C (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*) (Hu and Kopecho, 2003).

Las campylobacterias no fermentan u oxidan carbohidratos. La energía es obtenida de aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (Hu and Kopecho, 2003).

*Campylobacter* es sensible al calor, la actividad acuosa, el pH, el estrés osmótico y la concentración de oxígeno. Así como a la desecación, a los desinfectantes y a la irradiación (Meldrum *et al.*, 2004; Nachamkin, 1997).

*Campylobacter jejuni* está ampliamente distribuida en el ambiente y es comensal del tracto digestivo de una gran variedad de animales domésticos y salvajes, incluyendo ganado vacuno, ovejas, cerdos y aves de corral. Consecuentemente, productos derivados de estos animales y otras comidas pueden ser contaminados con *C. jejuni* y pueden ser fuente de infección. Los vehículos comunes han incluido agua no tratada o contaminada, leche bronca o mal pasteurizada, hortalizas, mariscos, y carne mal cocida, particularmente pollo el cual es una fuente primaria de *C. jejuni* (Baylis *et al.*, 2000; Nachamkin, 1997).

La dosis infecciosa para *C. jejuni* es baja. En estudios de voluntarios se ha establecido entre 50 y 500 organismos. La leche y comidas (o tratamientos médicos) que neutralicen el ácido gástrico reducen efectivamente la dosis infecciosa. Las infecciones por *C. jejuni* ocurren típicamente en individuos sanos y siguen a la ingestión de comida o agua contaminada por esta bacteria o por la exposición ocasional a animales infectados por *C. jejuni*. El periodo de incubación va de 1 a 7 días después de la ingestión de la bacteria (Hu and Kopecko, 2003).

#### 7.3.3.2 Campylobacteriosis.

*C. jejuni* causa un espectro de enfermedades, y los pacientes pueden ser desde asintomáticos o estar gravemente enfermos. La mayor parte de los pacientes con gastroenteritis suelen presentar fiebre, dolor abdominal y diarrea que dura desde varios días hasta más de 1 semana (Nachamkin, 1997). Sin embargo, las formas más severas de la enfermedad ocurre en infantes, ancianos y pacientes inmunosuprimidos (Halbert *et al.*, 2005). Los efectos secundarios de una gastroenteritis por *C. jejuni* pueden incluir, proctitis, septicemia, meningitis, aborto y enfermedades autoinmunes como artritis de Reiter y el síndrome de Guillain-Barré (Young and Mansfield, 2005).

### 7.3.4 *Escherichia coli* O157:H7

#### 7.3.4.1 Características generales de *Escherichia coli*.

*Escherichia coli* es el anaerobio facultativo predominante de la flora que coloniza el tracto gastrointestinal de infantes dentro de las primeras horas de vida. Por ende, *E. coli* y el huésped derivan en un beneficio mutuo (Nataro and Kaper, 1998). La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas: sin embargo, se han descrito seis grupos de *E. coli* productoras de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez-Angeles, 2002). ). Estos patógenos exhiben distintos, perfiles epidemiológicos y patológicos. Cada cepa patotipo es caracterizada por partes virulentas específicas y típicamente pueden ser distinguidas por antígenos O (lipopolisacáridos) y H (flagelares) (Harrington, 2006).

*Escherichia coli* es un miembro de la familia Entobacteriaceae. El género esta compuesto de bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, usualmente con flagelos peritricos y fimbrias. Son fermentadores de una gran variedad de azúcares, entre ellas la lactosa con la producción de ácido y gas que es característica (Feng, 2001; Eslava *et al.*, 2003). Estas bacterias dan una reacción positiva para la prueba de indol y rojo de metilo, reducción de nitrato a nitritos, descarboxilación de lisina y producen  $\beta$ -glucuronidasa. No utilizan el citrato, no producen H<sub>2</sub>S, ni hidrolizan la urea (Rodríguez-Angeles, 2002).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Puede sobrevivir a la fermentación y resistir la desecación y el almacenamiento de los embutidos fermentados (pH 4.5), durante un tiempo de hasta 2 meses a 4°C (Doyle *et al.*, 1997).



### 7.3.4.2 Características de *E. coli* O157:H7

Casi todas las cepas de *E. coli* O157:H7 poseen varias características raras en relación a las demás *E. coli*: incapacidad de crecer bien, si es que crecen, a temperaturas de  $\geq 44.5^{\circ}\text{C}$ , incapacidad para fermentar el sorbitol en 24 h, incapacidad para producir  $\beta$ -glucuronidasa (Doyle *et al.*, 1997).

*E. coli* enterohemorrágica (EHEC) serotipo O157:H7 es un importante patógeno que causa enfermedades humanas de gran relevancia, especialmente en países en desarrollo. Estas enfermedades incluyen diarrea no sanguinolenta, colitis hemorrágica, colitis y ocasionalmente complicaciones como síndrome urémico hemolítico y trombocitopenia trombótica púrpura (Voravuthikunchai and Limsuwan, 2006; Doyle *et al.*, 1997).

El control del crecimiento de *E. coli* O157:H7 es un importante objetivo en la industria de alimentos porque este patógeno es encontrado en una amplia variedad de productos comestibles y causan serios brotes de esta bacteria (Burt *et al.*, 2005).

*E. coli* O157:H7 se puede encontrar en bovinos, cabras, borregos y con menos frecuencia en cerdos y pollos; su principal reservorio es el intestino de ganado bovino. También se ha logrado recuperar de frutas y vegetales como lechuga, rábanos y alfalfa; además en productos industrializados como mayonesa y jugos de naranja y manzana no pasteurizados, aun cuando estos alimentos tengan un pH de 3.4, condición en la que puede sobrevivir varios días.

La transmisión de *E. coli* O157:H7 puede ser por ingerir carne cruda o mal cocida, leche bronca, agua contaminada; también puede ser de persona a persona o debida a los manipuladores de alimentos (Rodríguez–Angeles, 2002). La dosis infecciosa de EHEC O157:H7 en humanos se estima que se encuentra en el rango de 10 a 100 células.

Más de 5,000 casos de infecciones de *E. coli* enterohemorrágica por año son registrados en el mundo, con una alta incidencia en niños (Burt *et al.*, 2005). Los ancianos son otro grupo vulnerable (Doyle *et al.*, 1997).

#### **7.4 Uso de plantas: compuestos antimicrobianos de origen natural**

La búsqueda de la inocuidad de los alimentos y las agencias reguladoras han incrementando el interés en el desarrollo de nuevos y efectivos compuestos antimicrobianos no tóxicos (Friedman *et al.*, 2002).

Dada la negativa percepción del consumidor hacia los conservadores artificiales, la atención se está enfocando hacia alternativas que el consumidor perciba como naturales y en particular, extractos de plantas incluyendo aceites esenciales y esencias (Smith-Palmer *et al.*, 1998). Se ha demostrado que muchos de los compuestos naturales encontrados en hierbas y frutas de la dieta, así como plantas medicinales poseen actividad antimicrobiana (Lin *et al.*, 2005).

Globalmente las plantas producen más de 100,000 productos naturales de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios. Esta diversidad tan rica resulta como parte de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales (Domingo y López-Brea, 2003).

Un punto importante a destacar es que una gran proporción de los productos sintetizados con carácter antimicrobiano muestra en las pruebas de sensibilidad *in vitro* unas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) altas en comparación con las obtenidas por los antimicrobianos convencionales. Esto podría explicarse por la existencia, en los microorganismos, de compuestos anfipáticos que actuarían como auténticas bombas de expulsión de un amplio espectro de sustancias, incluidas aquellas con características antimicrobianas (Domingo y López-Brea, 2003).

Numerosos estudios se han publicado en base a la actividad antimicrobiana de compuestos de plantas contra diferentes tipos de microorganismos, incluyendo microorganismos patógenos (Friedman *et al.*, 2002).

En 1998 Smith-Palmer y colaboradores, reportaron la actividad bacteriostática del aceite esencial del laurel, de la canela, del clavo y del tomillo contra *C. jejuni*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *L. monocytogenes* en concentraciones de 0.075% o menores. Así como en concentraciones bactericidas menores de 0.1% contra las mismas bacterias.

Se ha demostrado que aceites esenciales de orégano, pimienta, gardenia, semilla de cedro, jazmín, entre otros presentan efecto bactericida en contra de patógenos como *C. jejuni*, *S. enterica*, *E. coli* y *L. monocytogenes* (Friedman *et al.*, 2002).

En un estudio realizado en el 2003, se demostró que los jugos concentrados de arándano, limón y lima poseen propiedades antimicrobianas intrínsecas que eliminarían a estos patógenos en caso de un contaminación postconcentración (Nogueira *et al.*, 2003). También, se ha reportado que el jugo de limón y un preparado del mismo causan la reducción de *S. typhimurium* en un rango entre 0.25 y 0.56 log UFC/g y 0.5 y 0.69 UFC/g, respectivamente, en mejillones rellenos inoculados con 5.94 log UFC/g (Kışla, 2007). Así mismo, se ha publicado que el extracto de limón exhibe una CMI menor a 80 ppm contra *Bacillus cereus* y *B. subtilis*, una CMI menor de 30 ppm para *Saccharomyces cerevisiae*, y menor de 170 ppm para dos géneros de *Lactobacillus*. Además, se encontró que las concentraciones necesarias para inhibir la germinación de las esporas de *B. cereus* son de 24.5 ppm (Conte *et al.*, 2007).

Rota *et al.*, en el 2004, señalaron que *Satureja montana* y *Thymus vulgaris* tuvieron una significativa actividad en contra del crecimiento de patógenos transmitidos por alimentos como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *L. monocytogenes* 4b, y *S. aureus* (Rota *et al.*, 2004).

## 7.5 Fenoles fitoquímicos: compuestos antioxidantes

Los fenoles fitoquímicos son metabolitos secundarios de plantas, los cuales constituyen uno de los más grandes grupos de metabolitos naturales. (Vattem *et al.*, 2005a).

Los fenoles son un grupo heterogéneo de sustancias naturales caracterizadas por un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Los fenoles pueden ocurrir como monómeros con un grupo hidroxilo o con varios sustituyentes hidroxilos, los cuales son referidos como polifenoles (Bärlocher and Graça, 2007). Estos compuestos pueden ser clasificados en diferentes grupos en función al número de anillos fenólicos que contienen y a los elementos que se unen a estos anillos. Así, se distinguen los ácidos fenólicos, los flavonoides, los estilbenos, y lignanos. Los flavonoides, se dividen en flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas, y flavonales (Manach *et al.*, 2004).

Los compuestos polifenólicos funcionan protegiendo a las plantas contra el estrés biológico y ambiental, son sintetizados en respuesta al ataque de patógenos (hongos o bacterias) o por una alta exposición a la radiación como la luz ultravioleta (Vattem *et al.*, 2005). Además, los polifenoles exhiben muchas propiedades biológicas como anti-inflamatorias, antialérgicas, antibacterianas, antimicrobianas, cardioprotectoras, actividades antioxidantes, y contra el cáncer (Payet *et al.*, 2006; Wang and Lin, 2000).

### 7.5.1 Fuentes de antioxidantes fenólicos

Las fuentes potenciales de componentes antioxidantes se han buscado en varios tipos de plantas como vegetales, frutas, hojas, semillas, cereales, corteza de árboles y raíces, hierbas y especias (Kähkönen *et al.*, 1999). Varios componentes antioxidantes han sido identificados en las semillas de cítricos, de la uva, de mango, de la canola, del girasol, entre otras (Soong and Barlow, 2004). Así como de frutas como guayabas, cítricos, ciruelas, fresa, cerezas, zarzamoras, arándano y otras frutas en baya (Jiménez-Escrig *et*

*al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2003; Wang y Zheng, 2001; Wang y Stretch; 2001).

### 7.5.2 Actividad antimicrobiana de los fenoles

En cuanto a la actividad antimicrobiana de los fenoles, se han propuesto varios mecanismos por los cuales estos presentan efecto antimicrobiano en contra de microorganismos. Estos mecanismos incluyen la desestabilización de la membranas, disrupción de la fuerza protón motriz, disrupción del transporte de electrones e inhibición de enzimas o proteínas unidas a membrana (Figura 1) (Lin *et al.*, 2005; McCue *et al.*, 2004).

En 1999 Pradhan K, J *et al.*, reportaron dos compuestos fenólicos extraídos de la pimienta verde que presentaron actividad inhibitoria en contra de *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus*, *B. cereus* y *E. coli*. Otros reportes muestran que extractos de mora de los pantanos, frambuesa y fresa inhiben fuertemente a *Salmonella*, así como a algunas bacterias Gram positivas del género *Lactobacillus* (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001).

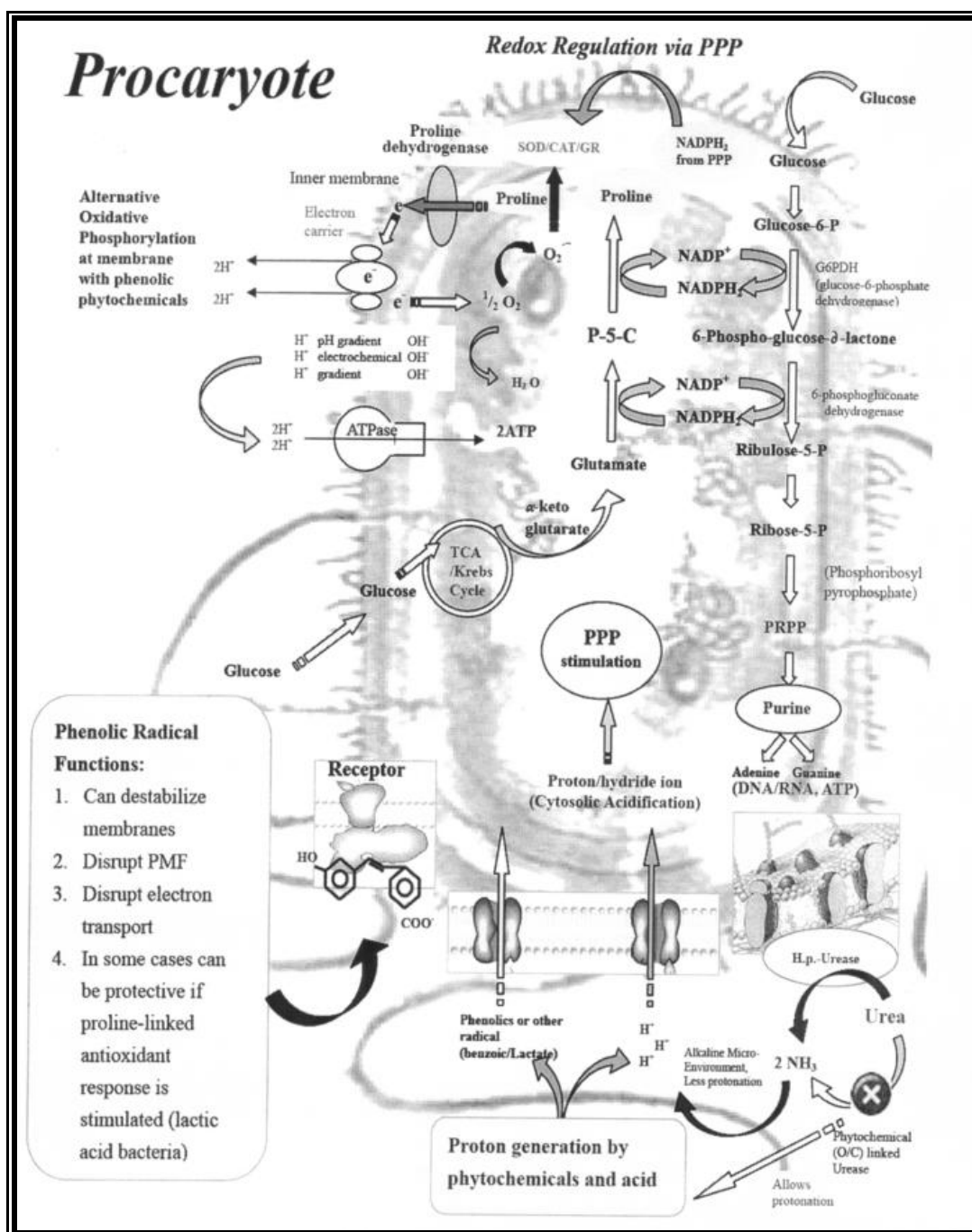


Figura 1. Mecanismos propuestos del efecto antimicrobiano de fenoles fitoquímicos en células procariotas. PPP, Vía de las pentosas fosfato; SOD, Superoxido dismutasa; CAT, catalasa; GR, glutatión reductasa; P-5-C, pirrolina-5-carboxilato; TCA, ácido tricarbóxico; PRPP, fosforibosilpirofosfato; PMF, fuerza protón motriz. (Fuente: Lin *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha reportado que los polifenoles extraídos de la uva y el té verde, inhiben la adherencia de *Streptococcus mutans* al esmalte dental, así como la producción de ácido por parte de este patógeno (Padilla-Zakour, 2008; Morimi Nakata y Martinez Cadillo, 2006).

## MÉTODOS:

### 8.1 Colecta de vegetales y/o plantas comestibles

Se recolectaron un total de 30 plantas comestibles (hojas, semillas, tallos, frutos y raíces) en centros comerciales del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León; con la finalidad de analizar antes y después de ser fermentadas con *R. oligosporus* su contenido de fenoles totales y su actividad antimicrobiana contra cuatro bacterias patógenas: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*.

Tabla 4  
Plantas analizadas

Nombre Común	Nombre científico	Familia	Parte utilizada
Papaya	<i>Carica</i> spp.	Caricaceae	Fruto
Cebolla	<i>Allium cepa</i> L.	Liliaceae	Fruto
Anís	<i>Pimpinella</i> spp.	Apiaceae	Semilla
Calabaza	<i>Cucurbita</i> spp.	Curcubitaceae	Semilla
Ajo	<i>Allium sativum</i>	Liliaceae	Fruto
Albahaca	<i>Ocimum</i> spp.	Lamiaceae	Hojas
Jamaica	<i>Hibiscus</i> spp.	Malvaceae	Flor
Jícama	<i>Pachyrhizus</i> spp.	Fabaceae	Fruto
Epazote	<i>Chenopodium</i> spp.	Chenopodiaceae	Hojas
Pimienta negra	<i>Piper</i> spp.	Piperaceae	Semilla
Hierbabuena	<i>Menta</i> spp.	Labiadas	Hojas
Nopal	<i>Opuntia</i> spp.	Cactaceae	Penca
Piña	<i>Ananas</i> spp.	Bromeliaceae	Fruto y cáscara
Limón colima	<i>Citrus aurantifolia</i>	Rutaceae	Fruto y cáscara



Tabla 4 (continuación)

Nombre Común	Nombre científico	Familia	Parte utilizada
Girasol	<i>Helianthus</i>	Asteraceae	Semilla
Ciruela	<i>Prunus</i> spp.	Rosaceae	Fruto
Ciruela pasa	<i>Prunus</i> spp.	Rosaceae	Fruto
Ajonjolí	<i>Sesamum</i> spp.	Pedaliaceae	Semilla
Comino	<i>Cuminum</i> spp.	Apiaceae	Semilla
Clavo	<i>Caryophyllus</i> spp.	Myrtaceae	Semilla
Guayaba	<i>Psidium</i> spp.	Myrtaceae	Fruto
Alpiste	<i>Phalaris</i> spp.	Poaceae	Semilla
Mijo rojo	<i>Panicum</i> spp.	Poaceae	Semilla
Repollo	<i>Brassica oleracea</i>	Brassicaceae	Hojas
Granada	<i>Punica</i> spp.	Punicaceae	Semilla, Fruto, Cáscara
Betabel	<i>Beta</i> spp.	Chenopodiaceae	Fruto
Orégano	<i>Origanum</i> spp.	Lamiaceae	Hojas
Naranja agria	<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	Cáscara
Mostaza negra	<i>Brassica nigra</i>	Brassicaceae	Semilla
Fresa	<i>Fragaria</i> spp.	Rosaceae	Fruto

## 8.2 Obtención de extractos

El material vegetal fue secado completamente usando lámparas de 500 watts de potencia. Para la obtención de los extractos, 20 g de la planta seca fueron homogenizados durante 2 minutos con 200 mL de etanol al 96 % o metanol absoluto en una licuadora convencional. A continuación el homogenizado se dejó macerando durante 48 horas a temperatura ambiente (Nanasombat and Lohasupthawee, 2005). El macerado fue filtrado a través de papel filtro Whatman No. 1 y posteriormente se colocó en platos de vidrio para la evaporación del solvente a temperatura ambiente. Una vez

seco, el extracto se resuspendió en 10 mL amortiguador de fosfatos (PBS), 50 mM a pH 7.4, en etanol o metanol.

El extracto acuoso se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 15 min. El sobrenadante se esterilizó por filtración, mediante el empleo de membranas de nitrocelulosa Millipore con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ . El extracto estéril se almacenó en viales estériles color ámbar a 4°C hasta su empleo. Para determinar la concentración del extracto obtenido, se tomó una alícuota de 1 mL de este y se colocó en un tubo de ensaye con peso constante y se dejó secar. El peso seco del extracto se determinó por diferencia en el peso de los tubos antes y después de colocar el extracto.

### **8.3 Microorganismos, condiciones de cultivo y preparación del inóculo**

El hongo utilizado en este estudio fue *Rhizopus oligosporus* CDBB-H-311 obtenido del Instituto Politécnico Nacional (IPN); esta cepa fue mantenida en tubos con agar papa dextrosa (PDA) a 4°C y subcultivados cada tres meses. El cultivo fue reactivado por resiembra en placas con PDA y cultivado a 28°C por 10 días antes de su uso (Vattem *et al.*, 2005b).

Las esporangiosporas del hongo fueron cosechadas añadiendo 10 mL de agua estéril que contenía 0.05% de Tween 20. La suspensión de esporangiosporas fue ajustada  $2.5 \times 10^6$  esporas/mL. La concentración fue determinada en una cámara de Neubauer (Sánchez *et al.*, 2005).

Se utilizaron cuatro cepas bacterianas en este estudio, las cuales fueron: *Campylobacter jejuni* 5653 donada por la Dra. Irene Wesley del Centro Nacional de Enfermedades de Animales USDA, Ames, Iowa; ésta cepa se conservó en cultivos de reserva a -80°C en crioviales con glicerol estéril. *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894, fueron conservadas a 4 °C en tubos de tapón de rosca con agar ICC, realizando resiembras cada tres meses. Así mismo, se

trabajó con *Listeria monocytogenes* Scott A, la cual se conservó en cultivos inclinados a 4°C en medio ICC + 0.6 % extracto de levadura.

La activación de la cepa de *Campylobacter jejuni* se realizó de la siguiente manera: se tomaron 50 µl del cultivo mantenido a -80°C y con ellos se inocularon 5 mL de caldo Infusión Cerebro-Corazón (ICC Bioxon) suplementando con extracto de levadura al 0.6%. El cultivo fue incubado a 42°C en condiciones de microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>) durante 48 horas. A partir de los cultivos activados en caldo, se llevaron a cabo resiembras en placas de agar Mueller-Hinton (MH) suplementadas con 5 % de sangre lisada.

En el caso de *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7, se tomó una asada de los cultivos de reserva y con ella se inocularon tubos con 5 mL de caldo ICC, estos se incubaron en condiciones aerobias a 37°C por 18 horas. El procedimiento fue el mismo para la activación de *L. monocytogenes*, con excepción de que el caldo ICC fue sustituido por caldo Soya Tripticasa (TSB).

El inóculo utilizado en los ensayos para las cuatro cepas bacterianas trabajadas fue ajustado al 0.5 del Nefelómetro de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

#### **8.4 Ensayos preliminares de la actividad antimicrobiana**

Con el fin de determinar el efecto antimicrobiano de los diferentes extractos contra las cuatro cepas bacterianas se utilizó el método de difusión en pozo en agar (Torres *et al.*, 2006). El cual se desarrolló de la siguiente manera: sobre la superficie del agar se sembraron por extensión con un asa de Driglalsky 100 µl de las diferentes cepas activadas, se utilizó agar Mueller-Hinton (Bioxon) para *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7; agar Mueller-Hinton (Bioxon) más 5 % de sangre hemolizada para *C. jejuni* y Agar Soya Tripticasa (Difco) en el caso de *L. monocytogenes*.

Se dejaron transcurrir cinco minutos y posteriormente se realizaron pozos sobre la superficie del agar, usando para ello una campana de Durham invertida (5 mm de diámetro) se añadieron 100 µl de cada uno de los extractos a probar; las placas se incubaron a 37°C durante 24 h para *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7 o por 48 h para *L. monocytogenes*. Para *C. jejuni*, las condiciones de incubación fueron de microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>) a 42°C durante 48 h. A la par del ensayo, se adicionaron los diferentes solventes empleados (etanol, metanol y amortiguador de fosfatos) como controles. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

Después del tiempo de incubación, cada placa fue examinada. El efecto de los extractos sobre las bacterias se determinó por la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo.

### **8. 5 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

La determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos se realizó mediante el método de microdilución de acuerdo al PROY-NOM-059-PESC-2004, con algunas modificaciones. Se utilizaron microplacas de 96 pozos (Luber *et al.*, 2003) esterilizadas por exposición a luz UV durante 15 minutos (Figura 2). Para las cepas de *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*, a cada uno de los pozos se les añadió 100 µl de caldo Mueller-Hinton Bioxon (MH) (Luber *et al.*, 2003; Nayak *et al.* 2007; Burt y Reindrs, 2003) y un volumen igual de los extractos en diferentes concentraciones, tal y como se representa en la tabla 5. De manera similar, para la cepa de *L. monocytogenes*, los pozos fueron llenados con 100 µl de caldo Soya Tripticasa Difco (TSB) (Wiggins *et al.*, 1978) y un volumen equivalente de los extractos en diferentes concentraciones, lo cual se ejemplifica en la tabla 5.

Figura 2

Microplaca de 96 pozos usada para determinar la concentración mínima bactericida (CMB).

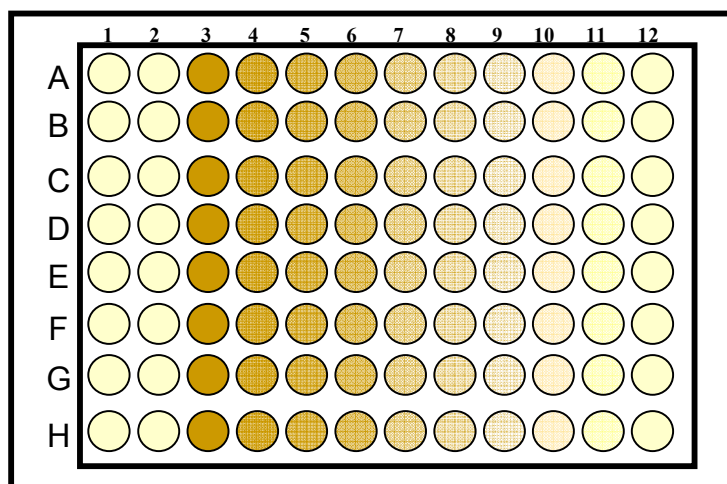


Tabla 5

Preparación de la placa multipozos para la determinación de la CMB.

Columna	Nombre	Contenido
1	Control positivo	100 $\mu$ l de caldo MH o TBS + 5 $\mu$ l de bacteria.
2	Control negativo	100 $\mu$ l de caldo MH o TBS + 5 $\mu$ l de amortiguador de fosfatos estéril.
3	Concentración máxima del extracto	100 $\mu$ l de caldo MH o TBS + 100 $\mu$ l del extracto concentrado + 5 $\mu$ l de bacteria.
4-11	Concentraciones intermedias del extracto	100 $\mu$ l de caldo MH o TBS + 100 $\mu$ l del pozo anterior + 5 $\mu$ l de bacteria.
12	Concentración mínima del extracto.	100 $\mu$ l de caldo MH o TBS + 100 $\mu$ l del pozo anterior y se descartan 100 $\mu$ l + 5 $\mu$ l de bacteria.

Las diferentes cepas de trabajo activadas se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. A partir de ésta, se inocularon las columnas 1 y del 3 al 12 con el 5 % (v/v) de las bacterias ajustadas (Olasupo *et al.*, 2003). La columna número 2 como fue el control negativo, se le añadieron 5  $\mu$ l de amortiguador de fosfatos estéril.

La incubación de las microplacas inoculadas se llevó a cabo de la manera siguiente: para *C. jejuni* fueron incubadas a 42°C durante 48 h en condiciones microaerofílicas (10% CO<sub>2</sub>) (Halbert *et al.*, 2005); para *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7 la placas se incubaron a 37°C por 24 h en aerobiosis (Burt and Reinds, 2002); y en el caso de *L. monocytogenes* se incubaron a 37°C por 48 h.

Pasado el tiempo de incubación, el contenido de cada uno de los pozos fue sembrado por extensión con un asa de Digrafsky en agar Mueller-Hinton suplementado con 5 % de sangre hemolizada (para *C. jejuni*); o por difusión en agar MH (para *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7), y en Agar soya tripticasa (AST) (para *L. monocytogenes*).

Una vez que se estableció el rango de concentraciones en el cual se produjo inhibición del crecimiento, se procedió a determinar la CMB del extracto, la cual fue definida como la concentración mínima del extracto que eliminó el 99.9 % de las bacterias viables después del tiempo de incubación (Horna Quintana *et al.*, 2008).

## **8.6 Fermentación en estado sólido de vegetales con actividad antimicrobiana**

El bioprocesamiento en estado sólido se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Vatterm *et al.*, 2005b. Brevemente, en matraces erlenmeyer de 250 mL se colocaron 20 g de la planta seca, junto con 1 g de CaCO<sub>3</sub>, 40 mL de agua destilada y 1 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno. La boca de los matraces fue cubierta por un tapón hecho a base de algodón y gasa. El medio contenido en los matraces fue esterilizado a 121°C por 20 min. Posteriormente, 240  $\mu$ l de una suspensión de esporas de *R. oligosporus* que contenía  $2.5 \times 10^6$  esporas/mL fue agregada a cada matraz (Keuth and Bisping, 1994). Los matraces fueron incubados a 28°C por 16 días. Para monitorear los

cambios ocurridos en la actividad antimicrobiana de las plantas fermentadas, se muestrearon los días 0, 4, 8, 12 y 16 de la fermentación. Todos los ensayos se realizaron por duplicado con una repetición. Como control de la fermentación, se muestrearon matraces sometidos al mismo procedimiento descrito anteriormente, con excepción de la inoculación de las esporas del hongo.

### **8.7 Extracción de compuestos fermentados**

La obtención de los extractos fermentados se logró de la siguiente manera: se agregaron 200 mL de etanol al 96 % a los matraces sometidos al bioprocesamiento, éstos se homogenizaron durante 2 minutos en una licuadora convencional y posteriormente se dejaron macerando durante 48 h (Nanasombat and Lohasupthawee, 2005). Transcurrido el tiempo de maceración, los extractos fueron filtrados mediante filtros Whatman No 1. A continuación, los filtrados se colocaron en platos de vidrio hasta la completa evaporación del solvente a temperatura ambiente. Posteriormente, los extractos fueron resuspendidos en amortiguador de fosfatos (PBS), 50 mM a pH 7.4.

La fracción soluble se centrifugó a 14 000 r.p.m por 15 minutos. Los extractos obtenidos se esterilizaron por filtración a través de membranas de nitrocelulosa Millipore con un tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$ , los extractos se colocaron en viales de color ámbar y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso. Una alícuota de 1 mL fue tomada de los diferentes extractos para determinar el peso seco de los extractos.

### **8.8 Determinación de Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos fermentados**

La determinación de la CMB de los extractos fermentados se llevo a cabo de acuerdo al PROY-NOM-059-PESC-2004, el cual está basado en los estándares establecidos por la NCCLS. El desarrollo de la metodología se realizó tal y como se describió anteriormente.

## 8.9 Identificación de grupos químicos de los extractos

Se realizó la determinación de los grupos químicos de los diferentes extractos trabajados como se describe a continuación:

### 8.9.1 Hidrocarburos insaturados

Para determinar insaturaciones se empleó la prueba de Bayer, en donde se colocaron 2 gotas del extracto en una placa de porcelana y se agregaron 1-2 mL de acetona (CTR SCIENTIFIC), posteriormente se le agregó gota a gota una solución acuosa de permanganato de potasio (FERMONT) al 1%. La aparición de un precipitado café indicó la presencia de hidrocarburos insaturados (Domínguez, 1988).

### 8.9.2 Saponinas

Para determinar saponinas, se colocó un mililitro del extracto concentrado en una placa de porcelana, posteriormente se agitó vigorosamente con un vortex. La aparición de abundante espuma indicó la presencia de saponinas (Domínguez, 1988).

### 8.9.3 Flavonoides

Para determinar flavonoides se utilizó la Prueba de Shinoda donde el extracto fue mezclado con un fragmento de limadura de magnesio (CTR SCIENTIFIC) y cuatro gotas de ácido clorhídrico concentrado (CTR SCIENTIFIC). La prueba fue positiva cuando se presentaron coloraciones: naranja (flavonas), roja (flavononas), roja azulosa (flavonoles) ó violeta (xantanas o flavonoles) (Domínguez, 1988).

### 8.9.4 Sesquiterpenlactonas

Para determinar los grupos de sesquiterpenlactonas se aplicó la prueba de Legal. En este caso, se depositaron 2 gotas del extracto en una placa de porcelana, se agregaron 3



gotas de piridina (BAKER) y una gota de nitroprusiato de sodio (CTR SCIENTIFIC) al 0.5% y después se añadieron gota a gota, 4 gotas de hidróxido de potasio 2N. Una coloración rosa fue indicio de lactonas  $\alpha$  y  $\beta$  insaturadas (Domínguez, 1988).

#### 8.9.5 Carbohidratos

Se determinaron carbohidratos mediante la prueba de la Antrona. Se colocó una gota de la muestra disuelta en agua con 1 gota de antrona (FERMONT) al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado (EM SCIENCE) sobre una placa de porcelana. La prueba se consideró positiva al formarse un anillo azul-verdoso en la interfase (Domínguez, 1988).

#### 8.9.6 p-benzoquinonas

Para determinar p-benzoquinonas se mezcló una gota de la muestra, sobre una placa de porcelana, con una gota de solución etanólica al 0.2% de p-nitrofenilacetoniitrilo (ALFA AESAR) y 1 gota de hidróxido de sodio (CTR SCIENTIFIC). La prueba fue positiva al observarse una coloración azul o violeta (Domínguez, 1988).

#### 8.9.7 Alcaloides

Se utilizó la prueba de Dragendorff para determinar alcaloides. Para esto se realizaron dos soluciones. La solución A se preparó mezclando 8 gr de nitrato de bismuto (FERMONT) con 20 mL de ácido nítrico (CTR SCIENTIFIC) al 30%; y la solución B mezclando 27.2 gr de yoduro de potasio (TECNICA QUIMICA) en 50 mL de agua. Se mezclaron las soluciones A y B y se dejaron reposar 24 hr. Esta mezcla se filtró y se aforó a 100 mL con agua bidestilada. Se agregaron unas cuantas gotas de este reactivo a la muestra que se había colocado en una placa de porcelana. La prueba fue positiva cuando se presentó un precipitado de color naranja-marrón (Domínguez, 1988).

#### 8.9.8 Cumarinas

Se determinaron cumarinas con la prueba de Emerson. Se mezclaron 0.5% de carbonato de calcio (MERCK), 0.9% de 4-aminoantipirina (SPECTRUM), 5.4% de ferrocianuro de potasio (CTR SCIENTIFIC) en agua, una gota de esta mezcla se agregó a una gota de la muestra sobre una placa de porcelana. La prueba fue positiva al observarse una coloración amarilla (Domínguez, 1988). Por otro lado también se mezcló la muestra con una gota de hidróxido de sodio (CTR SCIENTIFIC) al 10%; una coloración amarilla indicó la presencia de cumarinas (Domínguez, 1988).

#### 8.9.9 Aldehídos y cetonas

Para la determinación de aldehídos y cetonas, sobre una placa de porcelana, a una gota del extracto se le agregaron 2 gotas de etanol (DEQ) y 1 gota de 2,4-dinitrofenilhidracina (SPECTRUM), para lo cual se disolvió en caliente 5 gr de 2,4-dinitrofenilhidracina en 60 mL de ácido fosfórico (CTR SCIENTIFIC) al 85%, se diluyeron con 39.5 mL de etanol y después se filtró. La presencia de un precipitado rojo indicó positivo para carbonilos aromáticos, un precipitado anaranjado indicó carbonilos  $\alpha$  o  $\beta$  insaturados y/o un precipitado amarillo fue positivo para carbonilos saturados (Domínguez, 1988).

#### 8.9.10 Cloruros

Para detectar cloruros, en una placa de porcelana se colocó 1 gota de extracto y se disolvió en agua bi-destilada (3 mL) y se le añadieron 2 o 3 gotas de una solución de nitrato de plata, la cual se preparó disolviendo 10 mg de nitrato de plata (CTR SCIENTIFIC) con 20 mL de agua bi-destilada. Para la presencia de cloruros se presentó un precipitado blanco (Domínguez, 1988).

### 8.9.11 Taninos

En la determinación de taninos, se disolvió 1 mL de la muestra en 1 mL de agua y 1 mL de etanol (DEQ), se añadieron unas gotas de cloruro férrico (CTR SCIENTIFIC) al 5% en etanol (p/v); una coloración verde oscuro o negra fue indicativo de hidroxilos fenólicos. (Domínguez, 1988).

### 8.10 Determinación de fenoles totales

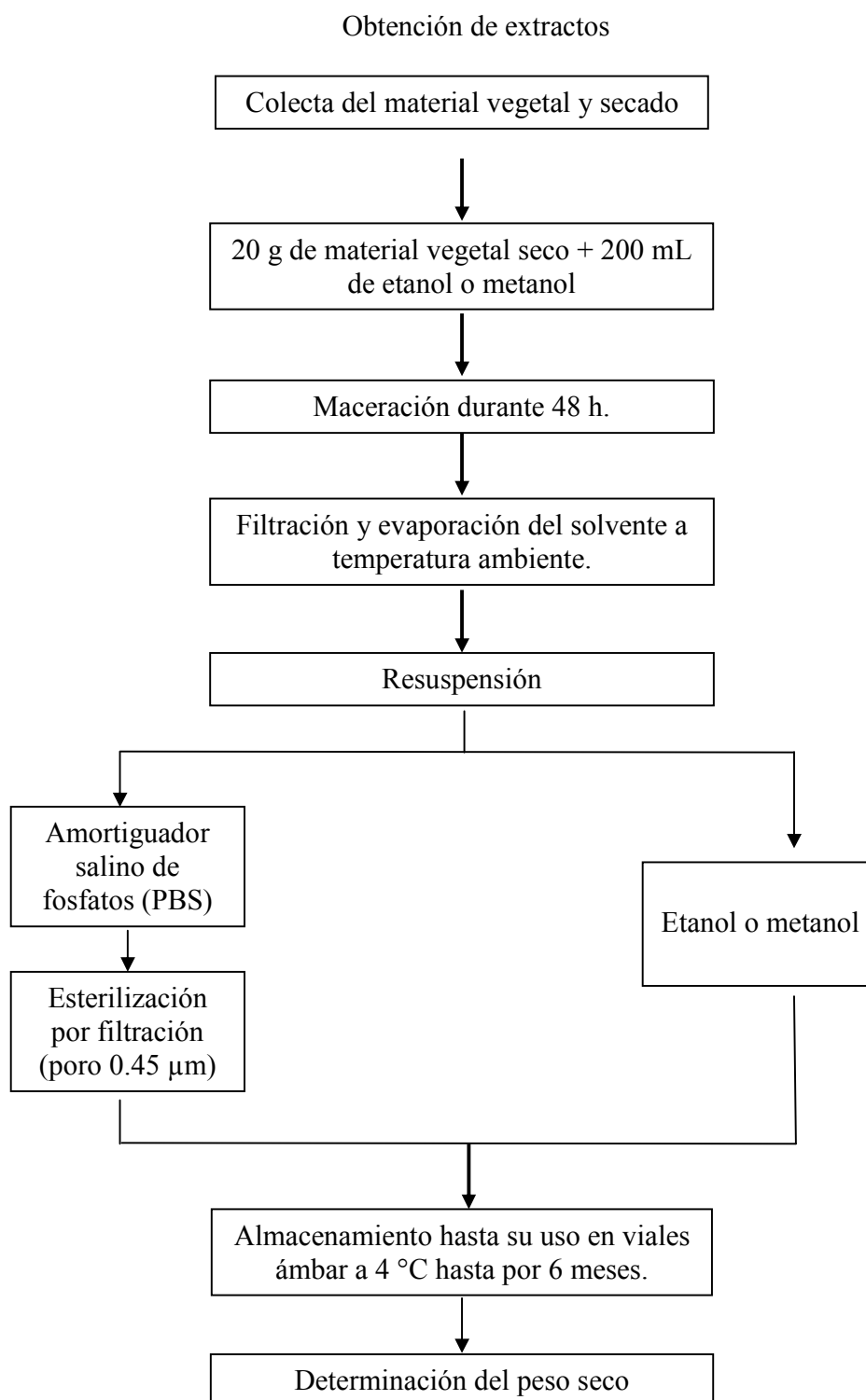
El método de Folin-Ciocalteu descrito por Waterhouse (2005) fue usado para la determinación de fenoles totales en los extractos. Brevemente, 20  $\mu$ l de extracto se colocaron en una celda desechable para espectrofotómetro. Enseguida se añadieron 1.58 mL de agua y 100  $\mu$ l de reactivo de Folin (Merck). El contenido de la cubeta se mezcló y posteriormente se dejó reposar de 1 a 8 minutos.

Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 300  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200g/L), se mezcló y después se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La medición de la absorbancia de las muestras se hizo a 765 nm en el SPECTRONIC<sup>®</sup> Genesys 5.

Para la determinación de concentraciones de fenoles, se utilizó una curva estándar de calibración con ácido gálico (SIGMA). La cual se realizó de la manera siguiente: se disolvieron 0.5 g de ácido gálico en 10 mL de etanol y se completó a 100 mL con agua (concentración final 5 g/L). Se diluyeron 1, 2, 5 y 10 mL de la solución anterior en 100 mL de agua para crear estándares con concentraciones de 50, 100, 250 y 500 mg/L, respectivamente.

### 8.11 Análisis estadístico

Todos los resultados evaluados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA), además de la prueba de comparación de medias de Dunnett, a través del paquete estadístico SigmaStat.

**DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS:**

## Ensayos preliminares de actividad antimicrobiana de los extractos

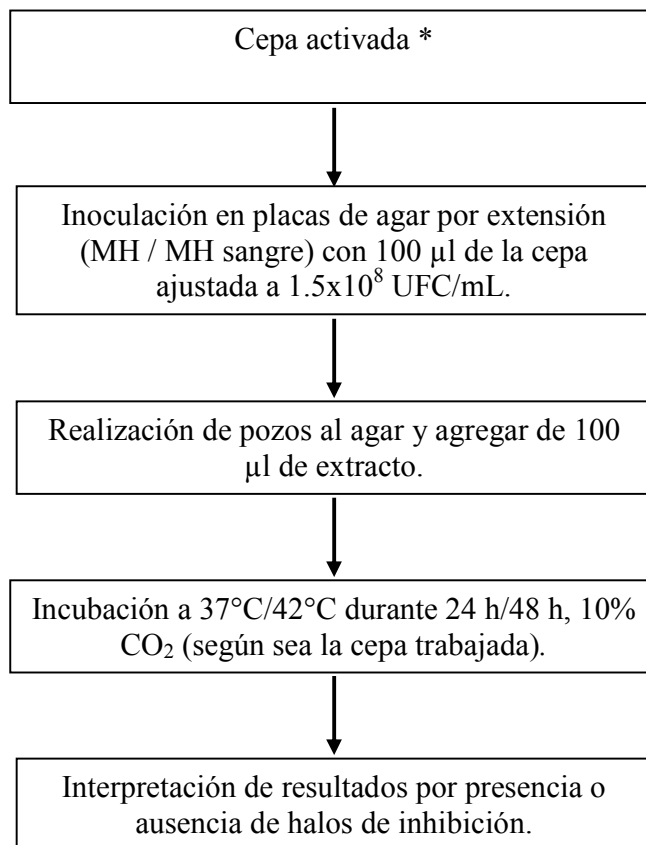
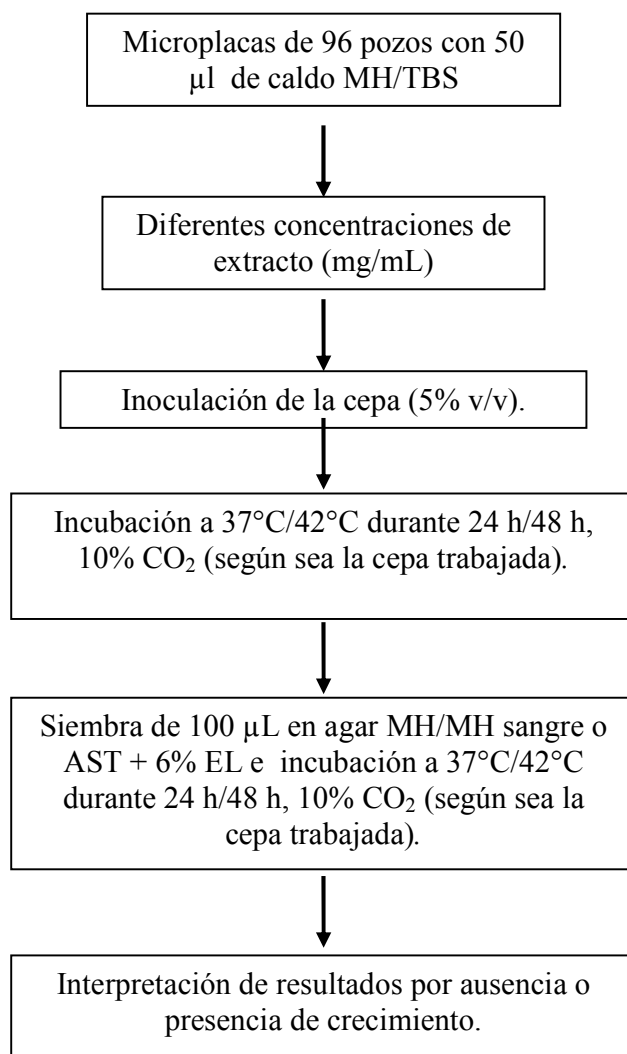


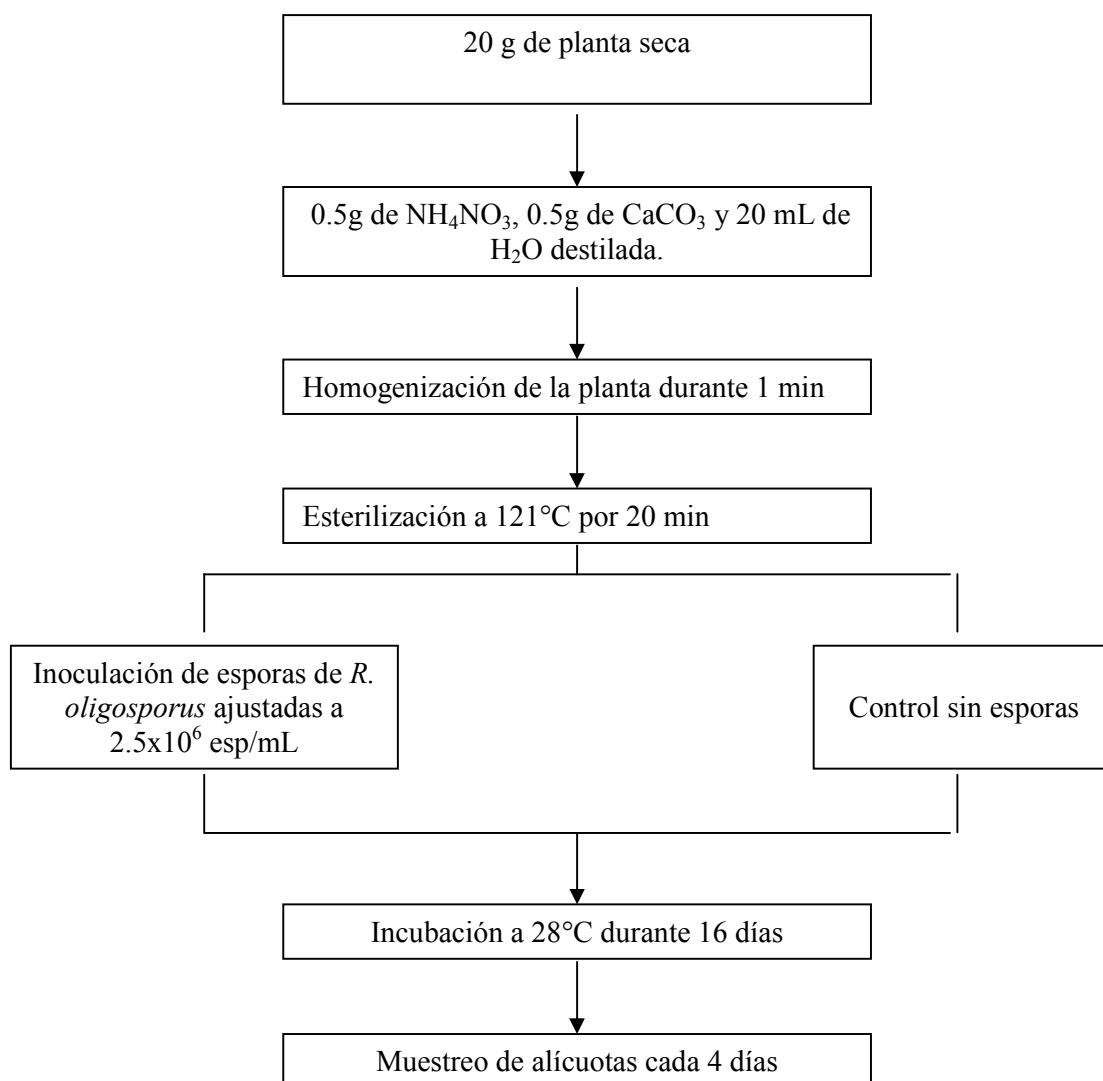
Tabla 6  
Activación de las cepas bacterianas empleadas.

* = Activación de cepas
❖ <i>C. jejuni</i> en agar MH/sangre incubada a 42°C durante 48h, 10% CO <sub>2</sub> .
❖ <i>L. monocytogenes</i> en AST incubada a 37°C durante 48h.
❖ <i>S. Typhimurium</i> en agar MH incubada a 37°C durante 24h.
❖ <i>E. coli</i> O157:H7 en agar MH incubada a 37°C durante 24h.

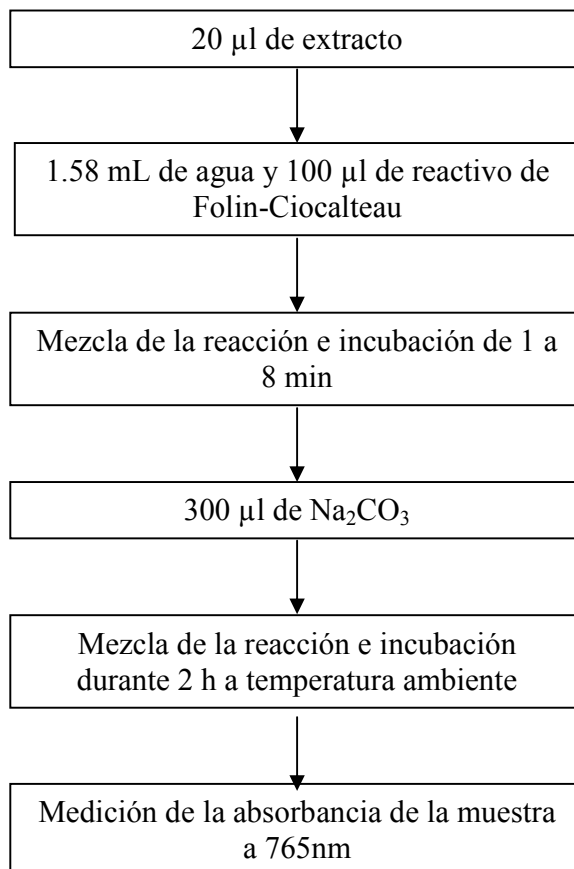
## Determinación de la CMB.



## Ensayos de fermentación

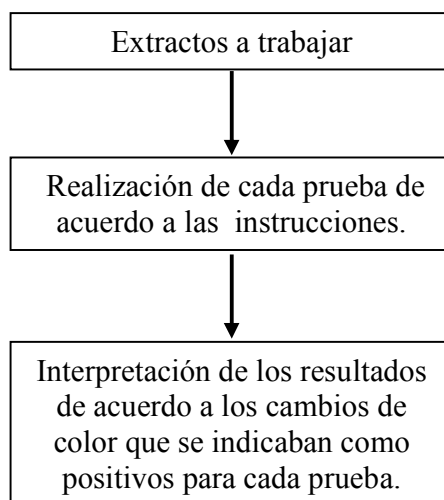


## Determinación de la concentración de fenoles





Determinación de grupos funcionales de los extractos.



## RESULTADOS

### 9.1 Ensayos Preliminares de la Actividad Antimicrobiana

El efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos y etanólicos de 30 muestras vegetales (un total de 71 extractos) fueron evaluados contra cuatro importantes patógenos transmitidos por alimentos (Tabla 7). No todos los extractos probados presentaron un efecto antimicrobiano contra las cepas bacterianas estudiadas, además, aún cuando algunos mostraban actividad contra alguna de ellas, no era así frente al resto de las bacterias. Los extractos que manifestaron mayor actividad antimicrobiana contra las cuatro bacterias fueron *Citrus aurantifolia* (Limón colima), *Prunus* spp. (Ciruela) y *Fragaria* spp. (Fresa); razón por la cual, para los ensayos restantes se trabajó sólo con ellos. Tanto los extractos metanólicos como etanólicos de estas tres frutas exhibieron un efecto antimicrobiano similar, sin embargo se optó por seleccionar los etanólicos resuspendidos en PBS, debido a que estos son menos tóxicos para el consumo humano, porque no contienen alcohol. En las figura 3, 4, 5 y 6 se muestran el efecto antimicrobiano de algunos extractos mediante el método de difusión en pozo en agar contra los patógenos utilizados en este estudio.

Tabla 7

Efecto antimicrobiano de extractos de plantas comestibles (hojas, semillas, tallos, frutos y raíces) mediante el método de difusión de pozo en agar sobre el crecimiento de *Campylobacter jejuni* 5653, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y *Listeria monocytogenes* Scott A.

Planta	Solvente	Resus- pensión	Bacteria estudiada			
			<i>E. coli</i> O157:H7 43894	<i>S.</i> Typhimu- rium 14028	<i>L.</i> <i>monocyt</i> <i>genes</i> Scott A	<i>C. jejuni</i> 5653
Papaya	Metanol	PBS	—	—	—	NP
Papaya	Etanol	PBS	—	—	—	NP
Cebolla	Etanol	PBS	—	—	—	NP
Cebolla	Etanol	Etanol	—	—	—	NP
Anís	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Anís	Metanol	Metanol	—	—	—	—
Anís	Etanol	PBS	—	—	—	—
Calabaza (s)	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Calabaza (s)	Etanol	PBS	—	—	—	—
Calabaza (s)	Metanol	Metanol	—	—	—	—
Ajo	Etanol	PBS	—	—	—	—
Ajo	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Albahaca	Etanol	Etanol	+	+		NP
Jamaica	Metanol	PBS	+	+	+	++
Jamaica	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Jamaica	Etanol	PBS	—	—	—	—
Jicama	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Epazote	Etanol	PBS	—	—	—	—

Tabla 7 (continuación)

Planta	Solvente	Resuspensión	Bacteria estudiada			
			<i>E. coli</i> O157:H7 43894	<i>S.</i> Typhimurium 14028	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> Scott A	<i>C.</i> <i>jejuni</i> 5653
Pimienta negra (s)	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Pimienta negra (s)	Etanol	PBS	—	—	—	—
Pimienta negra (s)	Metanol	Metanol	—	—	—	—
Hierbabuena	Etanol	Etanol	—	—	—	NP
Hierbabuena	Etanol	PBS	—	—	—	—
Nopal	Metanol	Metanol	—	—	—	—
Nopal	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Nopal	Cloroformo		—	—	—	—
Piña (f)	Etanol	Etanol	—	—	—	++
Piña (f)	Metanol	PBS	—	—	—	—
Piña (c)	Etanol	PBS	—	—	—	++
Limón colima	Etanol	PBS	++	++	++	++ ++
Limón colima	Etanol	Etanol	++	++	++	++ ++
Girasol (s)	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Girasol (s)	Etanol	PBS	—	—	—	—

(Tabla 7 continuación)

Planta	Solvente	Resus- pensión	Bacteria estudiada			
			<i>E. coli</i> O157:H7 43894	<i>S.</i> Typhimu- rium 14028	<i>L.</i> <i>monocyt</i> <i>genes</i> Scott A	<i>C.</i> <i>jejuni</i> 5653
Ciruela	Etanol	PBS	+	+	+	+++
Ciruela	Metanol	Metanol	+	+	+	+++
Ciruela	Etanol	Etanol	+	+	+	+++
Ciruela pasa	Etanol	PBS	+	+	+	+++
Ajonjolí	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Ajonjolí	Metanol	Metanol	—	—	—	—
Ajonjolí	Etanol	PBS	—	—	—	—
Comino	Etanol	Etanol	—	—	+	+
Comino	Metanol	Metanol	—	—	+	+
Comino	Etanol	PBS	—	—	—	—
Clavo	Etanol	PBS	+	+	+	++
Clavo	Metanol	Metanol	+	+	NP	NP
Clavo	Etanol	Etanol	+	NP	NP	NP
Guayaba	Etanol	PBS	—	—	—	—
Guayaba	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Guayaba	Metanol	Metanol	—	—	—	—
Alpiste	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Alpiste	Metanol	Metanol	—	—	—	—
Mijo rojo	Etanol	PBS	—	—	—	—
Mijo rojo	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Mijo rojo	Metanol	Metanol	—	—	—	—

(Tabla 7 Continuación)

Planta	Solvente	Resus- pensión	Bacteria estudiada			
			<i>E. coli</i> O157:H7 43894	<i>S.</i> Typhimu- rium 14028	<i>L.</i> <i>monocytog</i> <i>genes</i> Scott A	<i>C.</i> <i>jejuni</i> 5653
Repollo	Etanol	PBS	—	—	—	—
Repollo	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Repollo	Metanol	Metanol	—	—	—	—
Granada (f)	Etanol	PBS	+	+	+	++
Granada (s)	Etanol	PBS	+	+	+	++
Granada (c)	Etanol	Etanol	+	+	+	++
Betabel	Etanol	PBS	—	—	—	—
Orégano	Etanol	PBS	—	—	—	—
Orégano	Metanol	Metanol	+	—	+	++
Orégano	Etanol	Etanol	+	—	+	++
Naranja agria	Etanol	Etanol	+	+	+	++
Mostaza negra (s)	Etanol	Etanol	—	—	—	—
Mostaza negra (s)	Metanol	Metanol	—	—	—	—
Mostaza negra (s)	Etanol	PBS	—	—	—	—
Fresa	Etanol	PBS	+	+	+	+++
Fresa	Metanol	Metanol	+	+	+	+++
Fresa	Etanol	Etanol	+	+	+	+++

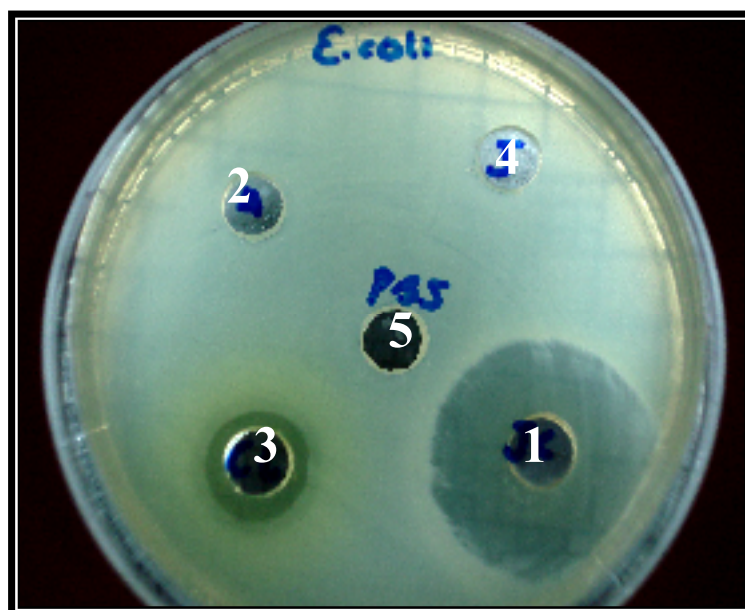
- +**: Poca inhibición (diámetro de 0-5 mm)
- ++**: Inhibición (diámetro de 6-10 mm)
- +++**: Buena inhibición (diámetro de 11-15 mm)
- ++++**: Muy buena actividad (diámetro >15 mm)
- : No exhibió inhibición

NP: No se probó

(f): Fruta

(s): Semilla

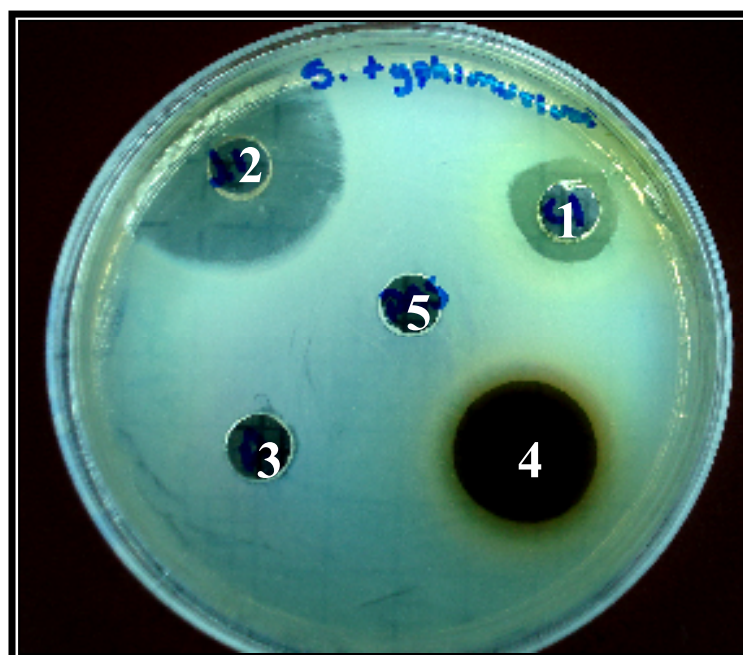
(c): Cáscara



- 1: Jicama
- 2: Alpiste
- 3: Semilla de Granada
- 4: Limón colima
- 5: Control (PBS)

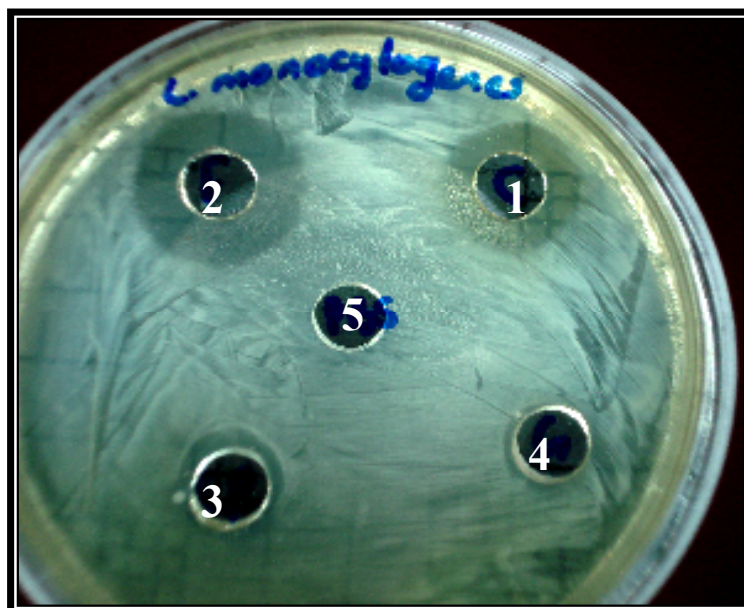
Figura 3. Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de vegetales por el método de difusión en pozo en agar con la cepa de *E. coli* O157:H7 ATCC 43894.





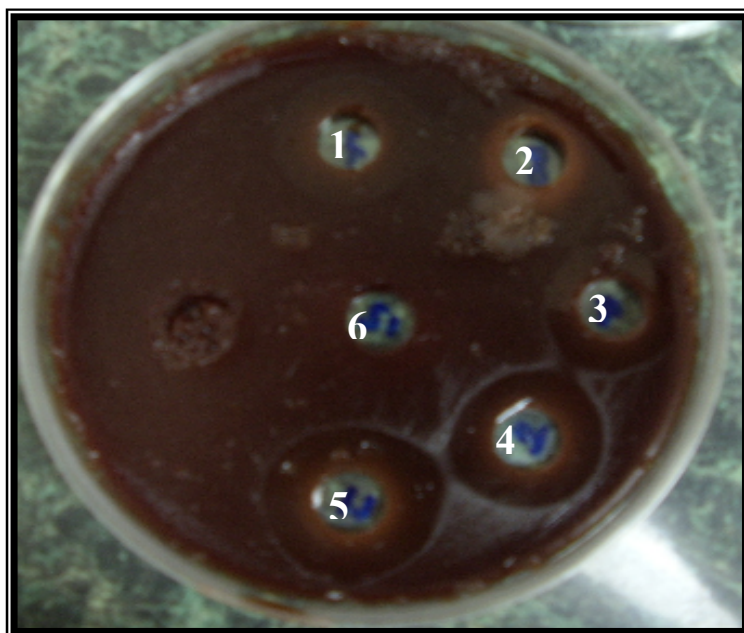
- 1: Ciruela
- 2: Limón colima
- 3: Anís
- 4: Jamaica
- 5: Control (PBS)

Figura 4. Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de vegetales por el método de difusión en pozo en agar con la cepa de *S. Typhimurium* ATCC 14028.



- 1: Ciruela
- 2: Fresa
- 3: Piña
- 4: Girasol
- 5: Control (PBS)

Figura 5. Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de vegetales por el método de difusión en pozo en agar con la cepa de *L. monocytogenes* Scott A.



- 1: Jamaica
- 2: Granada (fruto)
- 3: Piña
- 4: Ciruela
- 5: Fresa
- 6: Control (PBS)

Figura 6. Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de vegetales por el método de difusión en pozo en agar con la cepa de *Campylobacter jejuni* 5653.

## 9.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Los ensayos para la determinación de la CMB, les fueron realizados sólo a los extractos etanólicos que exhibieron un mayor efecto antibacteriano contra las cuatro cepas bacterianas trabajadas, lo cuales fueron *Citrus aurantifolia* (Limón colima), *Prunus* spp. (Ciruela) y *Fragaria* spp. (Fresa). La CMB de estos extractos varió con respecto a la bacteria estudiada, estableciéndose los rangos de 9.8 a 42.5 mg/mL para *E. coli* O157:H7, 8.5 a 42.5 mg/mL para *S. Typhimurium* y 9.7 a 47 mg/mL para *L. monocytogenes*. Mientras que *C. jejuni* mostró ser más sensible que las otras tres cepas, encontrando las CMB en rangos de 1.7 a 5.4 mg/mL. Todos estos resultados se muestran más a detalle en la Tabla 8.

Tabla 8

Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos etanólicos seleccionados contra *C. jejuni* 5653, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *L. monocytogenes* Scott A.

Microorganismo estudiado	CMB del Extracto (mg/mL)		
	Limón colima	Ciruela	Fresa
<i>C. jejuni</i> 5653	2 ± 0.08*	1.7 ± 0.2	5.4 ± 0.7
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	9.86 ± 0.4	30.86 ± 0.7	42.6 ± 0.81
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	8.5 ± 1.2	27.83 ± 1.06	42.47 ± 0.54
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	9.7 ± 0.45	30.6 ± 0.81	46.5 ± 2.58

\* Desviación estándar

### 9. 3 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos fermentados

Los cambios en la actividad antimicrobiana de extractos de fresa, ciruela y limón colima contra *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* fueron determinadas a diferentes tiempos durante la fermentación en estado sólido. La actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos en los días 0, 4, 8, 12 y 16 del bioprocesamiento con *R. oligosporus* no presentaron una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto a los controles.

Al igual que en la determinación de la CMB de los extractos no fermentados, la CMB de las tres frutas fermentadas fue más baja contra *C. jejuni* que contra las otras bacterias estudiadas.

La actividad antimicrobiana de los extractos de la fresa bioprocesada contra las bacterias, se situó en el rangos entre 2.1 a 2.6 mg/mL para *C. jejuni*, de 67.2 a 69.5 mg/mL para *E. coli* O157:H7, de 66 a 69 mg/mL para *S. Typhimurium* y de 66.5 a 70 mg/mL para *L. monocytogenes* (Tabla 9).

Al comparar la actividad antimicrobiana de extractos de la fresa biotransformada con la del extracto de la misma fruta sin fermentar, se observó una muy ligera reducción de la CMB contra *C. jejuni*, la cual fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), mientras que para *L. monocytogenes*, se registró una ligera reducción de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de la fermentación en estado sólido con respecto al extracto sin fermentación de la fresa, éste incremento en la CMB fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). No obstante, para el resto de las bacterias no se presentó cambio significativo en la actividad antimicrobiana de la fresa (Tablas 8 y 9).

Tabla 9

Comparación de la CMB del extracto de Fresa durante los días 0, 4, 8, 12 y 16 de la fermentación en estado sólido con *R. oligosporus*, contra cuatro cepas enteropatógenas.

Día de Fermentación		CMB de la Fresa (mg/mL)			
		<i>C. jejuni</i> 5653	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	<i>S.</i> Typhimurium ATCC 14028	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> Scott A
0	E	2.25 ± 0.3*	69.5 ± 1	68.2 ± 2.4	69.5 ± 1
	C	2.25 ± 0.3	68.7 ± 2.5	68 ± 1.6	69 ± 1.1
4	E	2.37 ± 0.26	69.2 ± 1.5	69 ± 1.1	70 ± 1.6
	C	2.15 ± 0.19	68.2 ± 2.4	68.2 ± 2.4	69 ± 1
8	E	2.32 ± 0.15	69.2 ± 0.9	68.2 ± 1.7	68.5 ± 2
	C	2.37 ± 0.26	69.5 ± 1	68.5 ± 1.9	68.75 ± 1
12	E	2.37 ± 0.26	67.2 ± 2.2	66 ± 1.4	65.75 ± 1.7
	C	2.47 ± 0.25	67.5 ± 5	69.2 ± 1	66.5 ± 4.4
16	E	2.55 ± 0.37	67.5 ± 2.8	69.2 ± 1	68.5 ± 2.3
	C	2.65 ± 0.17	69.2 ± 1	67.7 ± 2.1	69.2 ± 1

E: Ensayo

C: Control

\*: Desviación estándar

La actividad antimicrobiana de los extractos bioprocesados de la ciruela contra los cuatro patógenos estudiados se encontró en rangos de 2.7 a 3 mg/mL para *C. jejuni*, de 43.1 a 46.5 mg/mL para *E. coli* O157:H7, de 67.5 a 71.5 mg/mL para *S. Typhimurium* y de 69.5 a 72.6 mg/mL para *L. monocytogenes* (Tabla 10).

A pesar de que estadísticamente no existió una diferencia significativa entre los extractos a diferentes tiempos del bioprocesamiento, ni contra ninguno de los controles del ensayo, si se advirtieron diferencias entre la actividad antimicrobiana de los extractos biotransformados de la ciruela y el extracto sin fermentar de la misma, estos cambios sólo fueron significativos ( $p < 0.05$ ) en la CMB contra *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, lo cual se observó como un gran aumento de la concentración mínima bactericida (Tablas 8 y 10).

Tabla 10

Comparación de la CMB del extracto de Ciruela durante los días 0, 4, 8, 12 y 16 de la fermentación en estado sólido con *R. oligosporus*, contra cuatro cepas enteropatógenas.

Día de Fermentación		CMB de la Ciruela (mg/mL)			
		<i>C. jejuni</i> 5653	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	<i>S.</i> Typhimurium ATCC 14028	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> Scott A
0	E	2.9 ± 0.04*	46.2 ± 1.5	71 ± 1.5	69.5 ± 1.9
	C	2.9 ± 0.07	45.4 ± 1.2	71 ± 1.1	70 ± 1
4	E	2.95 ± 0.1	45 ± 2.5	71.5 ± 1	70.5 ± 2.4
	C	2.8 ± 0.27	46.5 ± 1.7	69 ± 1.1	69 ± 3
8	E	2.88 ± 0.13	43.7 ± 2.1	68.7 ± 2.9	69.8 ± 3
	C	2.9 ± 0.33	46 ± 2.8	69 ± 1.1	72.6 ± 2.1
12	E	2.87 ± 0.14	44.75 ± 2.6	68.75 ± 2.2	71 ± 2.6
	C	2.78 ± 0.17	44.4 ± 3.6	71 ± 1.1	68.6 ± 1.4
16	E	3 ± 0.14	44.6 ± 1.4	67.5 ± 2.9	69 ± 1.1
	C	2.94 ± 0.26	43.1 ± 1.6	71 ± 1.1	71.5 ± 2

E: Ensayo

C: Control

\*: Desviación estándar

Por su parte, para el limón las CMB se ubicaron entre 1.4 a 1.8 mg/mL para *C. jejuni*, de 8 a 11.5 mg/mL para *E. coli* O157:H7, de 9 a 13 mg/mL para *S. Typhimurium* y de 8.5 a 12.2 mg/mL para *L. monocytogenes* (Tabla 11). Además, al comparar las CMBs del extracto sin fermentar con los obtenidos durante el proceso de biotransformación, no se presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ) (Tablas 8 y 11).

Tabla 11

Comparación de la CMB del extracto de limón colima durante los días 0, 4, 8, 12 y 16 de la fermentación en estado sólido con *R. oligosporus*, contra cuatro cepas enteropatógenas.

Día de Fermentación		CMB del Limón colima (mg/mL)			
		<i>C. jejuni</i> 5653	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	<i>S.</i> Typhimurium ATCC 14028	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> Scott A
	E	1.4 ± 0.16*	8.7 ± 1.2	11.8 ± 1.2	8.7 ± 0.5
	C	1.3 ± 0.1	8 ± 0.8	10 ± 1.4	11.2 ± 0.9
4	E	1.7 ± 0.34	10.25 ± 0.95	11.75 ± 1.5	11.7 ± 0.5
	C	1.8 ± 0.23	9.5 ± 0.6	13 ± 0	10.5 ± 1.7
8	E	1.8 ± 0.28	8.5 ± 1.91	11 ± 2.3	10.5 ± 1.9
	C	1.7 ± 0.38	11.5 ± 1.3	13 ± 1.4	12.2 ± 0.5
12	E	1.7 ± 0.34	10.5 ± 1.73	11 ± 0.8	11.2 ± 0.9
	C	1.5 ± 0.3	9 ± 0.8	10.5 ± 1.3	12.5 ± 0.6
16	E	1.8 ± 0.1	10 ± 0.81	11 ± 0.8	10.5 ± 1.7
	C	1.5 ± 0.25	9 ± 1.1	9 ± 1.1	11.75 ± 0.9

E: Ensayo de fermentación

C: Control

\* Desviación estándar



#### 9.4 Identificación de grupos químicos de los extractos

Se realizó la determinación mediante reacciones colorimétricas de los grupos químicos presentes en los extractos de frutas fermentadas y sin fermentar (Figura 7). Para los extractos sin fermentar, los resultados muestran la presencia de hidrocarburos insaturados, carbohidratos, p-benzoquinonas, alcaloides y taninos en el extracto *Fragaria* spp. (Fresa). Para *Prunus* spp. las pruebas indican la presencia de saponinas, carbohidratos, alcaloides, cumarinas y taninos. Mientras que para *Citrus aurantifolia* (Limón colima) se determinó la presencia de hidrocarburos insaturados, saponinas, carbohidratos, p-benzoquinonas, alcaloides, cumarinas, y taninos (Tabla 12).

En el caso de los extractos de las frutas bioprocesadas, los grupos químicos encontrados fueron los mismos que para las frutas sin fermentar, con excepción de los carbohidratos, los cuales no fueron detectados en los extractos bioprocesados.

Tabla 12

Grupos funcionales presentes en los extractos de fresa, ciruela y limón colima y sus extractos fermentados.

Prueba	Extractos sin Fermentar			Extractos Fermentados ( <i>R. oligosporus</i> )		
	Fresa	Ciruela	Limón colima	Fresa	Ciruela	Limón colima
Hidrocarburos insaturados	+	—	+	+	—	+
Saponinas	—	+	+	—	+	+
Flavonoides	—	—	—	—	—	—
Sesquiterpenlactonas	—	—	—	—	—	—
Carbohidratos	+	+	+	—	—	—
p-benzoquinonas	+	—	+	+	—	+
Alcaloides	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	—	+	+	—	+	+
Aldehídos y cetonas	—	—	—	—	—	—
Cloruros	—	—	—	—	—	—
Taninos	+	+	+	+	+	+

+: Positivo

—: Negativo

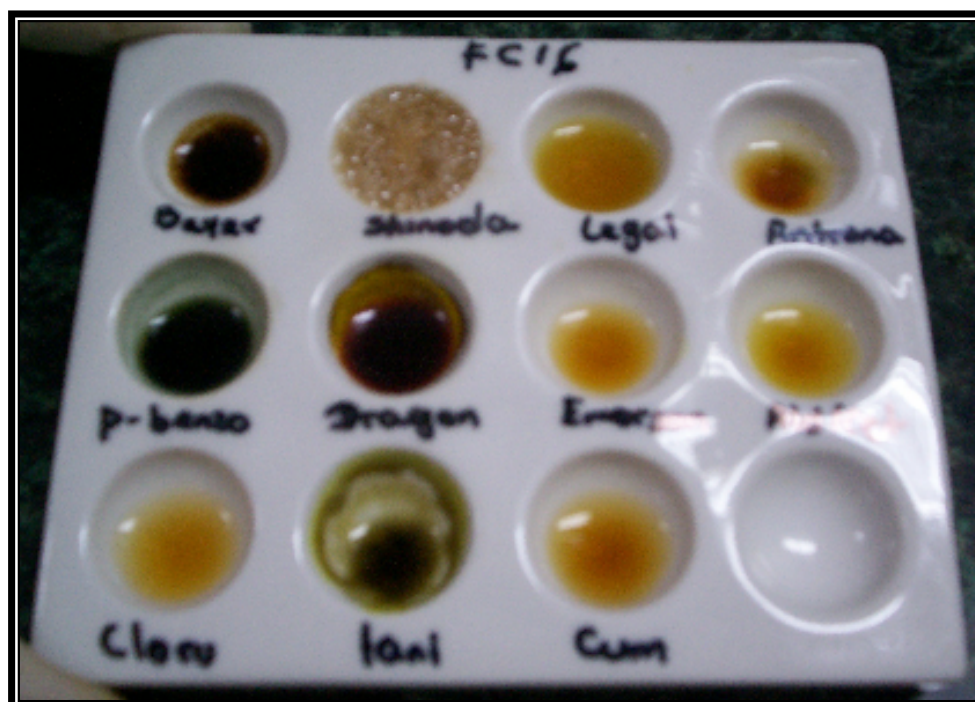


Figura 7. Placa de porcelana que muestra las reacciones colorimétricas realizadas para la determinación de grupos funcionales un extracto de *Fragaria* spp. (Fresa) bioprocada por *R. oligosporus*.

### 9.5 Determinación de Fenoles Totales

El contenido total de fenoles solubles en los extractos fue medido mediante el método de Folin-Ciocalteu. Y para determinar la concentración de los fenoles, se realizó una curva de calibración con ácido gálico, con concentraciones de 50, 100, 150, 200, 300 y 500 ppm, la cual se muestra en la figura 8.

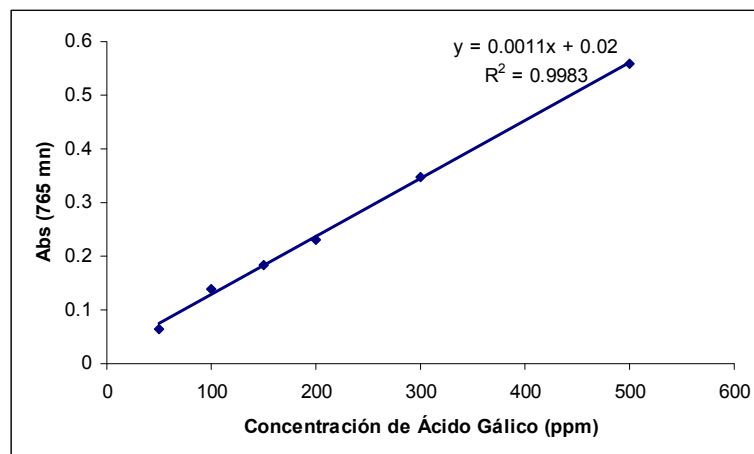


Figura 8. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación la concentración de fenoles totales.

Se efectuó la determinación de la concentración de fenoles totales en los extractos de fresa, ciruela y limón colima. Encontrándose que la ciruela contenía una mayor concentración de estos compuestos, seguida por la fresa y finalmente, el limón colima (Tabla 13). Las concentraciones fueron expresadas en mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra (mg GAE/g).

La determinación de la concentración de fenoles totales de la fresa, la ciruela y el limón colima bioprocesados y el posterior análisis estadístico no reveló diferencias significativas de los extractos de los diferentes días de fermentación con respecto al control del día cero, ni entre ellos mismos (Tabla 13). Sin embargo, se logró apreciar un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) entre la concentración de fenoles totales de las frutas antes y después de ser sometidas a esterilización por calor para los ensayos de fermentación (Tablas 13 y 14).

Tabla 13

Contenido de Fenoles Totales en extractos etanólicos de fresa, ciruela y limón colima.

Extractos analizados			
Fenoles Totales (mg GAE/g)	Fresa	Ciruela	Limón colima
	60 ± 7.16	98.7 ± 5.0	50.7 ± 1.6

mg GAE/g: mg equivalentes a mg de ácido gálico/ gramo de muestra.

Tabla 14

Contenido de Fenoles Totales en los extractos de fresa, ciruela y limón colima durante los días 0, 4, 8, 12 16 de fermentación con *R. oligosporus*.

Día de fermentación		Contenido de Fenoles Totales (mg GAE/g)		
		<i>Fragaria</i> spp. (Fresa)	<i>Prunus</i> spp. (Ciruela)	<i>Citrus aurantifolia</i> (Limón colima)
0	E	305.22 ± 7.10	348.6 ± 16.5	286.2 ± 31
	C	302.2 ± 46.21	318.7 ± 19.6	278.3 ± 20.6
4	E	268.2 ± 31.2	349.5 ± 35.1	208.6 ± 16.2
	C	303.9 ± 34.1	333.3 ± 17.8	188.1 ± 54.6
8	E	326.5 ± 34.9	427.7 ± 20	215.5 ± 34.62
	C	280.7 ± 50.9	363.2 ± 19.4	259.4 ± 34.3
12	E	322.1 ± 15.8	356.9 ± 25.5	270.2 ± 32.8
	C	338.9 ± 20.8	324.6 ± 58	195 ± 23.8
16	E	253.1 ± 4.7	293 ± 35.3	224 ± 25.6
	C	320.9 ± 22.4	332.5 ± 11.2	231.6 ± 38.4

E: Ensayo

\*: Desviación estándar

C: Control

mg GAE/g: mg equivalentes a mg de ácido gálico/ g de muestra

## DISCUSION

El hombre ha utilizado por muchos años las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en fármacos o en preparaciones tradicionales, con la finalidad de controlar ciertas enfermedades infecciosas y en últimas fechas de vencer los problemas de resistencia de los microorganismos a los antibióticos, así como los efectos dañinos que poseen algunos antimicrobianos de origen químico utilizados como conservadores (Rangel *et al.*, 2001). Hoy en día, las plantas continúan jugando un papel importante en el cuidado de la salud como remedios terapéuticos en muchos países en desarrollo (Zaidan *et al.*, 2005).

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006).

La mayoría de las hierbas y especias usadas como ingredientes en alimentos exhiben actividad antimicrobiana; entre las se encuentran por ejemplo el apio, cilantro, laurel, almendra, albahaca, café, puerro, rábano picante, hierbabuena, tomillo, etc. Los aceites esenciales y extractos derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006).

En este estudio, analizamos 30 plantas comestibles, dentro de las que figuraban hojas, tallos, semillas, raíces y frutos contra cuatro patógenos transmitidos por alimentos: *C. jejuni*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*. Algunas de las plantas estudiadas han sido reportadas previamente con actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006; Zohri *et al.*, 1995; Osato *et al.*, 1993). Sin embargo, al probar los extractos contra nuestras cepas de estudio, algunos de estos no presentaron efecto antimicrobiano. La razón de estos resultados, puede

entenderse al considerar los factores que pudieran influenciar las pruebas de actividad antimicrobiana, que de acuerdo a Friedman y colaboradores (2002), se incluyen el tipo de extracción la composición y solubilidad del extracto trabajado, la cepa del microorganismo analizado, el método de crecimiento y de recuperación de las bacterias sobrevivientes. Además, del tiempo y la temperatura de extracción, así como del solvente y la concentración del mismo utilizados para la obtención del extracto (Cowan, 1999; Spigno *et al.*, 2007).

Después de realizar un ensayo preliminar acerca del efecto antimicrobiano de los 71 extractos analizados, se seleccionaron tres, que fueron los que presentaron el mejor efecto inhibitorio contra *C. jejuni* 5653, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *L. monocytogenes* Scott A; y estos fueron, los extractos etanólicos de fresa (*Fragaria* spp.), ciruela (*Prunus* spp.) y limón colima (*Citrus aurantifolia*). La actividad antimicrobiana de los extractos mencionados contra nuestras cuatro bacterias fue evaluada mediante la técnica de pozo en agar y el establecimiento de la CMB.

Las concentraciones bactericidas del extracto de fresa (*Fragaria* spp.) fueron de 42.6 mg/mL a 46.5 mg/mL, para todas las cepas excepto la cepa de *C. jejuni*, la cual fue la más sensible de los cuatro patógenos. Previamente, se ha reportado que extractos acuosos de fresa producen un efecto de inhibición del 20 al 34 % contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, de igual modo que extractos alcohólicos producen una inhibición de 10% del crecimiento de *Shigella flexneri* (Ríos *et al.*, 2005). Así mismo, que extractos fenólicos (ricos en elagitaninos) y acetónicos son efectivos para inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*, *Bacillus cereus*, *C. jejuni*, *Candida albicans*, *S. Typhimurium* y una cepa mutante de *E. coli* (Nohynek *et al.*, 2006; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001).

De acuerdo a diversos autores, la actividad antimicrobiana de la fresa es dada por compuestos fenólicos como elagitaninos, ácido gálico, flavonoides, flavonoles, flavonas, ácidos fenólicos y antocianinas (Nohynek *et al.*, 2006; Vatter *et al.*, 2005b; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001).

La CMB del extracto de ciruela (*Prunus* spp.) contra las bacterias estudiadas se estableció entre 27.8 mg/mL y 30.8 mg/mL, excepto para *Campylobacter jejuni*, debido a la CMB se encontró en 1.7 mg/mL. De manera similar, algunos reportes muestran que la ciruela pasa y el jugo de ésta (en concentraciones de 10 y 5 % respectivamente, en un medio de cultivo líquido) son capaces de reducir hasta en 2 log UFC/mL el crecimiento de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus* (Thompson, 2001). También se ha reportado que el jugo concentrado de ciruela fresca puede prevenir el crecimiento de *E. coli* y *S. Typhimurium* en medio líquido; así como la actividad bactericida de extractos metanólicos contra *Vibrio cholerae* y *Clostridium perfringens* (2-6 mg/mL) y de la fracción butanólica de la ciruela contra bacterias gram positivas y gram negativas (Thompson, 2005; Sánchez *et al.*, 2007; Rashid *et al.*, 2007).

En la literatura, se sugiere que la actividad antimicrobiana de los extractos y jugos de ciruela, es conferida por compuestos activos fenólicos como hidroxicinamatos, ácido neoclorogénico, ácido clorogénico y flavonoides (Thompson, 2005; Rashid *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, obtuvimos una concentración mínima bactericida del limón colima (*Citrus aurantifolia*) de 2 mg/mL para *C. jejuni*. Por su parte, para el resto de las bacterias se localizó entre 8.5 mg/mL a 9.7 mg/mL. Estudios previos corroboran la actividad antimicrobiana del limón contra algunas cepas bacterianas patógenas y deteriorantes, aunque difieren en las concentraciones utilizadas. Así, la concentración mínima inhibitoria de extractos de limón ha sido publicada contra *Lactobacillus plantarum* (169.9 ppm), *Candida albicans* (133.3 ppm), *Saccharomyces cerevisiae* (27.7 ppm), *Bacillus cereus* (53.9 ppm) y sus esporas (24.5 ppm) (Conte *et al.*, 2007). Del mismo modo, se ha reportado que jugos concentrados de limón inhiben el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* (Tomotake *et al.*, 2006); además de poseer capacidades intrínsecas para reducir en 5 log UFC el conteo de *L. monocytogenes* y 6 log UFC a *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 a -11°C (Nogueira *et al.*, 2003); y en un modelo alimenticio de mejillones rellenos, el limón causó la reducción de 0.56 UFC/g a los 15 min de exposición (Kışla, 2007).



En relación a los principios activos del aceite esencial del limón, los reportes hacen mención de monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cumarinas y furanocumarinas, citroflavonoides, flavononas, algunas flavonas y la vitamina C (Fisher and Philips, 2008; Benavente-García *et al.*, 1997; Conte *et al.*, 2007; Shiva Ramayoni, 2007).

En general, *C. jejuni* fue la cepa más sensible a la actividad antimicrobiana de los extractos probados en este estudio. Estos resultados son inconsistentes con reportes previos ya que se reporta una mayor resistencia de esta cepa con respecto a *E. coli* O157:H7 y *S. enterica* frente a múltiples aceites esenciales (Friedman *et al.*, 2002). No obstante, un reporte previo refiere la alta sensibilidad del género *Campylobacter* a extractos etanólicos de platas con respecto a bacterias del género *Salmonella* (Valtierra Rodríguez, 2008). Estas discrepancias entre los resultados de los estudios pudieran ser explicadas por diferencias en los métodos de preparación de los extractos, la utilización de un aceite esencial o un extracto, la sensibilidad de las cepas o de los métodos de ensayo y las condiciones de crecimiento (Freidman *et al.*, 2002). El hecho de utilizar un aceite esencial o un extracto afecta de manera diferente la resistencia de los microorganismos, esto es ilustrado en un reporte previo, en el cual se compara la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la canela contra un extracto etanólico de la misma, frente a *Bacillus* sp., *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Klebsiella* sp., presentando mayor actividad antimicrobiana el aceite esencial contra las tres cepas (Gupta *et al.*, 2008).

Una vez que establecimos las concentraciones mínimas bactericidas para nuestras tres frutas seleccionadas contra las bacterias en estudio, procedimos a realizar los ensayos de fermentación en estado sólido con un hongo grado alimenticio: *Rhizopus oligosporus*. La finalidad de nuestro ensayo era incrementar la actividad antimicrobiana de nuestros extractos, así como la concentración de fenoles totales de contenidos en los mismos. Esto está fundamentado ya que existen trabajos previos sobre el bioprocésamiento en estado sólido de algunas plantas con *Lentinus edodes* donde se incrementa la actividad antimicrobiana propia de frutas, esto sugiere que el incremento en el contenido de

fenoles y polifenoles durante la biotransformación incrementa el efecto antimicrobiano de los extractos contra *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus* y *E. coli* O157:H7 (Vattem *et al.*, 2004).

En nuestro estudio, la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de las frutas fermentadas en estado sólido, fue determinada a diferentes tiempos durante el crecimiento del hongo *R. oligosporus*. En general, la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos no presentó cambios estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ) entre los días muestreados, ni con respecto a los controles del ensayo. Estos resultados difieren con lo mencionado en investigaciones anteriores, debido a que en éstas se presentan cambios en la actividad antimicrobiana, los cuales son señalados como un incremento gradual, que muestra su mayor actividad en uno o dos días de la fermentación, sin embargo después del cual(es) se ve reducida la actividad (Vattem *et al.*, 2004, 2005b; McCue., *et al.*, 2004, 2005). Los autores de estos trabajos mencionan que al variar el solvente empleado para la extracción (agua y etanol), los días en que se presenta la mayor actividad antimicrobiana difieren. Así mismo, los resultados de la utilización de dos fuentes diferentes de nitrógeno ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$  y proteína hidrolizada de pescado) para el crecimiento de los hongos durante la fermentación, muestran contra algunas bacterias diferencias en los días en los que se presenta la mayor actividad antimicrobiana (Vattem *et al.*, 2004). El mismo autor, en una investigación acerca de la fermentación en estado sólido del arándano con *R. oligosporus* y *L. edodes* para incrementar la actividad antimicrobiana de la fruta contra *Helicobacter pylori*, no coincide del todo con los días de mayor actividad antimicrobiana con respecto al primer trabajo (Vattem *et al.*, 2005b). De esta manera, las diferencias en nuestros resultados con respecto a los reportes previos pudieran explicarse por diferencias en las frutas trabajadas, en tipo de solvente utilizado para la extracción, en el hongo utilizado, en la sensibilidad de las cepas analizadas, así como en los métodos utilizados para determinar la actividad antimicrobiana.

Con la finalidad de comprobar la segunda parte de nuestra hipótesis, es decir, verificar si la concentración de fenoles totales aumentaba durante la biotransformación

de la fresa, la ciruela o el limón con *R. oligosporus*, se realizó la medición de estos compuestos antioxidantes a diferentes tiempos durante el crecimiento del hongo. El análisis estadístico no reveló cambios significativos ( $p > 0.05$ ) en las concentraciones de fenoles solubles totales en los extractos de los diferentes días del ensayo, ni con respecto a los controles del mismo (Tabla 14). Nuestros resultados no concuerdan con Vatterm y colaboradores (2004 y 2005b), ya que en sus estudios mencionan que al biofermentar el arándano con *L. edodes* y *R. oligosporus*, se observa la mayor concentración de fenoles totales en el día 10 del ensayo, y posteriormente un descenso. No obstante, en el estudio se presentan diferencias en las concentraciones de fenoles totales en relación al hongo utilizado para el bioprocesamiento. En otro trabajo, llevado a cabo por Correira *et al.*, (2004), en el cual, la pulpa de guayaba y la harina de soya utilizada como fuente de nitrógeno son mezcladas en dos proporciones diferentes y biotransformadas por *R. oligosporus*, se menciona que el contenido de fenoles totales se ve incrementado durante los primeros días de la fermentación o durante los últimos, dependiendo de la proporción guayaba-harina de soya utilizado. Así que, al igual que durante la comparación de los resultados de la actividad bactericida de los extractos fermentados de nuestro estudio y los encontrados en la literatura (Vatterm *et al.*, 2004, 2005b; Correira *et al.*, 2004), las variaciones en los días con mayor concentración de fenoles totales, pudieran deberse al tipo de fruta y cepa del hongo que empleamos en nuestro estudio.

Aunque no se manifestó un cambio estadístico significativo entre las concentraciones de fenoles totales de los diferentes días muestreados durante la fermentación de la fresa, la ciruela y el limón, si existió una marcada variación entre el contenido de fenoles totales antes y después de someter las frutas a esterilización por calor, tal y como se muestra en las tablas 13 y 14. Este fenómeno ha sido reportado con anterioridad en semillas de mango calentadas entre los 100°C y 160°C (Soong and Barlow, 2004). Esto podría deberse a la formación de sustancias fenólicas a temperaturas no muy altas. Soong y Barlow (2004), sugieren que la formación de compuestos fenólicos durante un proceso de calentamiento puede ser debido a la disponibilidad de precursores de moléculas fenólicas, por interconversión no enzimática entre moléculas fenólicas sujetas

a los efectos de factores externos, como la temperatura y el tiempo de exposición; así mismo como a la composición propia de la planta. Kim *et al.*, (2006), también reportaron el incremento del contenido de fenoles en extractos con etanol al 70 % y acuosos del fruto del palo santo, después de ser sometido a un tratamiento por calor a 150 °C por 60 min. Xu y colaboradores (2006), demostraron que al someter la cáscara de toronja a un tratamiento térmico moderado, se produce un incremento en el contenido de ácidos fenólicos libres, mientras que los esteres y glucósidos de ácidos fenólicos disminuyen.

Con el aumento de la concentración de fenoles solubles de la fresa sometidos a esterilización por calor, se observó una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) de la CMB contra *C. jejuni*, en relación a la CMB del extracto de fresa sin calentar. Lo cual podría deberse a que los polifenoles presentes en los extractos calentados ejercen su actividad antimicrobiana a través de una hiper-acidificación del ambiente interno de la célula o en la inhibición de la ATPasa (Vattem *et al.*, 2005b). Varios estudios muestran una estrecha correlación entre los compuestos fenólicos y la inhibición de bacterias como *H. pylori* (Correira *et al.*, 2004; Vattem *et al.*, 2005b). En el caso de *L. monocytogenes*, se registró una reducción significativa en la actividad antimicrobiana de los extractos fermentados de la fresa, lo cual nos podría indicar que el efecto antibacteriano de estos extractos contra *L. monocytogenes* involucra varios compuestos además de los fenoles.

En el caso particular de los extractos del limón, aún y cuando los extractos fermentados mostraron un incremento significativo en el contenido de fenoles, no existió cambio significativo en las concentraciones bactericidas para las cuatro bacterias, entre los extractos sometidos a un tratamiento térmico y los que no. Lo cual, podría sugerir que los principales mecanismos implicados en el efecto bactericida de limón colima contra *C. jejuni*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*, no implican directamente a compuestos fenólicos.

Los extractos obtenidos de la ciruela esterilizada por calor, exhibieron un aumento significativo de la CMB contra *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*. Uno de los principales componentes antimicrobianos activos reportados para la ciruela es el ácido clorogénico (Thompson, 2005), el cual se encuentra también en la alcachofa. En un estudio publicado por Curadi y colaboradores (2005), se demostró que después de hervir las cabezas de alcachofa en agua durante 20 minutos, se observaba una pérdida del 44% del ácido clorogénico contenido.

Haciendo referencia sobre las concentraciones de fenoles totales de la fresa, la ciruela y el limón no fermentados obtenidos en nuestro estudio; obtuvimos una concentración de 60 mg GAE/g de muestra seca para el extracto de fresa. Los reportes acerca de la concentración de fenoles totales en fresa son muy variados, citando algunas concentraciones tan bajas como 299.07 µg/g de fruta fresca (Herranz *et al.*, 2007), pasando por valores de 94 mg GAE/100 g de fruta (80% de maduración) (Wang and Lin, 2000), 230 -340 mg GAE/100mg de fruta fresca y 2000-2800 mg GAE/100 mg de peso seco (Aaby *et al.*, 2007), hasta 460 mg GAE/g de material seco (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001).

El extracto de ciruela no fermentada mostró una concentración de 98.7mg GAE/g de fruta seca. Investigadores refieren concentraciones de fenoles totales en ciruela de 125 – 684.6 mg GAE/100mg de muestra fresca (Kim *et al.*, 2003; Lombarda-Boccia *et al.*, 2004). Para el limón no fermentado, la concentración de fenoles totales obtenida en nuestro estudio fue de 50.7 mg GAE/g de fruta seca. Estas discrepancias en los resultados de nuestro análisis y las referencias bibliográficas, pudieran deberse a factores como el estado de maduración de la fruta al tiempo de la cosecha, estación de maduración, tipo de cultivo y recolección, condiciones ambientales previas a ésta, diferencias genéticas, condiciones de almacenamiento y procesamiento de la fruta (Vattem *et al.*, 2005b; Wang and Zheng, 2001; Connor *et al.*, 2002).

Con respecto a los resultados obtenidos en la caracterización de compuestos fitoquímicos presentes en los extractos etanólicos de fresa, ciruela y limón, tanto los

bioprocesados con *R. oligosporus*, como aquellos que no lo fueron (Tabla 12), son reconocidos por diversos autores como antimicrobianos.

Se detectó la presencia de saponinas en los extractos de ciruela y limón fermentados y no fermentados. Se sabe que estos compuestos son activos contra algunas bacterias y virus, debido a que reducen la tensión superficial de los lípidos de la membrana provocando alteraciones en las mismas, lo que con lleva a la muerte celular, para ello se sugiere la formación de complejos con el colesterol presente en la membrana (Kazanjian y Fariñas, 2006).

Las p-benzoquinonas fueron detectadas en los extractos de fresa y limón tanto para los fermentados como para los que no lo eran. Domingo y López-Brea (2003), mencionan que el potencial antimicrobiano de las quinonas es debido a la formación de complejos con aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, dando con ello una inactivación o una anulación de la función de dichas proteínas. Cowan (1999), añade además que las quinonas tienen como blancos probables las adhesinas expuestas en la superficie de la célula, los polipéptidos de la pared celular y la enzimas unidas a la membrana.

La prueba de Dragendorff reveló la presencia de alcaloides en los extractos de fresa, ciruela y limón fermentados y no fermentados. El mecanismo antimicrobiano propuesto para estos compuestos, es descrito mediante interacciones entre la pared celular, así como la habilidad para intercalarse con el DNA del microorganismo (Domingo y López-Brea, 2003) o bien para inhibir la biosíntesis de ácidos nucleicos (Kazanjian y Fariñas, 2006).

Los taninos fueron detectados en los extractos fermentados y no fermentados de las tres frutas estudiadas; se ha propuestos que estos compuestos fenólicos inactivan las adhesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras etc., o desnaturalizan las proteínas (Cowan, 1999; Kazanjian y Fariñas, 2006).

La prueba de Emerson mostró la presencia de cumarinas en los extractos de ciruela y limón fermentados y no fermentados. Domingo y López-Brea (2003), sugieren que el mecanismo de acción de este grupo de compuestos es mediante la interacción con el DNA, señalando que la actividad de las cumarinas se ha reportado contra algunas levaduras y virus.

### CONCLUSIONES:

- ❖ De 71 extractos analizados, tres demostraron ser los más efectivos para inhibir el crecimiento en placa de *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*.
- ❖ *Campylobacter jejuni* mostró ser la cepa más sensible a los extractos probados de fresa, ciruela y limón colima, en comparación con *S. Typhimurium*, *E. coli* O157: H7 y *L. monocytogenes*.
- ❖ La actividad antimicrobiana de la fresa se incrementó o disminuyó después de la esterilización por calor, dependiendo de la bacteria trabajada; mientras que para la ciruela dicha actividad aumentó o se mantuvo después del tratamiento térmico; por su parte para el limón, no existió cambio alguno en el efecto antimicrobiano, lo cual indica que el calor en extremo puede o no afectar la actividad antimicrobiana de las frutas dependiendo de las cepas estudiadas.
- ❖ La biotransformación en estado sólido de la fresa, la ciruela y el limón por *R. oligosporus* no produce cambios substanciales en la actividad antimicrobiana, ni en el contenido de fenoles solubles totales de estas frutas.
- ❖ Se detectó la presencia de diversos grupos químicos con actividad antimicrobiana en los extractos evaluados; como carbohidratos, saponinas, hidrocarburos insaturados, p-benzoquinonas, alcaloides, cumarinas y taninos.
- ❖ La concentración de fenoles totales se incremento significativamente para las tres frutas probadas, después de la esterilización por calor, aun y cuando la actividad de dichos extractos disminuyera, indicando así, que la actividad de la fresa, la ciruela y el limón contra *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* y *L.*



*monocytogenes*, es debida principalmente a mecanismos mediados por compuestos diferentes a compuestos fenólicos.

### LITERATURA CITADA

Aaby K, Wrolstad RE, Ekeberg D, Skrede G. 2007. Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees: Impact of achene level and storage. *J. Agric. Food Chem.* 55:5156-5166.

Bärlocher F, Graça MAS. 2007. Total Phenolics. In: *Methods to Study Litter Decomposition: A practical Guide*, Graça MAS, Bärlocher F, Gessner O (eds). Springer: The Netherlands, pp. 97-100.

Baylis CL, MacPhee S, Martin KW, Humphrey TJ, Betts RP. 2000. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *J. Appl. Microbiol.* 89:884-891.

Benavente-García O, Castillo J, Marin FR, Ortuño A, Del Río JA. 1997. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45(12):4505-4515.

Brat P, Georgé S, Bellamy A, Du Chaffaut L, Scalbert A, Mennen L, Arnault N, Amiot MJ. 2006. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J. Nutr.* 136(9):2368-2373.

Burt SA, Reinders RD. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 36:162-167.

Burt SA, Vlierlander R, Haagsman HP, Veldhuizen EJA. 2005. Increase in activity of essential oil components carvacol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizer. *J. Food Prot.* 68(5):919-926.

Butzler JP. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:868-876.

Connor AM, Luby JJ, Hancock JF, Berkheimer S, Hanson EJ. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *J. Agric. Food Chem.* 50:893-898.

Conte A, Speranza B, Sinigaglia M, Del Nobile MA. 2007. Effect of lemon extract on foodborne microorganisms. *J. Food Prot.* 70(8):1896-1900.

Correia RTP, McCue P, Magalhães MMA, Macêdo GR, Shetty K. 2004. Phenolic antioxidant enrichment of soya flour-supplemented guava waste by *Rhizopus oligosporus*-mediated solid-state bioprocessing. *J. Food Biochem.* 28:404-418.

Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4):564-582.

Curadi M, Ceccarelli N, Picciarelli P, Graifenberg A. 2005. Quali-quantitative determination of chlorogenic acid in artichoke heads by means of RP- HPLC and GC/MS. *ISHS Acta Hort.* 681:511-516.

D'Aoust JY. 1997. Especies de *Salmonella*. En: *Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y Fronteras*, Doyle MP, Beuchat LR y Montville TJ (eds). Acribia: España, pp. 133-163.

D'Aoust JY. 2001. *Salmonella*. In: *Guide to Foodborne Pathogens*, Labbé RG and García S (eds). Wiley-Interscience: USA, pp. 163-191.

Datta AR. 2003. *Listeria monocytogenes*. In: *Internacional Handbook of Foodborne Pathogens*, Miliotis MD and Bier JW (eds). Marcel Dekker: USA, pp. 105-121.

Desrosier NW. 2003. *Conservación de Alimentos*. Compañía Editorial Continental: México, pp. 288-289.

Dirección General de Epidemiología, 2008. Anuarios de Morbilidad 1984-2007 [Internet]. Secretaría de Salud Pública. Disponible en el sitio de red: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/index.html#> [Revisado el 8 de Octubre del 2008].

Dóka O, Bicanic D. 2002. Determination of total polyphenolic content in red wines by means of the combined He-Ne laser optothermal window and folin-ciocalteau colorimetry assay. *Anal. Chem.* 74(9):2157:2161.

Domingo D, López-Brea M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioter.* 16(4):385-393.

Domínguez XA. 1988. Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa (eds): México, pp. 39-43.

Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. En: Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y Fronteras. Doyle MP, Beuchat LR y Montville TJ (eds). Acribia: España, pp. 177-198.

Dykes GA, Vegar M, Vanderlinde PB. 2003. Quantification of *Listeria* spp. contamination on shell and flesh of cooked black tiger prawns (*Penaeus monodon*). *Lett. Appl. Microbiol.* 37:309-313.

El-Mansi EMT, Bryce CFA, Harley BS. 1999. Fermentation Biotechnology: An Historical Perspective. In: Fermentation Microbiology and Biotechnology, El-Mansi EMT and Bryce CFA (eds). Taylor & Francis: UK, pp. 1-8.

Eslava C, Villaseca J, Hernandez U. 2003. *Escherichia coli*. In: International Handbook of Foodborne Pathogens, Miliotis MD, Bier JW (eds). Marcel Dekker: USA, pp. 125-135.

Farber JM, Peterkin PI. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 55(3):476-511.

Feng P. 2001. *Escherichia coli*. In: Guide to Foodborne Pathogens, Labbé RG and García S (eds). Wiley-Interscience: USA, pp. 143-162.

Fisher K, Philips C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends Food Sci. Tech. 19:156-164.

Flores Hernández M. 2006. Incidencia de los patógenos *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en la leche cruda en los tanques de enfriamiento en vaquerías de Puerto Rico. Tesis (Maestría). Universidad de Puerto Rico.

Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J. Food Prot. 65(10):1545-1560.

Ge B, White DG, McDermott PF, Girard W, Zhao S, Hubert S, Meng J. 2003. Antimicrobial-resistant *Campylobacter* species from retail raw meats. Appl. Environ. Microbiol. 69(5):3005-3007.

Gupta C, Garg AP, Uniyal RC, Kumasi A. 2008. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. Afr. J. Microbiol. Res. 2:247-251.

Halbert LW, Kaneene JB, Mansfield LS, Ruegg PL, Warnick LD, Wells SJ, Fossler CP, Campbell AM, Geiger-Zwald M. 2005. Comparison of automated microbroth dilution and agar dilution for antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolated from dairy sources. J. Antimicrob. Chemother. 56:686-691.

Hanes D. 2003. Nonthyphoid Salmonella. In: International Handbook of Foodborne Pathogens, Milliotis MD and Bier JW (eds). Marcel Dekker: USA, pp. 137-150.

Harrington SM, Dudley E, Nataro J. 2006. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. FEMS Microbiol. Lett. 254:12-18.

Herranz D, Recamales AF, Meléndez-Martínez AJ, González-Miret ML, Heredia FJ. 2007. Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa Duch.*) grown in two different soilless systems. J. Agric. Food. Chem. 55:1846-1852.

Horna Quintana G, Silva Díaz M, Vicente Tabeada W, Tamariz Ortiz J. 2008. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.upch.edu.pe/famed/rmh/16-1/v16n1ao6.htm> [Revisado el día 10 de Octubre del 2008].

Hu L, Kopecko DJ. 2003. Campylobacter Species. In: International Handbook of Pathogens, Miliotis MD, Bier JW (eds). Marcel Dekker: USA, pp. 181-198.

Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ. 2003. Utilization of folin-ciocalteau phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. J. Agric. Food Chem. 51:1811-1815.

ILRI Research Foundation/ Risk Science Institute, Expert Panel on *Listeria monocytogenes* In Foods. 2005. Achieving continuous improvement in reproduction in foodborne listeriosis- a risk-based approach. J. Food Prot. 69(9):1932-1994.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1987. Microbiología médica. El Manual Moderno: México, pp. 247-250.

Jiménez-Escrig A, Rincón M, Pulido R, Saura-Calixto F. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. J. Agric. Food Chem. 49:5489-5493.

Joshi VK, Bhutani VP, Thakur NK. 1999. Composition and Nutrition of Fermented Products. In: Biotechnology: Food Fermentation Microbiology, Biochemistry and Technology. Vol 1, Pandey A, Joshi VK (eds). Educational Publishers & Distributors: India, pp. 259-313.

Kähkönen MP, Hopia AI, Vourela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing Phenolic compounds. J Agric. Food Chem. 47:3954-3962.

Keuth S, Bisping B. 1994. Vitamin B12 Production by *Citrobacter freundii* or *Klebsiella pneumoniae* during Tempeh fermentation and proof of enterotoxin absence by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60(5):1495-1499.

Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY. 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. J. Agric. Food Chem. 51:6509-6515.

Kim SY, Jeung SM, Jeon KI, Park E, Lee SC. 2006. Effect of heat treatment on the antioxidative antigenotoxic activity of extracts from persimmon (*Diospyros kaki* L.) peel. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70(4):999-1002.

Kişla D. 2007. Effectiveness of lemon juice in the elimination of *Salmonella Typhimurium* in stuffed mussels. J. Food Prot. 7(12):2847-2850.

Kizanjian A, Farias M, 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). Rev. Biol. Trop. 54(3):189: 200.

Krishna C. 2005. Solid-state fermentation systems-an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25(1/2):1-30.

Lawley TD, Bouley DM, Hoy YE, Gerke C, Relman DA, Monack D. 2008. Host Transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. *Infect. Immun.* 76(1):403-416.

Li Q, Sherwood JS, Logue CM. 2006. Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. *Lett. Appl. Microbiol.* 44:86-91.

Lin YT, Know YI, Labbé RG, Shetty K. 2005. Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated urease by oregano and cranberry phytochemical synergies. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12):8558-8564.

Logue CM, Sherwood JS, Oiah PA, Elijah LM, Dockter MR. 2003. The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. *J. Appl. Microbiol.* 94:16-24.

Lombarda-Boccia G, Lucarini M, Lanzi S, Aguzzi A, Cappelloni M. 2004. Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: A comparative study. *J. Agri. Food Chem.* 52:90-94.

Luber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. 2003. Comparison of broth microdilution, E test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* 41(3):1062-1068.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food source and bioavailability. *Am. J Clin. Nutr.* 79:727-47.



McCue P, Lin YT, Labbé RG, Shetty K. 2004. Sprouting and solid-state bioprocessing by *Rhizopus oligosporus* increase the *in vitro* antibacterial activity of aqueous soybean extracts against *Helicobacter pylori*. Food Biotech. 18(2):229-249.

McCue P, Lin YT, Labbé RG, Shetty K. 2005. Characterization of the effect of sprouting or solid-state bioprocessing by dietary fungus on the antibacterial activity of soybean extracts against *Listeria monocytogenes*. Food Biotech. 19(2):121-136.

Meldrum RJ, Tucker D, Edwards C. 2004. Baseline Rates of *Campylobacter* and *Salmonella* in raw chicken in Wales, United Kingdom, in 2002. J. Food Prot. 67(6):1226-1228.

Moromi Nakata H, Martinez Cadillo E. 2006. Efecto del té verde en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans*. Odontol. Sanmarquina. 9(2):23-24.

Nachamkin I. 1997. *Campylobacter jejuni*. En: Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y Fronteras, Doyle MP, Beuchat LR, Montville BT (eds). Acribia: España, pp. 168-176.

Nanasombat S, Lohasupthawee P. 2005. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against Salmonellae and other enterobacteria. KMITL Sci. Tech. J. 5(3):527-538.

Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol Rev. 11(1):142-201.

Nayak R, Call V, Kaldhone P, Tyler C, Anderson G, Philips S, Kerdahi K, Foley SL. 2007. Comparasion of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg susceptibility testing results. Clin. Med. Res. 2:98-105.

Nogueira MCL, Oyarzábal OA, Gombas DE. 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in Cranberry, lemon, and lime juice concentrates. *J. Food Prot.* 66(9):1637-1641.

Nohynek LJ, Alakomi HL, Kahkonen MP, Heininen M, Helander IM, Oksman-Caldentey KM, Puupponen-Pimiä RH. 2006. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against several human pathogens. *Nutrition and Cancer* 54(1):18-32.

O'Bryan CA, Crandall PG, Chalova VI, Ricke SC. 2008. Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *J. Food Sci.* 73(6):M264-M267.

Olasupo NA, Fitzgerald DJ, Gasson MJ, Narbad A. 2003. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. *Lett. App. Microbiol.* 36:448-451.

On SLW. 2005. Taxonomy, Phylogeny, and Methods for the Identification of *Campylobacter* Species. In: *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*, Ketly JM, Konkel ME (eds). Horizon Bioscience: Great Britain, pp. 13-42.

Osato JA, Santiago LA, Remo GM, Cuadra MS, Mori A. 1993. Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya. *Life Sci.* 53(17):1383-1389.

Padilla-Zakour, OI, 2008. Polifenoles: agentes naturales para el control microbiológico. En: Heredia Rojas NL, López García A, Villagrán Padilla C, Téllez Osorio C, Tejada Trujillo F (eds). Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria 2008, 1-3 Octubre 2008. Puebla. México.

Pandey A, Soccol CR, Larroche C. 2008. Introduction. In: *Current Developments in Solid-state Fermentation*, Pandey A, Soccol CR, Larroche C (eds). Springer: India, pp. 3-12.

Parrilla-Cerrillo MC, Vazquez-Castellanos JL, Saldate-Castañeda OS, Nava-Fernández LM. 1993. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Salud Pública Méx.* 35(5).

Payet B, Cheong AS, Smadja J. 2006. Comparasion of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.* 54(9):7270-7276.

Peréz Quilantan LM. 1996. Fermentación en estado sólido del mijo perla (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) por *Rhizopus oligosporus* para la obtención de un producto rico en proteína. Tesis (Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León.

Peterson JJ, Beecher GR, Bhagwat SA, Dwyer JT, Gebhardt SE, Haytowitz BD, Holden JM. 2006. Flavonones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food Compos. Anal.* 19:S74-S78.

Potter NN, Hotchkiss JH. 1995. La fermentación y otras aplicaciones de los microorganismos. En: *Ciencia de los Alimentos*, Potter NN, Hotchkiss JH (eds). Acribia: España, pp. 291, 305.

Pradhal KJ, Variyar PS, Bandekar JR. 1999. Antimicrobial Activity of novel phenolic compounds from green pepper (*Piper nigrum* L.). *LWT-Food Sci. Technol.* 32(2):121-123.

Prajapati JB, Nair BM. 2003. The History of Fermented Foods. In: *Handbook of Fermented Functional Foods*, Farnworth ER (ed). CRC Press: United States of America, pp. 1-25.

Proyecto de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-PESC-2004, que regula el uso de antimicrobianos en el cultivo de crustáceos en la república mexicana.

Puuponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey K-M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries J. Appl. Microbiol. 90:494-507.

Rangel D, García I, Velasco J, Buitrago D, Velazco E. 2001. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos, acetónicos y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers. Rev. Fac. Farma. 42(2):43-46.

Rashid F, Ahmed R, Mahmood A, Ahmad Z, Bibi N, Kazmin SU. 2007. Flavonoid glycosides from *Prunus armeniaca* and antibacterial activity of crude extract. Arch. Pharm. Res. 30(8):932-937.

Raybaudi-Massilia RM, Soliva Fortuna R, Martín Belloso O. 2006. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. En: Proyecto XI.22 Desarrollo de Tecnologías para la conservación de Vegetales Frescos Cortados. I Simposio Ibero-Americano de Vegetales frescos Cortados, San Pedro, Brazil, Abril.

Ríos MS, Dávila MR, Avila S-S, González SF. 2005. Identificación de Sustancias con actividad antimicrobiana en fresa. En: Heredia N, Solís M (eds). Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria. Monterrey, México. Octubre 12-14.

Rocourt J, Cossart P. 1997. *Listeria monocytogenes*. En: Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y Fronteras, Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). Acribia: España, pp. 355-370.

Rodríguez-Angeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública Méx. 44(5):464-475.

Rota C, Carramiñana JJ, Burillo J, Herrera A. 2004. In Vitro Antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. J. Food Prot. 67(6):1252-1256.

Sánchez E, García S, Heredia N. 2007. Antimicrobial Properties of Plant Extracts against *Clostridium perfringens* and *Vibrio cholerae*. Tharp DW, Hovey LK, Bahun DA, Bengé FL, Cattanach JA, Ford TP, Gronstal D, Jordan KK, Loynachan D, McDonald LK, Wanninger PJ (eds). IAFP Annual Meeting. Lake Buenavista, Florida, USA. July 8-11.

Sánchez E, Heredia N, García S. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species. Int. J. Food Microbiol. 98: 271-279.

Sato K, Sudo S. 2004. Small-Scale Solid-State Fermentation. In: Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications. Vol 21, Arora DK (ed). Marcel Dekker: inc. United State of America, pp. 61-73.

Shafiur Rahman M. 2008. Food Preservation: Overview. In: Handbook of Food Preservation, Shafiur Rahman M (ed). CRC Press: New York, pp. 3-18.

Shiva Ramayoni CM. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos: Posible alternativa a los antibióticos. Tesis (Doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona.

Smid EJ, Gorris GM. 2008. Natural Antimicrobial for Food Preservation. In: Handbook of Food Preservation, Shafiur Rahman M (ed). CRC Press: New York, pp. 237-258.

Smith JE. 2004. Biotechnology. Cambridge: United Kingdom, pp. 52-75.

Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett. Appl. Microbiol. 26:118-122.

Solow TB, Cloak OM, Fratamico PM. 2003. Effect of temperature on viability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on raw chicken or skin. *J. Food Prot.* 66(11):2023-2031.

Soong YY, Barlow PJ. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem.* 88: 411-417.

Spigno G, Tramelli L, Marco D, Faveri DM. 2007. Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* 81:200-208.

Steinkraus KH. 2002. Fermentations in world food processing. *CRFSFS.* 1(1):23-32

Stevanato R, Fabris S, Momo F. 2004. New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *J. Agric. Food Chem.* 52:6287-6293.

Thompson LK. 2001. Effect of dried plum on suppression of growth of foodborne pathogens in liquid medium and ground meat. Institute Food Technology Annual Meeting, Food Microbiology: Antimicrobial effect on foodborne microorganisms, New Orleans, Louisiana, June 23-27.

Thompson LK. 2005. Effect of fresh plum juice concentrate on the growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in liquid medium. Institute Food Technology Annual Meeting, Food Microbiology: Antimicrobial effect on foodborne microorganisms, New Orleans, Louisiana, July 15-20.

Tomatake H, Koga T, Yamato M, Kassa A, Ota F. 2006. Antibacterial activity of citrus fruit juice against *Vibrio* species. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52(2):157-160.

Tood CD. Epidemiology and Globalization of Foodborne Disease. En: Guide to Foodborne pathogens, Labbé RG, García S (eds). Wiley-Interscience: USA, pp. 1-15.

Torres J, Romero H, Santiago A, Apitz Castro R. 2006. Susceptibilidad *in Vitro* de *Histoplasma capsulatum* al ajoene usando los métodos de difusión en agar con discos y pozos. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 26(1):42-47.

Touré R, Kheadr E, Lacroix C, Moroni O, Fliss I. 2003. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infantile stool active against *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol. 95:1058-1069.

Uribe C, Suárez MC, SM. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Rev. Colomb. Med. 37:151-158.

Valtierra Rodríguez D. 2008. Mezclas de extractos de plantas para control de *Campylobacter jejuni/coli* y *Salmonella spp* en un modelo alimenticio. Tesis (Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León.

Varma JK, Samuel MC, Marcus R, Hoekstra RM, Medus C, Seglar S, Anderson BJ, Jones TF, Shiferaw B, Nicole H, Megginson M, McCarthy PV, Graves L, Gilder TV, Angulo FJ. 2007. *Listeria monocytogenes* Infection from foods prepared in a commercial establishment: A case-control study of potencial source of sporadic illness in the United State. Clin. Infect. Dis. 44: 521-8.

Vasseur C, Baverel L, Hébraud M, Labadie J. 1999. Effect of osmotic, alkaline, acid o thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol. 86:469-476.

Vattem DA, Ghaedian R, Shetty K. 2005a. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. J. Clin. Nutr. 14(2):120-130.

Vattem DA, Lin YT, Labbé RG, Shetty K. 2004. Phenolic antioxidant mobilization in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food grade fungus *Lentinus edodes*

and effect on antimicrobial activity against select food borne pathogens. IFSET. 5:81-91.

Vattem DA, Lin YT, Shetty K. 2005b. Enrichment of Phenolic Antioxidants and anti-*Helicobacter pylori* properties of cranberry pomace by solid-state bioprocessing. Food Biotech. 19:51-68.

Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14(3):584-640.

Voravuthikunchai SP, Limsuwan S. 2006. Medicinal Plant Extract as Anti-*Escherichia coli* O157:H7 agents and their effects on bacterial cell aggregation. J. Food Prot. 69(10):2336-2341.

Wainwright M. 1992. Introducción a la Biotecnología de los Hongos. Acribia: España, pp. 31-35.

Walsh D, Duffy G, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell D. A. 2001. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. J. Appl. Microbiol. 90:517-522.

Wang SY, Lin H-S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. J. Agric. Food Chem. 48:140-146.

Wang SY, Stretch A. W. 2001. Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. J. Agric. Food. Chem. 49:969-974.

Wang SY, Zheng W. 2001. Effect of Plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. J. Agric. Food Chem. 49:4977-4983.



Ward OP. 1991. Biotecnología de la Fermentación. Acribia: España, pp. 10-13, 22-25.

Waterhouse AL. 2005. Determination of total Phenolics. In: Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components, Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, Sporns P (eds). Wiley Interscience: USA, pp. 463-470.

Wiggins G, Albritton W, Feeley J. 1978. Antibiotic susceptibility of clinical of *Listeria monocytogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. 13(5):854-860.

Xu G, Chen J, Liu D. 2006. Effect of heat Treatment on the compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. J. Agric. Chem. 55(2):330-335.

Young VB, Mansfield LS. 2005. *Campylobacter Infection*-Clinical Context. In: *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*, Ketley JM, Konkel ME (eds). Horizon Bioscience: Great Britain, pp. 1-12.

Zaidan MRS, Noor Rain A, Badrul AR, Norazah A, Zakiah I. 2005. *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Trop. Biomed. 22(2):165-170.

Zohri AN. Abdel-Gawad K, Saber S. 1995. Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa L.*). Microbiol. Res. 150 (2):167-72.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Alejandrina Montes Quiroz

Candidata para el grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS FERMENTADAS CON *Rhizopus oligosporus* CONTRA BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS.

Campo de estudio: Biotecnología de Alimentos: Inocuidad Alimentaria.

Biografía:

Datos personales: Nacida en Tepic, Nayarit, el 14 de agosto de 1984, hija de Manuel Montes Mojarro y María Elena Quiroz Páez.

Educación:

Egresada de la Universidad Autónoma de Nayarit, grado obtenido Químico Farmacobiólogo en 2006.