

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



MEZCLAS DE EXTRACTOS DE PLANTAS PARA CONTROL DE *Campylobacter jejuni/coli* Y *Salmonella* spp. *In vitro* Y EN UN MODELO ALIMENTICIO

FOR  
Q.F.B. DIANA VALTIERRA RODRIGUEZ  
TESIS

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

CD. UNIVERSITARIA

AGOSTO DE 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



MEZCLAS DE EXTRACTOS DE PLANTAS PARA CONTROL DE *Campylobacter jejuni/coli* Y *Salmonella* spp. *in vitro* Y EN UN MODELO ALIMENTICIO.

POR

Q.F.R. DIANA VALTIERRA RODRIGUEZ

TpSIS

Como requisito para i a) para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Microbiología.

CD. UNIVERSITARIA

AGOSTO DE 2008

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
TABLA DE CONTENIDO.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	6
3. JUSTIFICACIÓN.....	7
4. HIPÓTESIS.....	8
5. OBJETIVO GENERAL.....	9
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	10
7. ANTECEDENTES.....	11
7.1. Industria avícola.....	11
7.2. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	12
7.3. Generalidades de <i>Salmonella</i> y salmonelosis.....	12
7.3.1. <i>Salmonella</i> Typhi.....	15
7.3.2. <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	16
7.4. <i>Campylobacter</i> y campilobacteriosis.....	16
7.4.1. <i>Campylobacter jejuni</i> .....	18
7.4.2. <i>Campylobacter coli</i> .....	18
7.5. Agentes antimicrobianos.....	19
7.5.1. Hipoclorito de sodio.....	19
7.5.2. Acidos orgánicos.....	19

7.5.3. Fosfato trisódico.....	20
7.5.4. Probióticos.....	20
7.5.5. Radiación.....	21
7.5.6. Agua electrolizada oxidante (EO).....	21
7.5.7. Otros.....	21
7.6. Uso de plantas. Generalidades de plantas.....	21
7.6.1. Conservadores naturales: extractos de plantas.....	22
7.7. Métodos para probar la eficacia de antimicrobianos.....	25
7.7.1. Micrométodo.....	27
7.7.2. Método para combinación de antimicrobianos.....	27
7.8. Análisis sensoriales.....	28
8. MÉTODOS.....	30
8.1. Colecta de vegetales y/o plantas comestibles.....	30
8.2. Obtención de los extractos.....	31
8.3. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	32
8.4. Ensayo preliminar de actividad antimicrobiana contra <i>Campylobacter jejuni/coli</i> .....	33
8.5. Ensayo preliminar de actividad antimicrobiana contra <i>Salmonella</i> .....	33
8.6. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para <i>Campylobacter jejuni/coli</i> .....	35
8.7. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para <i>Salmonella</i> .....	36
8.8. Determinación de combinaciones efectivas de los extractos.....	37
8.9. Análisis sensorial.....	39
8.10. Análisis de los grupos químicos de los extractos.....	40
8.10.1. Hidrocarburos insaturados.....	40
8.10.2. Saponinas.....	40
8.10.3. Flavonoides.....	40
8.10.4. Sesquiterpenlactonas.....	40
8.10.5. Carbohidratos.....	41
8.10.6. p-benzoquinonas.....	41

8.10.7. Alcaloides.....	41
8.10.8. Cumarinas.....	42
8.10.9. Aldehidos y cetonas.....	42
8.10.10. Cloruros.....	42
8.10.11. Taninos.....	42
8.11. Análisis estadístico.....	43
9. RESULTADOS.....	51
10. DISCUSIÓN.....	67
11. CONCLUSIÓN.....	73
12. LITERATURA CITADA.....	74
13. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	86

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Factores que pueden afectar la actividad antimicrobiana.....	26
2. Métodos para probar la eficacia de los antimicrobianos en alimentos.....	26
3. Plantas probadas.....	30
4. Uso de microplacas. Contenido de los pozos.....	34
5. Uso de microplacas. Rangos establecidos.....	35
6. Esquema general de las mezclas realizadas.....	36
7. Determinación del efecto de las plantas utilizadas por medio de presencia o ausencia de halos de inhibición sobre el crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> 5653, <i>Campylobacter coli</i> 19, <i>Salmonella</i> Typhi ATCC 19430 y <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028.....	52
8. Concentración Mínima Bactericida de extractos contra el crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> 5653, <i>Campylobacter coli</i> 19, <i>Salmonella</i> Typhi ATCC 19430 y <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028.....	57
9. Promedios de FIC de las mezclas para cada cepa bacteriana mostrando la ubicación de todas las mezclas en el rango de indiferencia.....	58
10. Compuestos funcionales presentes en los extractos y en la mezcla de los tres. .	65

## RESUMEN:

En años recientes ha habido un incremento en el interés sobre el uso de sustancias naturales, debido en parte a la preocupación de la población, ocasionada por el conocimiento de los riesgos que representan los conservadores sintéticos (tales como benzoato de potasio y sorbato de sodio) para el cuerpo. Los extractos de plantas, aromas y productos volátiles originados del metabolismo secundario de las plantas, tienen una amplia aplicación como saborizantes y como conservadores de alimentos. Actualmente se están haciendo estudios para la aplicación de extractos de plantas para combatir microorganismos patógenos y/o degradadores de alimentos. El campo de la avicultura juega un papel muy importante debido al incremento en el consumo de carne de pollo a nivel mundial. Es conocido que *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. son los principales microorganismos patógenos que pueden causar enfermedades gastrointestinales y a nivel mundial ambos se encuentran en productos avícolas y sus derivados. Debido a lo anterior, en esta investigación se evaluó la capacidad antimicrobiana de extractos de diferentes plantas comestibles *in vitro*, se seleccionaron tres frutas comestible y se obtuvieron las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) contra todas las cepas probadas; posteriormente se realizaron mezclas de estos extractos, en dichas mezclas se reflejó una indiferencia entre estos por lo se procedió a aplicar las mezclas al 100% de la CMB en el modelo alimenticio (piel de pollo). Una vez comprobada su actividad antimicrobiana en el modelo alimenticio con las mismas concentraciones utilizadas anteriormente para las mezclas *in vitro*, éstas se aplicaron para realizar un análisis sensorial con alitas de pollo, del cual se obtuvo que una de las mezclas propuestas fue del agrado de los catadores.

## ABSTRACT

In recent years there has been an increasing interest in the use of natural substances, in part it's due to the concern of the population, caused by the knowledge of the risks and the impact that synthetic preservatives represent (such as potassium benzoate and sodium sorbato). Plant extracts, scents and volátil e products originated ffom the plants' secondary metabolism, have a wide application as food preservatives and flavorings. Nowadays, studies are being developed to apply plant extracts to fight food pathogen microorganisms. The poultry breeding field plays a key role due to the increase of consumption of poultry meat worldwide. It is known that *Salmonella* spp and *Campylobacter* spp are pathogen agents which can cause gastrointestinal diseases and they're also the main responsable for this kind of illnesses worldwide due to the consumption of poultry meat and its derivates as these microorganisms' carriers. Due to the preceding information, in this research project it was evaluated the antimicrobial capacity of edible plant extracts *in vitro*, three fruits were selected and the minimum bactericidal concentrations were determined (MBC) against all the bacterial strains used; afterwards the extract mixtures of these plants were done, in these mixtures we obtained indifference among them and due to this we proceeded to apply the mixtures at 100% of the MBC in the food model (chicken skin). Once we proved their antimicrobial activity in the food model with the same concentrations of the mixtures required for the *in vitro* method, these were applied for the sensoiy analysis with chicken wings, in which we obtained that one of the proposed formulas was pleasant for the taster's panel.

## INTRODUCCIÓN:

La demanda del consumidor juega un papel importante en la modificación de nuestro abastecimiento de alimentos y últimamente, dicha demanda ha sido dirigida hacia alimentos “naturales” y libres de aditivos sintéticos, pero que también dichos alimentos sigan siendo seguros y convenientes para su consumo. La búsqueda de nuevos antimicrobianos naturales ha llevado a los científicos, en el área de alimentos, a determinar la efectividad de compuestos alternativos tales como los ácidos orgánicos, aceites esenciales y bacteriocinas que poseen actividad inhibitoria de crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorantes de alimentos (Lemay *et al*, 2000).

Las plantas producen más de 100,000 compuestos de bajo peso molecular, los cuales son conocidos como metabolitos secundarios. Estas sustancias se pueden dividir, básicamente en dos grupos: fitoanticipinas, las cuales están presentes de forma constitutiva en las plantas, y fitoalexinas, cuya presencia aumenta de forma considerable como respuesta al estrés provocado por algún microorganismo fitopatógeno. La definición de fitoalexina y fitoanticipina se refieren a la actividad antimicrobiana *in vivo* de este tipo de compuestos (Domingo y López, 2003).

Se estima que se han aislado sólo alrededor de 12,000 compuestos procedentes de organismos vegetales, lo cual constituye aproximadamente a sólo el 10% de los metabolitos secundarios existentes. De ellos se calcula que un porcentaje importante posee cierta actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos. La razón de ser de estos compuestos se desconoce hasta el momento, sin embargo existen distintas teorías, una es que podrían ser compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano, o que realmente tienen una actividad antimicrobiana como primer fin. Los compuestos químicos naturales más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas son los fenoles simples, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides (Domingo y López, 2003).

Los compuestos fenólicos simples consisten de un anillo fenólico sustituido; los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) parecen estar relacionados con su toxicidad contra microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando proteínas y anulando su función, debido a esto poseen un amplio potencial antimicrobiano (Domingo y López, 2003).

Los taninos constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados y poseen la habilidad para inactivar adhesinas microbianas, enzimas y proteínas de transporte (Cowan, 1999). Las quinonas son anillos aromáticos con dos funciones ceto; poseen una alta reactividad inactivando muchas veces a las proteínas y anulando su función (Domingo y López, 2003).

Las cumarinas son compuestos derivados de la venzo-a-pirona y se cree que su mecanismo de acción antimicrobiana es mediante la interacción con ADN eucariota. Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo; probablemente su actividad antimicrobiana se debe a que forman complejos con proteínas extracelulares y con los componentes de la pared bacteriana. Los alcaloides son compuestos nitrogenados heterocíclicos; se cree que mediante una intercalación entre la pared celular del microorganismo es el mecanismo de acción antimicrobiana que poseen (Domingo y López, 2003).

El hombre desde la antigüedad ha usado sustancias naturales extraídas de las plantas para combatir enfermedades y preservar alimentos como la carne y diversos frutos. En años pasados, se había disminuido el uso de estas sustancias naturales debido a la amplia comercialización de sustancias químicas sintéticas. Sin embargo, es relativamente reciente que se preste atención a su aplicación potencial como conservadores de alimentos debido a su potencial antimicrobiano (Dormán y Deans, 2000).

En este estudio se determinaron las propiedades antimicrobianas de los extractos etanólicos y metanólicos de plantas contra microorganismos patógenos predominantes en el pollo como son *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni/colr*, además de que se realizaron pruebas colorimétricas para conocer los grupos funcionales que pudieran estar proporcionando ese poder antimicrobiano. A partir de los extractos crudos, se realizó un formulado aplicable a un modelo alimenticio que pudiera servir para reducir el riesgo de enfermedades por estos microorganismos y que no afecte organolépticamente al alimento.

## DEFINICIÓN DEL PROBLEMA:

Existe una creciente demanda de productos pecuarios en México y a nivel internacional. En México en el año de 1993 el consumo total de carnes fue de 41.3 kg/habitante, mientras que en el 2001 llegó a 56.4 kg, y de estas cifras la carne de pollo representó un 32 y 39% respectivamente (SAGARPA, 2003). La carne de aves, en especial la de pollo, es un vehículo muy importante de microorganismos patógenos para el hombre, principalmente *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus cereus* (Moreno, 2005).

*Campylobacter* y *Salmonella* son dos causas importantes de enfermedades transmitidas por alimentos. Una fuerte asociación ha sido demostrada entre el consumo de pollos y brotes esporádicos de enfermedades gastrointestinales bacterianas causadas por *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. en humanos. Los pollos jóvenes (menores de dos semanas) son extremadamente susceptibles a infecciones por *Salmonella* spp. En contraste, la colonización por *Campylobacter* spp. ocurre más comúnmente en pollos que tienen más de dos semanas de edad (McCrea *et al*, 2006).

Para frenar esta incidencia de infecciones y de toxiinfecciones asociadas a alimentos y debido a las percepciones negativas de los consumidores respecto al consumo de conservadores artificiales; hoy en día, el ser humano está buscando volver a la aplicación y consumo de productos naturales para prevenir enfermedades asociadas al consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos.

## JUSTIFICACIÓN:

Las investigaciones de las actividades antimicrobianas, modo de acción y potencial uso de los extractos de plantas han ganado terreno debido a su disponibilidad en la naturaleza, así como mejor biodegradabilidad comparado con los antibióticos y conservadores disponibles (Kalemba and Kunicka, 2003).

Existen varios ejemplos de plantas que se han empleado como antimicrobianos en alimentos como los extractos de mango (*Mangifera indica* L.) guayabo agrio (*Psidium guineense* Sw.), mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), orégano (*Origanum vulgare*, *Lippia graveolens*) (Kalemba and Kunicka, 2003) entre otras; sin embargo, se requiere un mayor conocimiento científico que explique las propiedades antimicrobianas de extractos de plantas contra *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. sobre un modelo alimenticio. Por ello, se requiere realizar investigación para determinar los efectos antimicrobianos de extractos de plantas sobre *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. *in vitro* y en un modelo alimenticio.

Los productos naturales no tóxicos, compatibles con los alimentos son una fuente de antimicrobianos que pueden ser útiles para reducir o eliminar microorganismos patógenos en las superficies de frutas y vegetales y en formulaciones agregadas a alimentos tales como jugos de frutas y vegetales, carne roja y carne de aves utilizadas para minimizar la contaminación de estos alimentos durante su almacenamiento comercial y en el hogar (Friedman *et al*, 2003).

**HIPÓTESIS:**

Los extractos de plantas analizados y sus mezclas son capaces de inhibir el crecimiento de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. *in vitro* y un modelo alimenticio y la fórmula encontrada será organolépticamente aceptable.

**OBJETIVO GENERAL:**

Establecer el efecto antimicrobiano de extractos de diversas plantas y mezclas de ellos sobre el crecimiento de *Campylobacter jejuni/coli* y *Salmonella* spp. tanto *in vitro* como en un modelo alimenticio.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

Determinar el efecto antimicrobiano de diversas plantas y sus mezclas contra el crecimiento de *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni/coli in vitro*.

Establecer las CMB (concentración mínima bactericida) de los extractos y mezclas de ellos contra *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni/coli in vitro* y en un modelo alimenticio.

Determinar la efectividad de los extractos seleccionados sobre la viabilidad de *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni/coli* en un modelo alimenticio.

Identificar los grupos funcionales químicos que se encuentran en los extractos seleccionados.

Evaluar los cambios en las propiedades organolépticas del pollo como resultado de la aplicación de la formulación propuesta.

## ANTECEDENTES:

### 7.1. Industria avícola.

Se espera que la producción pecuaria y la demanda de productos animales aumenten con rapidez durante los próximos 20 años debido al crecimiento acelerado de la población mundial (Juárez, 2003).

En México, en el año de 1993 el consumo total promedio de carnes fue de 41.3 kg por persona, mientras que en el año 2001 llegó a 56.4 kg, y de estas cifras la carne de pollo representó en 32 y 39% respectivamente. México a nivel mundial en el año 2003 se encontraba posicionado en el sexto lugar como productor de huevo y en el cuarto sitio como productor de pollo (SAGARPA, 2003).

Los productos avícolas como la carne de pollo y el huevo, representan una fuente de proteína de origen animal de excelente calidad nutricional y bajo costo. Además la Industria Avícola en México es una fuente importante para la generación de más de 950 mil empleos, tanto directos como indirectos, principalmente en el medio rural. La Industria Avícola además participa con el 40.28% del PIB (Producto Interno Bruto) pecuario, 14.12% del PIB agropecuario, y con el 0.72% del PIB total nacional, mientras que la industria de pollo para carne aporta el 20.72% del PIB pecuario, 9.53% del PIB agropecuario y 0.49% del PIB total (Juárez, 2003).

En la industria avícola, la piel de pollo se utiliza como un sustituto de grasa ya que los productos hechos con grasa abdominal de pollo son inaceptables. Sin embargo, la piel de pollo es un material riesgoso ya que a menudo está altamente contaminado con patógenos como *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*. Aunado a esto, la presencia de altos niveles de bacterias deteriorantes de alimentos también puede ser detrimental para la calidad sensorial de los productos terminales (Deumier, 2004).

## 7.2. Enfermedades transmitidas por alimentos.

A pesar de que a nivel mundial y, específicamente en México se cuenta con un nivel tecnológico desarrollado y favorable de la industria avícola, en años recientes ha habido un incremento dramático en el número de casos reportados de enfermedades transmitidas por alimentos. Datos aproximados de EEUU, donde las etiologías de las infecciones alimentarias están profundamente estudiadas, demuestran que las toxiinfecciones de origen alimentario causan anualmente 76 millones de enfermos, con 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertos y se asume que de un 15-20% de las enfermedades alimentarias y las infecciones están directamente ligadas con el consumo de pollo y/o sus derivados (Moreno, 2005).

En México, las bacterias *Escherichia coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena, *Salmonella enteritidis*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica*, ocasionan en conjunto, entre 40 y 50% de las enfermedades transmitidas por alimentos. Estas enfermedades tienen variaciones estacionales; con incremento de etiología bacteriana durante los meses calurosos y lluviosos. Se ha reportado que la mortalidad por enfermedades de esta índole es más elevada en niños y en ancianos. Cada año, se registran alrededor de 3000 defunciones en este grupo de personas, casi todas prevenibles, sobre todo en los estados del sur del país (Kumate *et al*, 2004).

La carne de aves en general, en especial la de pollo, es un vehículo muy importante de microorganismos patógenos (Moreno, 2005). Como lo son *Campylobacter* y *Salmonella* a los que se les considera los principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos a nivel mundial (Arsenault *et al*, 2007). A este respecto, se ha mostrado gran asociación entre el consumo de carne de pollo con brotes esporádicos de estas enfermedades en humanos (McCrea *et al*, 2006).

En la línea de proceso de aves, existen pasos como el escaldado, la evisceración, los lavados por dentro y por fuera, y el enfriado, en donde puede ocurrir una mayor contaminación microbiológica. En el paso de evisceración, en particular, cuando las vísceras son extraídas mecánicamente, las canales pueden ser fácilmente ser

contaminadas con microorganismos patógenos presentes en el intestino de las aves. Además, se ha concluido que en forma general los lavados realizados no son suficiente para reducir la carga bacteriana por lo que se buscan estrategias alternativas para reducir la presencia de estos patógenos (Jiménez *et al*, 2005).

Por otro lado, el transporte de los pollos hacia las plantas procesadoras también se ha relacionado con un incremento en la prevalencia de *Salmonella* y *Campylobacter* debido a la inevitable contaminación fecal por pollos vecinos, contaminando así plumas y piel (McCrea *et al*, 2006).

### 7.3 Generalidades de *Salmonella* y salmonelosis.

La nomenclatura de *Salmonella* es compleja y ha variado continuamente, desde el concepto inicial serotipo-especie propuesto por Kaufmann en 1966, el cual estaba basado en la identificación serológica de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), incluyendo otras propuestas taxonómicas fundamentadas en características clínicas o bioquímicas y más recientemente en el establecimiento de relaciones genómicas (Uribe *et al*, 2006).

Un estudio definitivo para la taxonomía de *Salmonella* fue dado a conocer por Crosa y sus colaboradores en 1973, quienes demostraron mediante estudios de hibridación ADN-ADN que todos los serotipos de *Salmonella* se relacionaban altamente y se debían considerar como una única especie. En 1989 Reeves y sus colaboradores contaron con nuevos análisis de hibridación ADN-ADN y describieron una segunda especie, *Salmonella bongori*, antes conocida como subespecie (Uribe *et al*, 2006).

Frecuentemente se utiliza la nomenclatura recomendada por el Centro de Referencia e Investigación de *Salmonella* de la Organización Mundial de la Salud en el Instituto Pasteur, que de acuerdo con los hallazgos genéticos describe dos especies diferentes: *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica* (antes llamada *Salmonella choleraesuis*) esta última se dividió en 6 subespecies que se diferencian por sus características bioquímicas y genéticas. Cada subespecie contiene a su vez varias sero variedades (serotipos)

definidas por su fórmula antigénica. *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhi* y *S. Typhimurium* son en la actualidad serovariedades de *Salmonella entérica* subespecie *entérica* (Uribe *et al*, 2006).

El género *Salmonella* está constituido por bacilos cortos gramnegativos no formadores de esporas, fermentadores de glucosa usualmente con producción de gas, pero por lo general no fermentan la lactosa ni la sacarosa (Kubo y Fujita, 2001), son anaerobios facultativos, están estrechamente relacionados morfológica y fisiológicamente con otros géneros de la familia Enterobacteriaceae a la que pertenecen. Con la excepción de la serovariedad Gallinarum-Pollorum, son móviles gracias a sus flagelos peritricos. Sobreviven en un amplio rango de temperatura (7° - 48° C), siendo su temperatura ideal 37° C, un pH entre 4 y 8, y una actividad de agua ( $a_w$ ) de 0.93 (Uribe *et al*, 2006).

Las enfermedades intestinales causadas por *Salmonella* spp., son uno de los problemas más comunes en el mundo (Chávez *et al*, 2001). Aunque a veces se le conoce como intoxicación alimentaria, la salmonelosis es una infección gastrointestinal causada por *Salmonella*; ésta, normalmente habita en el intestino de los animales y por lo tanto también en las aguas residuales. Virtualmente, todas las *Salmonella* son patógenas para los humanos. *S. Typhi* produce una grave enfermedad conocida como tifoidea (Madigan *et al*, 2004); *S. Enteritidis* es ahora el serotipo más común asociado a la salmonelosis, desplazando así a *S. Typhimurium* (Wallace *et al*, 2001).

La salmonelosis más común es la enterocolitis. La ingesta de alimentos conteniendo 10-10 *Salmonella* viables deriva en la colonización del intestino delgado y grueso. La aparición de la enfermedad ocurre generalmente 8 a 48 h después de la ingesta. Los síntomas incluyen un repentino dolor de cabeza, escalofríos, vómitos y diarrea, seguido de fiebre durante varios días. Esta enfermedad normalmente desaparece sin intervención en 2 o 3 días. Sin embargo, incluso después de la recuperación, los pacientes tienen *Salmonella* en las heces durante varias semanas. Algunos pacientes se recuperan y se

transforman en asintomáticos, pero portan microorganismos durante meses o incluso años, resultando en portadores crónicos (Madigan *et al*, 2004).

Algunos animales, como los pollos y el ganado pueden también ser portadores de *Salmonella*, que pasan a los alimentos frescos tales como huevos, carne y productos lácteos. *Salmonella* también se encuentra frecuentemente en productos como natillas, pasteles con crema, merengues, y productos que incluyen huevo sin cocinar. Otros alimentos comúnmente implicados en los brotes de salmonelosis son las carnes y los productos cárnicos como pasteles de carne, salchichas curadas pero no cocinadas, la carne de aves, la leche y los productos lácteos (Madigan *et al*, 2004).

De entre un amplio margen de alimentos que pueden ser una fuente de infección por *Salmonella* en humanos, los productos avícolas han sido identificados como la vía más importante de transmisión. Se ha reportado la transmisión vertical de *Salmonella* en las aves ponedoras a huevos por lo que es importante controlar esta ruta en los programas de erradicación. La transmisión horizontal del ambiente a las aves en las granjas también se ha reportado como otra ruta importante en algunos países (Rasschaert G, 2008).

De acuerdo a los datos que presenta el Centro para el Control de Enfermedades Infecciosas de EUA (CDC. Centers for Disease Control), se han presentado grandes brotes por consumo de alimentos crudos y procesados contaminados con *S. Enteritidis* (Wallace *et al*, 2001).

### 7.3.1. *Salmonella* Typhi.

*S. Typhi* causa la fiebre tifoidea en humanos, quienes son sus únicos hospederos. Esto abre importantes preguntas sobre qué genes determinan dicha especificidad, las cuales se podrán abordar en vista de los recientes proyectos de secuenciación del genoma de diferentes serotipos, incluyendo la *S. typhi* CT18 (con resistencia múltiple a antibióticos proveniente de Vietnam); la fiebre tifoidea prevalece principalmente en países en vías de desarrollo, donde normalmente significa un reto a las autoridades en salud pública. En

México la incidencia es de 10 por cada 100,000 habitantes. El grupo etario más afectado es el de adultos jóvenes, de 19 a 44 años de edad (Calva, 2001).

#### 7.3.2. *Salmonella* Typhimurium.

*Salmonella* Typhimurium es una de las causas principales de salmonelosis, reportándose aproximadamente 8000 casos cada año tan solo en los Estados Unidos de América. Infecciones causadas por *S. Typhimurium* pueden amenazar la vida de los ancianos, niños y pacientes inmunocomprometidos. *S. Typhimurium* está muy relacionada a *S. Typhi*; globalmente la incidencia de fiebre tifoidea está disminuyendo, sin embargo, la salmonelosis no tifoidal (*S. Typhimurium*) se está incrementando. La infección que causa y su patogenicidad son complejas, son procesos altamente integrados que no pueden ser atribuidos a la actividad de cualquier proteína. Dentro del marco de un patógeno bien adaptado, las funciones críticas de patogénesis pueden tener vías redundantes o alternas (Adkins *et al*, 2006).

#### 7.4. *Campylobacter* y campilobacteriosis.

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteriaceae*. Estas bacterias son patógenas o comensales que se caracterizan por tener una forma curva, en forma de "S" o espiral. Todas son bacilos gram-negativos, no formadores de esporas, aunque en cultivos viejos expuestos al aire por mucho tiempo pueden mostrar una morfología cocoide. Las especies de este género poseen un flagelo polar en uno o ambos extremos, que les confiere motilidad. Estas bacterias son termófilas y muestran un crecimiento óptimo a 42 °C, aunque pueden crecer a 37 °C (Malavez, 2005). Son organismos de lento crecimiento y son bacterias estrictamente microaerofílicas (Hinton, 2006).

Las especies de *Campylobacter* (*C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* y *C. upsaliensis*) han sido asociadas con múltiples enfermedades en animales y humanos. (Malavez, 2005). *C. jejuni* y *C. coli* son las dos especies de mayor importancia, son responsables del 95% de los casos de campilobacteriosis en humanos

(Hinton, 2006). En países desarrollados, más casos de campilobacteriosis son asociados a *C. jejuni*, mientras que en países en vías de desarrollo, existen más casos relacionados a *C. coli* (Thurston *et al*, 2003). Además, se ha incrementado la evidencia de que *C. jejuni* y *C. coli* pueden causar enteritis en otras especies animales además de humanos (Rosefeta/, 1983).

En humanos, las infecciones por *Campylobacter* son consideradas primeramente como el resultado de la ingestión de alimentos contaminados de origen animal aunque una gran variedad de enfermedades humanas pueden ser relacionadas a animales o a aguas superficiales. Sin embargo, la mayoría de las infecciones son casos esporádicos. Robinson reportó que la dosis infecciosa de *Campylobacter* es muy baja. Se infectó él mismo y desarrolló síntomas después de ingerir 180 ml de leche que contenía 500 células de la cepa de *C. jejuni* que fue originalmente aislada de un brote ocasionado por ingestión de leche contaminada (Doyle y Román, 1982).

Gran parte de la producción avícola del mundo está contaminada con *Campylobacter* y esto lo refleja la gran cantidad de aislamientos reportados de estos patógenos en productos avícolas que se venden en tiendas comerciales. Por ello, no es sorprendente que los estudios epidemiológicos hayan revelado una fuerte asociación entre infecciones por *Campylobacter* y el mal manejo y consumo de carne de aves mal cocida o cruda. Los alimentos contaminados por contaminación cruzada también representan una fuente significativa de contaminación (Park, 2002).

Por lo general, no se cree que las campilobacterias termofílicas se transmitan por vía vertical a los huevos, ni por la alimentación. Las parvadas usualmente se infectan a las 3 semanas de edad. Cada ave es usualmente rápidamente colonizada, con altos niveles ( $10^6$ - $10^7$ ) en el contenido fecal. La fuente de infección puede ser por consumo de agua no clorada, pero en los casos en que la fuente de agua no es la responsable, la fuente precisa de infección es rara vez identificada. La infección a veces ha sido asociada con el “adelgazamiento” de las parvadas una semana antes del sacrificio (Corry y Atabay, 2001).

En la mayoría de los casos hay un periodo de incubación de 2 a 5 días que puede extenderse hasta una semana. Los síntomas más comunes son diarrea acuosa y/o con sangre, vómitos, fiebre y dolor abdominal, parecido a los síntomas de la apendicitis aguda. La enfermedad dura cerca de una semana pero pueden tener serias complicaciones como artritis reactiva (síndrome de Reiter), el síndrome Guillian-Barré, bacteremia, miocarditis, pancreatitis y aborto séptico (Halbert *et al*, 2005). Por lo general la campilobacteriosis no causa muerte, sin embargo, ésta puede ocurrir en pacientes inmunocomprometidos, infantes y ancianos (Malavez, 2005).

Los productos avícolas mal cocidos probablemente son la principal fuente de infecciones, por lo menos en lo que se refiere a casos esporádicos. Otras fuentes importantes de infección, las cuales tienen mayor importancia en los países en vías de desarrollo, son aguas para beber mal tratadas, leche bronca y vegetales irrigados con aguas recicladas que no fueron tratadas de modo adecuado (Hernández, 1996).

#### 7.4.1. *Campylobacér jejuni*.

La presencia de *C. jejuni* en pollo, en su carne, en las canales de las plantas de procesado y en los supermercados ha sido bien documentada. Este organismo sobrevive a temperaturas de refrigeración y ha sido aislada de canales que están a -15 °C durante 30 semanas (Beuchat, 1987). La presencia de *Campylobacér jejuni* en heces y en canales de pollo también ha sido reportada. Grant y colaboradores reportaron una media de  $4.4 \times 10^6$  organismos de *C. jejuni* por gramo de heces de pollos vivos (Beuchat, 1985).

#### 7.4.2. *Campylobacér coli*.

*Campylobacér coli* es una de las causas más frecuentes de patología gastrointestinal en los seres humanos. Las infecciones extraintestinales y las sepsis son poco frecuentes, especialmente en huéspedes inmunocompetentes o sin patología crónica (Blanco *et al*, 2007); mientras que la carne de aves se ha identificado como el principal reservorio para

*C.jejuni*, la carne de cerdo se ha visto mayormente implicada como reservorio de *C. coli* (Thakur y Gebreyes, 2005).

Aunque un estimado del 95% de las infecciones en humanos son atribuidas a *C. jejuni*, la importancia de *C. coli* está siendo reconocida debido a su habilidad para mostrar un incremento en su resistencia a antimicrobianos. Los cerdos, las plantas de producción y procesado en granjas y los mataderos han mostrado ser adecuados para *C. coli* (Gebreyes *et al*, 2005).

#### 7.5. Métodos de control.

Hoy en día, ha habido un interés considerable en buscar alternativas para frenar la tendencia creciente de las enfermedades transmitidas por alimentos. Durante el procesado de alimentos, las bacterias son removidas, destruidas, o controladas usando tratamientos térmicos, agua, aditivos químicos (antimicrobianos) y métodos mecánicos (Northcutt *et al*, 2005). Entre ellos se encuentran.

##### 7.5.1. Hipoclorito de sodio.

Se ha utilizado en el procesamiento de aves por más de 40 años para reducir las bacterias que producen su pudrición, controlar el esparcimiento de patógenos, y prevenir la acumulación de microorganismos sobre superficies de trabajo y sobre el equipo tal como tanques de escaldado (Keener *et al*, 2004). Sin embargo el agua de cloración no reduce efectivamente las bacterias adheridas a la piel del pollo (Yang *et al*, 2001).

##### 7.5.2. Ácidos orgánicos.

Se han investigado los ácidos orgánicos debido a su actividad bactericida y porque por lo general son reconocidas como seguros (GRAS) y por ello son utilizados para la preservación de varios alimentos (Tamblyn y Conner, 1997). Existen varios ácidos orgánicos que han probado ser efectivos en el procesamiento de aves tales como ácido acético, láctico, cítrico y succínico (Keener *et al*, 2004).

El ácido láctico reduce la incidencia de *Campylobacter* que se ha reportado en aguas de enjuague de canales en un 14.7% comparado con los controles; incorporar ácido láctico en agua de beber para los pollos durante el pretransporte FW (feed withdrawal) puede reducir la contaminación por *C. jejuni* y *Salmonella* de los canales de pollos para asar y de los desperdicios (Byrd *et al*, 2001). Sin embargo, la mayoría de los ácidos orgánicos alteran la apariencia de las canales ya sea decolorándolas, hinchándolas u oscureciéndolas (Dickens *et al*, 2000).

#### 7.5.3. Fosfato trisódico (TSP).

Los tratamientos con fosfato trisódico (TSP) poseen un efecto antimicrobiano superior comparado con otros fosfatos. Una solución mezclada de fosfato trisódico tiene un pH de 12 a 13; su alta alcalinidad aparentemente remueve la película de grasa y las bacterias, alterando las moléculas de grasa de la membrana celular provocando que las bacterias drenen su líquido intracelular (Oyarzabal, 2006). El TSP es reconocido como sustancia GRAS (Generally Recognized As Safe) por el US Food and Drug Administration (USDA) y ha sido aprobado a niveles de 8-12 % como agente antimicrobiano en canales de pollo crudo (Arrit *et al*, 2002).

Las canales son asperjadas o “dippeadas” en una solución de TSP por 15 segundos y la temperatura de aplicación es de 20-30 °C. El TSP está presente de manera natural en huesos y tejidos y por ello puede ser considerado como inofensivo (Capita *et al*, 2002). El tratamiento de canales de aves con TSP ha sido efectivo contra bacterias como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, etc (Sallam y Samejima, 2004, USDA, 1999).

#### 7.5.4. Probióticos.

Los probióticos son suplementos alimenticios de microorganismos vivos, se han usado para disminuir las muertes y para mejorar la productividad. Los suplementos prebióticos pueden incluir desde una sola cepa hasta mezclas complejas de distintos tipos de microorganismos. Los probióticos han sido utilizados para mejorar la producción de leche y huevos, y para los disminuir los niveles de *Salmonella* y de

*Campylobacter* en pollos a fin de reducir la contaminación de canales por estos microorganismos (Conway and Wang, 2000).

#### 7.5.5. Radiación.

La descontaminación de alimentos por radiación ionizante es segura, eficiente, medioambientalmente limpia y es un proceso eficiente en cuanto a energía. Se puede usar como un procedimiento de descontaminación de producto terminado sin afectar las cualidades nutricionales, sensoriales y técnicas; sin embargo, no son muy aprobados por el consumidor (Farkas, 1998).

#### 7.5.6. Agua electrolizada oxidante (EO).

Es un agente antimicrobiano relativamente nuevo que ha mostrado ser efectivo contra patógenos presentes en tablas de picar, suspensiones celulares y contra organismos detractores de vegetales (Fabrizio *et al*, 2002).

#### 7.5.7. Otros.

Se están examinando métodos alternativos para reducir cuentas de *Campylobacter*, incluyendo mezclas de ácidos orgánicos, y mezclas de fosfatos y de ácidos grasos (Keener *et al*, 2004). Por ejemplo: se ha utilizado peróxido de hidrógeno en combinación con ácidos orgánicos como aditivos de alimentos, sin embargo, su uso está restringido debido a sus efectos decolorantes y a su efecto negativo sobre las vitaminas (Whitney *et al*, 2008).

Sin embargo, estos métodos han demostrado no ser suficientes para eliminar los microorganismos presentes en ciertos alimentos, entre ellos está el caso del pollo y los productos avícolas derivados de éste.

### 7.6. Uso de plantas. Generalidades de plantas.

Se estima que existen aproximadamente 300,000 especies de plantas comestibles. De estas, históricamente el ser humano ha comido 2500 con cierta regularidad, pero solamente 150 han entrado al moderno mundo del comercio. Tempranamente, el ser

humano debió escoger las plantas que les parecieran más atractivas en color, olor o sabor. Los seres humanos también han sido capaces de establecer nuevos usos para muchos productos de las plantas (Simpson y Ogorzaly, 2001).

#### 7.6.1. Conservadores naturales: extractos de plantas.

El desarrollo de métodos nuevos y mejorados de preservación de alimentos es un área que en años recientes está siendo explorada, debido a las percepciones negativas de los consumidores hacia los conservadores artificiales, la atención de los investigadores se está desviando a la búsqueda de alternativas que sean aceptadas por los consumidores y en particular hacia los extractos de plantas. Está bien establecido que algunos extractos tienen propiedades antimicrobianas contra bacterias, levaduras y hongos (Smith-Palmer *etal*, 1998).

Es claro ver en estos estudios que estos metabolitos secundarios tienen aplicación potencial en tratamientos médicos y en aplicaciones en las industrias farmacéutica, de cosméticos y de alimentos (Kalemba and Kunicka, 2003). Por ello, ha habido un incremento en el interés de encontrar nuevos tipos de compuestos antimicrobianos efectivos y no tóxicos (Friedman *et al*, 2002).

Los productos naturales no tóxicos, compatibles con los alimentos son una filente de antimicrobianos que pueden ser útiles para reducir o eliminar microorganismos patógenos en las superficies de frutas y vegetales y en formulaciones agregadas a alimentos tales como jugos de frutas y vegetales, carne roja y carne de aves utilizadas para minimizar la contaminación de estos alimentos durante su almacenamiento comercial y en el hogar (Friedman *et al*, 2003).

Aunado a esto, las investigaciones sobre la actividad antimicrobiana, modo de acción y uso potencial de los extractos de plantas han ganado terreno debido a su disponibilidad en la naturaleza, una supuesta disminución en efectos secundarios o toxicidad así como mejor biodegradabilidad comparado con los antibióticos y conservadores disponibles (Kalemba and Kunicka, 2003). Además, esta actividad antimicrobiana de los extractos

de plantas ha mostrado ser efectiva contra un amplio espectro de bacterias patógenas y detractores de alimentos (Harpaz *et al*, 2003).

Se han realizado estudios para medir la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas contra patógenos predominantes en los alimentos (Arcila-Lozano *et al*, 2004). Por ejemplo, extractos del orégano han sido estudiados, encontrando que tiene una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, entre otros (Arcila-Lozano *et al*, 2004).

Entre las especies de orégano se encuentran como componentes principales el limoneno, el P -cariofileno, el p -cimeno, el canfor, el linalol, el a-pineno, el carvacrol y el timol. Su contenido depende de la especie, el clima, la altitud, la época de recolección y el estado de crecimiento (Arcila-Lozano *et ai*, 2004). Así también, se han probado diversos extractos de plantas contra el crecimiento de *Salmonella*, entre ellos: nuez moscada orégano, geranio, pimienta negra clavo, tomillo en *Salmonella* Pullorum. De éstas, las más efectivas fueron el orégano y el tomillo (Dormán and Deans, 2000).

También se han probado canela orégano, tomillo, contra *S. Typhi*; zacate limón, palmarosa, eucalipto, eugenol, timol, carvacrol, citral, contra *S. Typhimurium*. De éstas, las más efectivas fueron el tomillo, el orégano y la canela. (Kalemba and Kunicka, 2003).

Sobre *Salmonella* Enteritidis y sobre *Campylobacter jejuni* se han probado: anís, almendra, canela nuez moscada clavo, hierbabuena menta verde, laurel, albahaca, eucalipto, romero, lima limón, mandarina, naranja, bergamota romero, tomillo, ajo, cebolla mejorana, toronja jengibre. Contra *S. Enteritidis* las más eficaces fueron la canela, clavo, laurel y tomillo, mientras que contra *C. jejuni* el laurel, menta verde y el tomillo fueron las más efectivas (Palmer and Fyfe, 1998).

En el 2000, Dickens *et al.*, demostraron que una mezcla de extractos de hierbas llamada Protecta II era capaz de disminuir las cuentas de *Campylobacter* que se encontraban presentes en canales de pollo crudo; mencionando también que las hierbas presentes en el Protecta II forman un sinergismo con el acarreador salino por lo que existe una mayor actividad antimicrobiana. Posteriormente, en el 2006, Fisher y Phillips comprobaron que el limón europeo, la naranja dulce y la bergamota son capaces de inhibir el crecimiento de *Campylobacter jejuni*.

En 1998, López-Malo *et al.* reportaron el sinergismo existente entre la vainillina y los pH's ácidos. También existen otros reportes del sinergismo existente entre extractos de plantas, tal y como reportó Venegas (2007), en dicho trabajo utilizó como base el extracto de palo de Brasil por ser el de mayor potencial antimicrobiano, el cual combinó con huizache, mezquite y ébano.

En el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos se ha trabajado en la búsqueda de extractos de plantas con actividad contra bacterias enteropatógenas; se han probado diferentes extractos como: limón, cilantro, cola de caballo, eucalipto, clavo de olor, hierba de la golondrina, higo, árnica roja, gordolobo, guazima, poleo, árnica, salvia blanca, linaza, salvia real, orégano, laurel, manzanilla, hierbabuena, albahaca, aguacate, llantén, durazno, guayaba, romero, pirul, hierba mora, cempasúchil, anís, epazote, epazote de zorrillo, tomillo, jengibre y planta en cruz; contra microorganismos patógenos de alimentos: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium y *Staphylococcus aureus* (Alarcón, 2000).

Se encontró que, algunos extractos como cedro, clavo, eucalipto, laurel, manzanilla, orégano y tomillo mostraron acción antimicrobiana contra *B. cereus*. Mientras que *E. coli* fue afectada por extractos de la corteza de la guazima Por su parte, *C. perfringens* fue inhibida extractos de guayaba, romero, epazote de zorrillo, huizache, árnica roja, jengibre, hierba mora, cilantro, cola de caballo y ajeno (Alarcón, 2000).

En tanto que para *L monocytogenes* se ha encontrado que el cempasúchil, aguacate, hierba de la golondrina y el jengibre inhiben su crecimiento. Para *Salmonella* Typhimurium fueron la corteza de la guazima, el cempasúchil y el jengibre (Alarcón, 2000). *S. aureus* fue inhibida por la árnica, salvia blanca, orégano, hierba del burro, albahaca y gordolobo (Alarcón, 2000).

Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios acerca del efecto antimicrobiano de extractos de plantas contra *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. en un modelo de alimentos (Fisher and Philips, 2006), específicamente en productos avícolas; debido a que toda investigación se ha realizado *in vitro*. Además de que existe gran cantidad de reportes sobre mezclas de agentes químicos antimicrobianos o de mezclas de antibióticos contra diversos microorganismos, sin embargo, es por ello que es necesario realizar mayor investigación sobre la mezcla de extractos de plantas con actividad antimicrobiana.

#### 7.7. Métodos para probar la eficacia de antimicrobianos.

Para considerar una prueba de antimicrobianos, lo primordial es evaluar el grado de eficiencia de inhibición o inactivación de un grupo seleccionado de microorganismos bajo condiciones específicas. Todos los métodos utilizados para evaluar la eficacia del antimicrobiano son influenciados por factores que afectan la actividad aparente de un compuesto. Los factores inherentes al microorganismo de estudio, el agente antimicrobiano, el medio en que se está probando el antimicrobiano, y/o el procedimiento de prueba por sí mismo pueden alterar los resultados y juzgar el compuesto como ineficaz o viceversa (Tabla 1) (López-Malo *et al*, 2004).

Tabla 1.  
Factores que pueden afectar la actividad antimicrobiana

FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA		
Microorganismo de estudio.	Medio de cultivo	Procedimiento
Cepa Cantidad de inóculo Fisiología celular Medio de cultivo utilizado Agente antimicrobiano Interacción del compuesto probado con los componentes del medio Coeficiente de partición parcial	PH Actividad de agua Potencial redox	Condiciones de incubación Presión de oxígeno Concentración de CO <sub>2</sub> atmosférico Temperatura de incubación Variabilidad de equipo

Los métodos para evaluar la efectividad de antimicrobianos de extractos o compuestos que se agregan a alimentos han existido casi tanto como los desinfectantes y antibióticos y su clasificación se resume en la tabla 2 (López-Malo *et al*, 2004):

Tabla 2.  
Métodos para probar la eficacia de los antimicrobianos en alimentos

Métodos para probar la eficacia de los antimicrobianos en alimentos.		
<i>In vitro</i> , Escaneo o pruebas exploratorias.	Métodos aplicados	Pruebas de combinación de antimicrobianos
Métodos Endpoint Difusión en agar Diluciones en agar y en caldo Placas de gradiente Spiral plating Pruebas de desinfectantes y sanitizantes Métodos descriptivos Ensayos turbidimétricos Curvas de inhibición	Métodos endpoint Curvas de inhibición	Difusión en agar Ensayos de diluciones Curvas de inhibición

#### 7.7.1. Micrométodo.

Davidson y Parish revisaron de manera crítica los métodos utilizados para probar la eficacia de antimicrobianos de alimentos. La mayoría de los ensayos para compuestos antimicrobianos son laboriosos, tardados y caros. El método de dilución en microplaca ha probado ser útil para la industria farmacéutica debido al rápido escaneo de compuestos bioactivos (Wilson *et al*, 1997).

La ventaja de este método radica en que en una sola placa (96 pozos), se pueden probar hasta ocho cepas bacterianas, una cepa por fila, a diez concentraciones diferentes de un mismo antimicrobiano, además incluye un control de crecimiento positivo y un negativo, para asegurarse que no existe contaminación de la placa (PROY-NOM-059-PESC-2004).

#### 7.7.2. Método para combinación de antimicrobianos.

La predicción precisa de sinergismo entre antimicrobianos está basada en los resultados de pruebas *in vitro*. Las combinaciones de agentes antimicrobianos que han mostrado actividad *in vitro*, se han asociado de manera clínicamente más favorable con las bacterias gram-negativas. Se conocen gran cantidad de métodos para detectar sinergismo *in vitro*; sin embargo, el método de tablero de ajedrez es de los más utilizados (White *et al*, 1996).

Los métodos para comprobar combinaciones de antimicrobianos para efectos sinérgicos o aditivos, son procedimientos de rutina en muchos laboratorios. Sin embargo, los métodos empleados, son significativamente diferentes unos de otros, y sus resultados a menudo pueden no correlacionarse (Barriere *et al*, 1985). El método más utilizado para comprobar sinergismo es el índice de concentración fraccionaria inhibitoria (FIC) (Kubo *et al*, 2003). Este sinergismo se refiere a la determinación de la interacción entre dos compuestos de acción antimicrobiana, al realizar mezclas de diferentes concentraciones de compuesto (Dorsthorst *et al*, 2002).

El FIC es expresado mediante la siguiente ecuación:

$$FIC = FIC A + FIC B = \frac{CMB_{A}^{comb}}{CMB_{A}^{sola}} + \frac{CMB_{B}^{comb}}{CMB_{B}^{sola}}$$

Donde  $CMB_A^{sola}$  y  $CMB_B^{sola}$  son las concentraciones de los extractos A y B actuando solos, respectivamente. Y donde  $CMB_A^{comb}$  y  $CMB_B^{comb}$  son las concentraciones de los extractos A y B en combinaciones isoeffectivas, respectivamente (Afeltra *et al*, 2004). Es decir, el FIC se define como la suma de las CMB de cada uno de los extractos cuando son usados en combinación, divididos entre la CMB de cada extracto usado solo (Cantón *et al*, 2005).

Cuando se obtiene un valor de  $FIC > 0.5$ , se considera que existe un efecto sinérgico entre los extractos; cuando al hacer los cálculos del FIC y el resultado arrojado es  $0.5 > FIC < 2$ , hay indiferencia entre los extractos; mientras cuando los resultados obtenidos del cálculo del FIC son  $> 2$ ; podemos concluir que existe un antagonismo entre los extractos (Poulos *et al*, 1995).

#### 7.8. Análisis sensoriales.

La evaluación sensorial fue definida en 1975 por la División Sensorial del Instituto de Tecnólogos en Alimentos y aceptada mundialmente como una disciplina científica usada para evocar, medir, analizar e interpretar características de los alimentos y materiales tal y como son percibidos por los sentidos del gusto, tacto, olfato y oído. Es en definitiva un método experimental mediante el cual los jueces perciben y califican, caracterizando y/o midiendo, las características sensoriales de muestras adecuadamente presentadas, bajo condiciones ambientales preestablecidas y bajo un patrón de evaluación acorde al posterior análisis estadístico (Frontela *et al*, 2006).

Los objetivos de la evaluación sensorial en carne y productos cárnicos, se centran fundamentalmente en caracterizar sensorialmente estos alimentos y en detectar las variaciones sensoriales que se producen como consecuencia de los distintos métodos de

cocinado de la carne (Frontela *et al.*, 2006). El nivel de exigencia sobre la calidad de la carne y sus derivados es cada vez mayor, sobre todo en lo que hace referencia a las cualidades organolépticas de color, jugosidad, textura y sobre todo el sabor (sensaciones olfativo-gustativas (Astiasarán y Martínez, 2003).

El análisis sensorial es una herramienta útil para los atributos que determinan la elección del producto por un determinado sector de la población y de esta manera es posible modificar y/o agregar aditivos a un producto para adecuarlo a las preferencias de tales consumidores (Frontelas *et al.*, 2006).

## MÉTODOS:

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

Se realizó una colecta de 29 plantas comestibles y/o vegetales en centros comerciales del área metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León; para probar su actividad antimicrobiana contra *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni/coli*.

Tabla 3.  
Plantas probadas

Nombre común	Nombre científico	Familia	Parte estudiada
Chile poblano	<i>Capsicum</i> spp.	Solanaceae	Fruto
Chile morrón	<i>Capsicum</i> spp.	Solanaceae	Fruto
Piña	<i>Ananas</i> spp.	Bromeliaceae	Fruto
Chayóte	<i>Sechium</i> spp.	Cucurbitaceae	Fruto
Cilantro	<i>Coriandrum</i> spp.	Apiaceae	Hoja
Espárrago	<i>Asparagus</i> spp.	Liliaceae	Vaina
Nopal	<i>Opuntia</i> spp.	Cactaceae	Fruto
Tomatillo	<i>Physalis</i> spp.	Solanaceae	Fruto
Tomate	<i>Solanum</i> spp.	Solanaceae	Fruto
Ciruela	<i>Prunus</i> spp.	Rosaceae	Fruto
Albácar	<i>Ocimum</i> spp.	Lamiaceae	Hoja
Ciruela pasa	<i>Prunus</i> spp.	Rosaceae	Fruto
Limón colima	<i>Citrus</i> spp.	Rutaceae	Fruto y cáscara
Limón sin semilla	<i>Citrus</i> spp.	Rutaceae	Fruto y cáscara
Limón real	<i>Citrus</i> spp.	Rutaceae	Fruto y cáscara

Tabla 3. Continuación

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Familia</b>	<b>Parte estudiada</b>
Orégano	<i>Origanum</i> spp.	Lamiaceae	Hoja
Ajo	<i>Allium</i> spp.	Liliaceae	Fruto
Semilla de calabaza	<i>Cucúrbita</i> spp.	Cucurbitaceae	Semilla
Semilla de girasol	<i>Helianthus</i> spp.	Asteraceae	Semilla
Clavo	<i>Caryophyllus</i> spp.	Myrtaceae	Semilla
Ajonjolí	<i>Sesamum</i> spp.	Pedaliaceae	Semilla
Mijo rojo	<i>Panicum</i> spp.	Poaceae	Semilla
Semilla de pimienta negra	<i>Piper</i> spp.	Piperaceae	Semilla
Anís	<i>Pimpinela</i> spp.	Apiaceae	Semilla
Alpiste	<i>Phalaris</i> spp.	Poaceae	Semilla
Semilla de mostaza negra	<i>Brassica</i> spp.	Brassicaceae	Semilla
Cáscara de n. a.	<i>Citrus</i> spp.	Rutaceae	Fruto
Comino	<i>Cuminum</i> spp.	Apiaceae	Semilla
Guayaba	<i>Psidium</i> spp.	Myrtaceae	Fruto

## 8.2. Obtención de los extractos.

Para realizar la obtención de los extractos crudos, se colocaron 20 gramos de material vegetal en un vaso de licuadora, se agregaron 100 ml de etanol al 96% para posteriormente triturarla durante 2 minutos. La planta más el solvente fueron macerados durante 48 horas a temperatura ambiente (Cho *et al*, 2008). El extracto obtenido se filtró a través de papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se colocó en platos de vidrio y el

solvente fue evaporado a temperatura ambiente. Una vez seco, el extracto se resuspendió en amortiguador de fosfatos (PBS), 50 mM a pH 7.4.

La fracción soluble se centrifugó a 14000 r.p.m. por 15 minutos. Los extractos obtenidos fueron esterilizados por filtración, utilizando membranas de nitrocelulosa Millipore con un tamaño de poro de 0.45 p.m, el extracto estéril fue colocado en viales estériles color ámbar, y se mantuvieron a 4° C hasta su uso, siendo refrigerados durante un tiempo máximo de 6 meses. Para determinar la concentración del extracto obtenido, se tomó 1 ml del mismo y se colocó en un tubo de ensayo, el cual se ajustó previamente a peso seco constante y se dejó secar. La diferencia del peso del tubo antes y después de colocar el extracto fue el peso del extracto (Alarcón, 2000).

### 8.3. Cepas bacterianas y condiciones de cultivos.

Las cepas que se utilizaron en este estudio fueron: *Campylobacter jejuni* 5653 donada por la Dra. Irene Wesley del Centro Nacional de Enfermedades de Animales USD A, Ames, Iowa; *Campylobacter coli* 19 (nativa, aislada de pollo) del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la FCB; éstas cepas se conservaron como cultivos de reserva a -80 °C en crioviales con glicerol estéril. Las cepas de *Salmonella* Typhi ATCC 19430 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 se conservaron del mismo modo, sin embargo, también fueron conservadas a 4 °C en tubos de tapón de rosca con agar ICC, realizando resiembras cada tres meses.

Para la activación de *Campylobacter jejuni coli* se tomó una alícuota del cultivo de reserva mantenido en congelación a -80° C y se inoculó en 5 ml de caldo Infusión Cerebro-Corazón (ICC Bioxon) suplementando con extracto de levadura al 0.6%. Los tubos fueron incubados a 42° C en condiciones de microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>) durante 48 horas. Una vez activadas las cepas se realizaron resiembras en placas de agar Mueller-Hinton suplementadas con 5 % de sangre lisada. El inóculo fue ajustado al 0.5 del Nefelómetro de McFarland (1.5x10<sup>8</sup> UFC/ml).

Para la activación de las cepas de *Salmonella*, se inoculó una asada del cultivo de reserva en tubos con 5 ml de caldo ICC y se incubó en condiciones aerobias a 37° C por 18 horas. El inóculo fue ajustado al 0.5 del Nefelómetro de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml).

#### 8.4. Ensayo preliminar de actividad antimicrobiana contra *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni/coli*.

Para determinar el efecto antimicrobiano de los extractos. Primeramente se realizó un tamizaje por se utilizó el método de difusión en pozo en agar (Alarcón, 2002). Este consistió en sembrar por extensión con un asa de Driglalsky 100 /al de las cepas en placas con agar Mueller-Hinton (Bioxon); en el caso de *Campylobacter jejuni coli*, el medio fue suplementado con 5% de sangre hemolisada.

Posteriormente se realizaron pozos en el agar, utilizando un tubo Durham invertido (5 mm de diámetro) y en ellos se agregaron 100  $\mu$ l de los extractos a probar, las placas se incubaron a 42° C por 48 horas en condiciones de microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>) para las cepas de *Campylobacter jejuni/coli*, y a 37° C por 24 horas en condiciones de aerobiosis en el caso de *Salmonella* spp. Pasado el tiempo de incubación, se observó el efecto del extracto sobre la bacteria mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo. Como control se adicionó a uno de los pozos el solvente utilizado para realizar los extractos (amortiguador de fosfatos).

#### 8.5. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Campylobacter jejuni/coli*.

Los ensayos para determinar la CMB se realizaron por el método de microdilución de acuerdo al PROY-NOM-059-PESC-2004 el cual está basado en los estándares establecidos por la NCCLS; sin embargo, se realizaron ciertas modificaciones acordes a

cada cepa. Para esto se utilizaron microplacas de 96 pozos (Buck y Kelly, 1982). Se esterilizaron las placas exponiéndolas a luz UV durante 15 minutos, los pozos fueron llenados con 100 pl de caldo Mueller-Hinton Bioxon. Posteriormente se agregaron los extractos en diferentes concentraciones, tal como lo muestra la Tabla 4 (Luber *et al*, 2002).

Tabla 4.

Uso de microplacas. Contenido de los pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	-	>	-	-	-	-	-	-	-	-	<
B	+	-	>	->	-	-	-	-	-	-	-	<
C	+	-	>	-	-	-	-	-	-	-	-	<
O	+	-	>	-	-		-	-	-	-	-	<
E	+	-	>	-	-	-	-	-	-	-	-	<
F	+	-	>	-	-	->	->	-	-	-	-	<
G	+	-	>	-	-	-	-	-	-	-	-	<
H	+	-	>	-	-		-	-	-		-	<

+ . Control positivo. 100 pl de medio de cultivo.

-: Control negativo. 100 pl de medio de cultivo + 5 pl de solución salina.

> : Concentración máxima. 100 pl de medio de cultivo +100 pl de extracto concentrado.

—► : Concentraciones intermedias. 100 pl de medio de cultivo + 100 pl del pozo anterior.

< : Concentración mínima. 100 pl de medio de cultivo + 100 pl del pozo anterior y se descartan 100 pl.

Las placas se inocularon con 5 % v/v de las cepas de trabajo activadas y (Olasupo *et al*, 2003) ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^8$ . Se inocularon todos los pozos excepto el pozo del control negativo, al cual se agregó amortiguador de fosfatos estéril. Se incubaron las placas a 42° C por 48 h en condiciones microaerofílicas (10% CO<sub>2</sub>)

(McDermott *et al*, 2005). Después de la incubación se tomaron los 100 gl de cada pozo y fueron sembrados por extensión con un asa de Digrafsky en agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre lisada. Una vez que se ubicó el rango de concentraciones entre las que se produjo inhibición, se procedió de la siguiente manera (Tabla 5):

Tabla 5.  
Uso de microplacas. Rangos establecidos.

COLUMNA	NOMBRE	CONTENIDO
1	Control positivo	100 pl de medio de cultivo
2	Control negativo	100 gl de medio de cultivo + 5 pl de solución salina
3-12	Diferentes concentraciones	50 gl de medio de cultivo + 50 pl de extracto

Para establecer la CMB, a partir de los cultivos anteriores, se tomaron los 100 gl de cada pozo y se realizó una siembra en placas de Petri con agar Mueller-Hinton, se suplemento con 5% de sangre lisada (McDermott *et al*, 2005). Las placas se incubaron a 42° C por 48 horas en condiciones microaerofílicas (10% CO<sub>2</sub>). La CMB se definió como la concentración mínima de extracto que inhibió completamente el crecimiento microbiano.

#### 8.6. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Salmonella*

En este caso, se realizó igual que en el punto anterior, con la diferencia de que se incubaron las microplacas a 37° C por 24 horas en condiciones aerobias (Conner y Bilgili, 1994) y que al realizar el plaqueo del contenido de los pozos se llevó a cabo por

difusión en placas con agar Mueller-Hinton Bioxon y se incubaron las placas a 37° C por 24 horas.

#### 8.7. Determinación de combinaciones efectivas de los extractos

Se realizó mediante el método de tablero de ajedrez descrito por Orhan y otros (2005), con ciertas adaptaciones. Se distribuyeron 50 pl de caldo Mueller-Hinton en los pozos de una microplaca estéril de 96 pozos. Se agregaron 50 pl de mezclas de los extractos con concentraciones del 25, 50, 75 y 100 % de la CMB encontrada de cada extracto. Se realizaron las siguientes mezclas: Limón-Ciruela, Limón-Cáscara de naranja agria y Ciruela-Cáscara de naranja agria, quedando de la forma mostrada en la Tabla 6:

Tabla 6.

Esquema general de las mezclas realizadas.

	Extracto B 25%	Extracto B 50%	Extracto B 75%	Extracto B 100%
Extracto A 100%	100-25	100-50	100-75	100-100
Extracto A 75%	75-25	75-50	75-75	75-100
Extracto A 50%	50-25	50-50	50-75	50-100
Extracto A 25%	25-25	25-50	25-75	25-100

Extracto A: según fuese la mezcla.

Extracto B: según fuese la mezcla.

Una vez realizadas las combinaciones de los extractos, se inocularon las placas (5 % v/v) con un inóculo ajustado a  $1 \times 10^8$  UFC. Las placas inoculadas con *Campylobacter jejuni/coli* se incubaron en condiciones microaerofílicas (10% CO<sub>2</sub>) durante 48 h a 42 °C, mientras que las placas inoculadas con *Salmonella* spp. se incubaron a 37 °C durante

24 h en condiciones aerobias. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó el plaqueo de cada uno de los pozos; *Campylobacter* se plaqueó en agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre hemolisada mientras que *Salmonella* se plaqueó en agar Mueller-Hinton. Estos ensayos se realizaron por duplicado y se realizaron tres repeticiones.

El efecto de las combinaciones fue evaluados por el índice de concentración inhibitoria fraccionaria (FIC). Los FIC's fueron calculados como la CMB de los extractos combinados dividido entre la CMB de los extractos respectivamente; el índice FIC fue obtenido sumando ambas FIC's anteriores (Hu *et al*, 2002).

$$\text{FIC A} = \frac{\text{CMB A en combinación}}{\text{CMB A}}$$

$$\text{FIC B} = \frac{\text{CMB B en combinación}}{\text{CMB B}}$$

$$\text{FIC} = \text{£ (FIC A + FIC B)}$$

Los índices FIC fueron interpretados de la siguiente forma: cuando la EFIC fue <0.5 se consideró que existía un efecto sinérgico entre los extractos; cuando la IFIC fríe >5 a < 2 se consideró que existía un efecto indiferente entre los extractos; y cuando la SFIC > 2 se consideró que existía un efecto antagonista entre los extractos (Orhan *et al*, 2005).

Aplicación sobre un modelo alimenticio. Se utilizó el método descrito por Fisher and Phillips (2006), realizando ligeras modificaciones.

La piel de pollo crudo fue obtenida de un expendio de pollo del área metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León. Para remover la microflora que pudiera competir con el inóculo, la piel del pollo fue separada de cualquier capa visible de grasa con la ayuda de unas tijeras y un bisturí estériles; fue cortada en trozos de aproximadamente de 2x2 cm, lo cual equivale aproximadamente a 1 g (Datta *et al*, 2008, Birk *et al*, 2006). Los pedazos se colocaron en una bolsa Nasco estéril con capacidad de 1 L y se

realizaron varios lavados; los primeros lavados se realizaron con agua potable de grifo mientras que los últimos se realizaron con agua destilada estéril. La piel fue separada y colocada por separado en cajas Petri estériles para posteriormente ser expuestas a luz UV a una longitud de onda de 260 durante media hora, después de este periodo la piel fue volteada para exponer el lado que no había sido expuesto a este tratamiento. Finalmente se dejaron 24 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Long y Phillips, 2003).

Sobre estos fragmentos de piel se agregaron alícuotas de 100 pl del inóculo ajustado de  $1 \times 10^x$  UFC del coctel de *Campylobacter jejuni/coli* y se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 2 ml de las mezclas de los extractos (limón, limón-ciruela, limón-cáscara de naranja agria, limón-ciruela-cáscara de naranja agria) con las concentraciones de sus respectivas CMB's en una proporción (1:1). Y estos sistemas se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  (Niebuhr *et al*, 2008) por *diferentes tiempos*: 0 h, 48 h y 120 horas; para el tiempo cero no se incubó en refrigeración y se procedió inmediatamente con el resto de la metodología. Para la cepa de *Salmonella* Typhimurium, se agregaron alícuotas de 100 pl del inóculo ajustado de  $1 \times 10^8$  UFC, realizando posteriormente el mismo procedimiento.

Una vez pasado el tiempo de incubación, la muestra de piel de pollo se colocó en una bolsa Nasco estéril con 9 ml de solución salina al 0.85% estéril y se homogenizó vigorosamente durante 2 minutos. Se realizaron diluciones de la suspensión resultante ( $10^1$  a  $10^{-5}$ ). En el caso de *Campylobacter* se sembró por extensión en placas con agar de Campy-Cefex suplementadas con 5 % de sangre lisada (Tran, 1998) y se incubaron a  $42^{\circ}\text{C}$  por 48 horas en microaerofilia (10% de  $\text{CO}_2$ ); mientras que *Salmonella* se sembró por extensión en agar XLD DIFCO y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en condiciones aerobias. Finalmente se realizó un conteo de colonias de cada dilución.

Los controles de la muestra de pollo fueron tres: para el control negativo se sembraron en placas de agar (de los medios ya mencionados dependiendo de la cepa) las muestras de piel solamente expuestas a 2 ml agua destilada estéril, en los casos que se presentó crecimiento ya sea de *Salmonella* o *Campylobacter* se descartó el ensayo debido a que implicaría una contaminación inicial de la muestra. Como control positivo

se utilizó una solución de fosfato trisódico al 10 % (Sallam y Samejima, 2004). Y como blanco se utilizó la piel de pollo inoculada con el microorganismo pero sin añadir ningún extracto vegetal.

#### 8.9. Análisis sensorial.

Se llevó a cabo mediante una prueba simple de rangos de acuerdo a lo descrito por Meilgaard y cois. (2007). Se realizó con alitas de pollo naturales, las cuales fueron compradas en un centro comercial de la zona metropolitana de la ciudad de Monterrey. Las piezas fueron lavadas con agua corriente, se dio un último lavado con agua purificada y después fueron colocadas en recipientes de plástico con tapa. Las alitas fueron sumergidas en 300 ml de la mezcla de extractos previamente seleccionados: Limón, Limón-Ciruela, Limón-Cáscara de naranja agria y Limón-Ciruela-Cáscara de naranja agria. La concentración de los extractos fue seleccionada de acuerdo a la CMB presentada para *Campylobacter*.

Al control negativo se le agregó agua purificada en vez de extractos. Los recipientes fueron agitados vigorosamente y se dejaron reposar en refrigeración durante 48 horas. Después de este periodo, las alitas fueron colocadas en charolas de aluminio desechables, las cuales fueron cubiertas con papel aluminio y sometidas a una temperatura de 180 °C durante 80 minutos para su cocimiento.

El análisis sensorial de las alitas cocidas se llevó a cabo con un panel de personas no entrenadas, compuesto por estudiantes y maestros de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL) ( $n = 32$ ), los cuales fueron voluntarios para este análisis. Se utilizó un cuestionario de prueba para evaluar el orden de preferencia hacia las alitas, utilizando el formato observado en la Figura 7. Asignando un número del 1 al 5 de acuerdo a su preferencia. El número 1 equivalía a la de menor preferencia mientras que el número 5 equivalía a la de mayor preferencia. A los panelistas les fue ofrecido un vaso con agua entre cada muestra (Sturles *et al*, 2004).

## 8.10. Análisis de los grupos químicos de los extractos.

Se realizó la determinación de los grupos químicos de los extractos. Estos se describen a continuación:

### 8.10.1. Hidrocarburos insaturados.

- Para determinar insaturaciones se utilizó 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 SCIENTIF1C), 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).

### 8.10.2. 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).

### 8.10.3. Flavonoides

- Para determinar flavonoides se utilizó la Prueba de Shinoda donde el extracto fue mezclado con un fragmento de limadura de magnesio (CTR SCIENTIF1C) y cuatro gotas de ácido clorhídrico concentrado (CTR SCIENTIF1C). La prueba fue positiva cuando se presentaron coloraciones: naranja (flavonas), roja (flavononas), roja azulosa (flavonoles) ó violeta (xantanas o flavonoles) (Domínguez, 1988).

### 8.10.4. Sesquiterpenlactonas

- Para determinar los grupos de sesquiterpenlactonas se utilizó 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 a y (3 insaturadas (Domínguez, 1988).

#### 8.10.5. 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).

#### 8.10.6. p-benzoqui nonas

- Para determinar p-benzoqui nonas 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).

#### 8.10.7. 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).

#### 8.10.8. 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).

#### 8.10.9. Aldehidos y cetonas

- Para la determinación de aldehidos 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 a o P insaturados y/o un precipitado amarillo fue positivo para carbonilos saturados (Domínguez, 1988).

#### 8.10.10. 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).

#### 8.10.11. 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).

#### 8.11. Análisis estadístico.

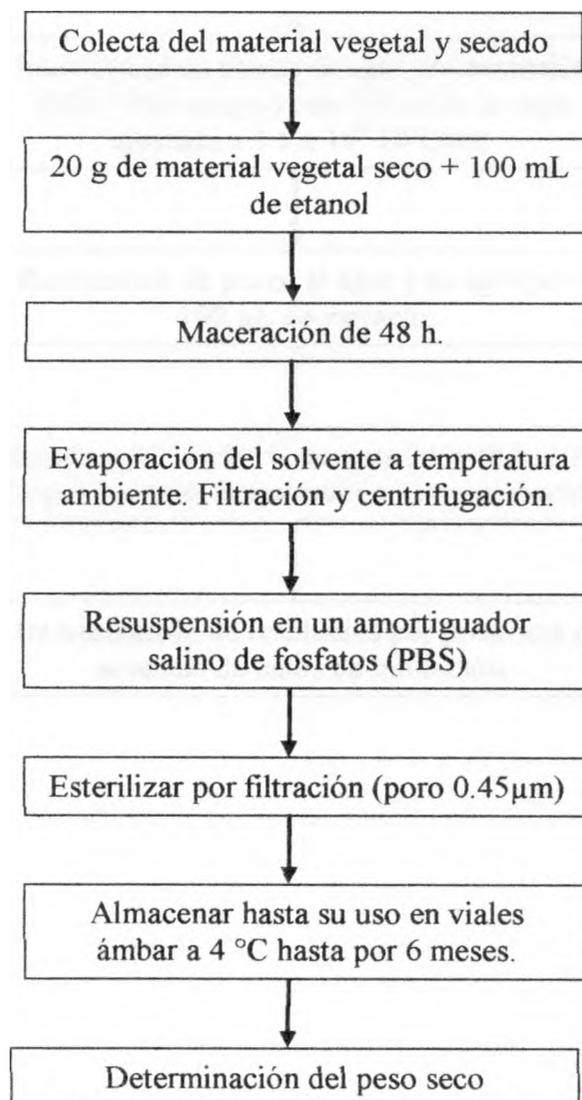
Los resultados fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA), además de la prueba de comparación de medias de Dunnett, a través del paquete estadístico SigmaStat.

Para el caso del análisis sensorial, se utilizó el procedimiento de comparación múltiple de muestras relacionadas que involucra la suma de rangos de Friedman para el análisis de datos ordinales, a través del paquete estadístico SigmaStat.

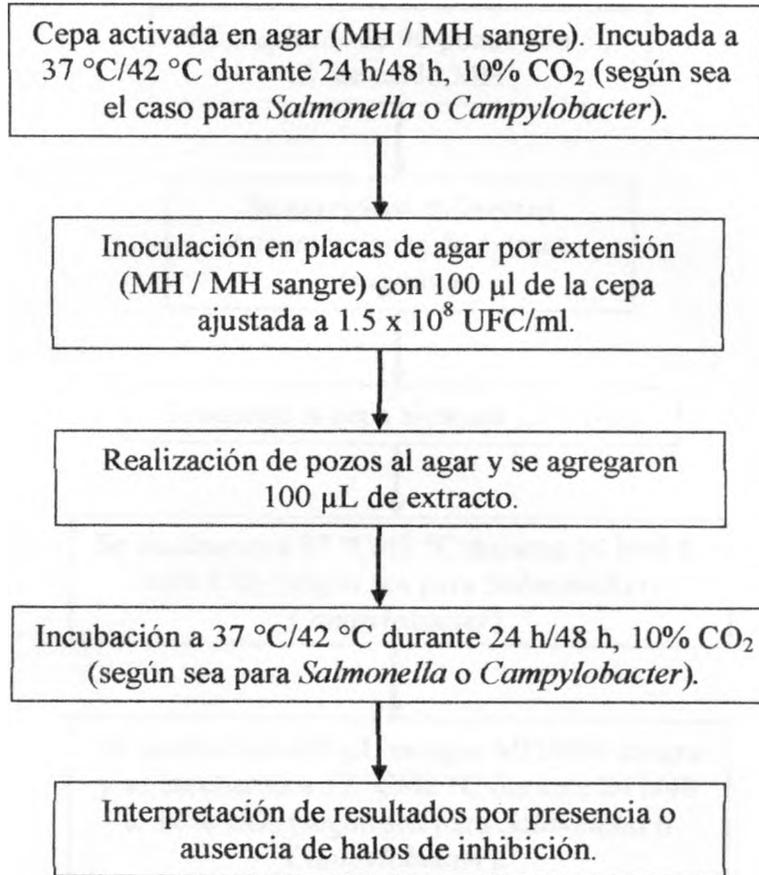
## DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS:

Diagrama de flujo

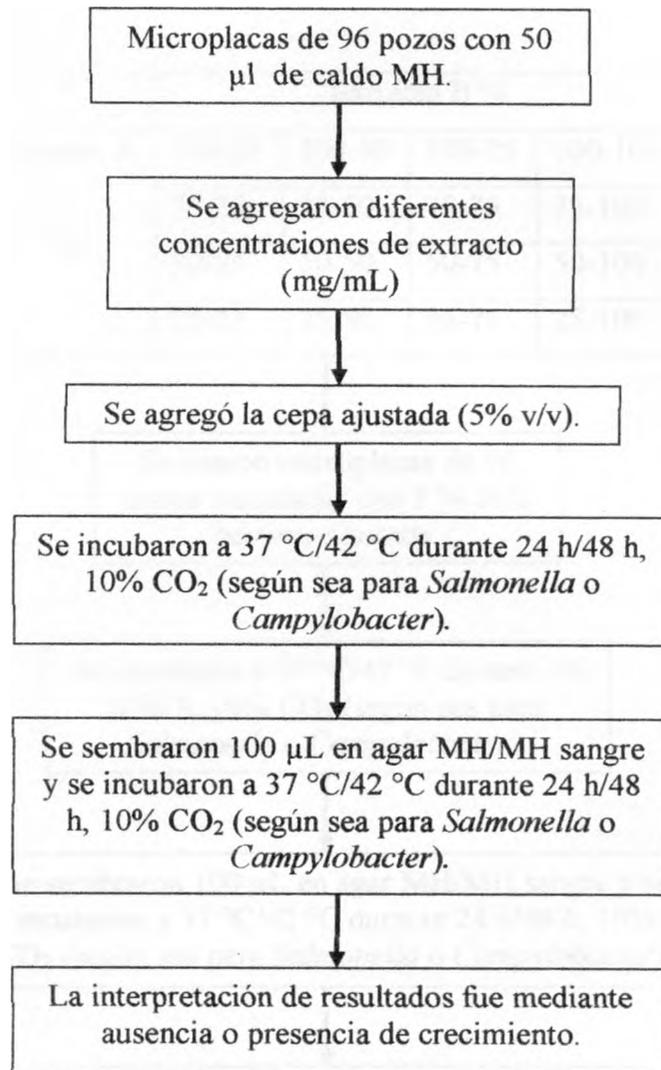
Obtención de extractos



**Ensayos preliminares de actividad antimicrobiana de los extractos**



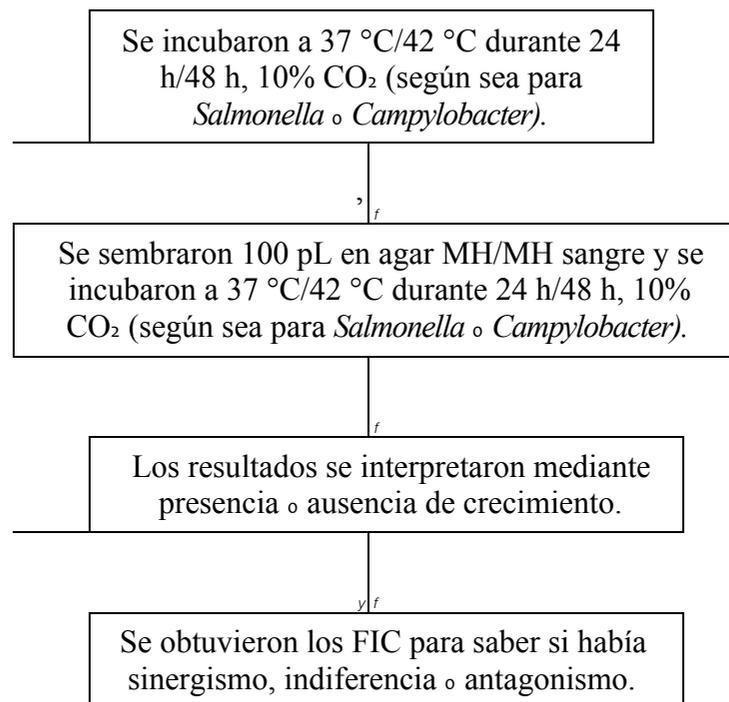
### Determinación de la CMB.



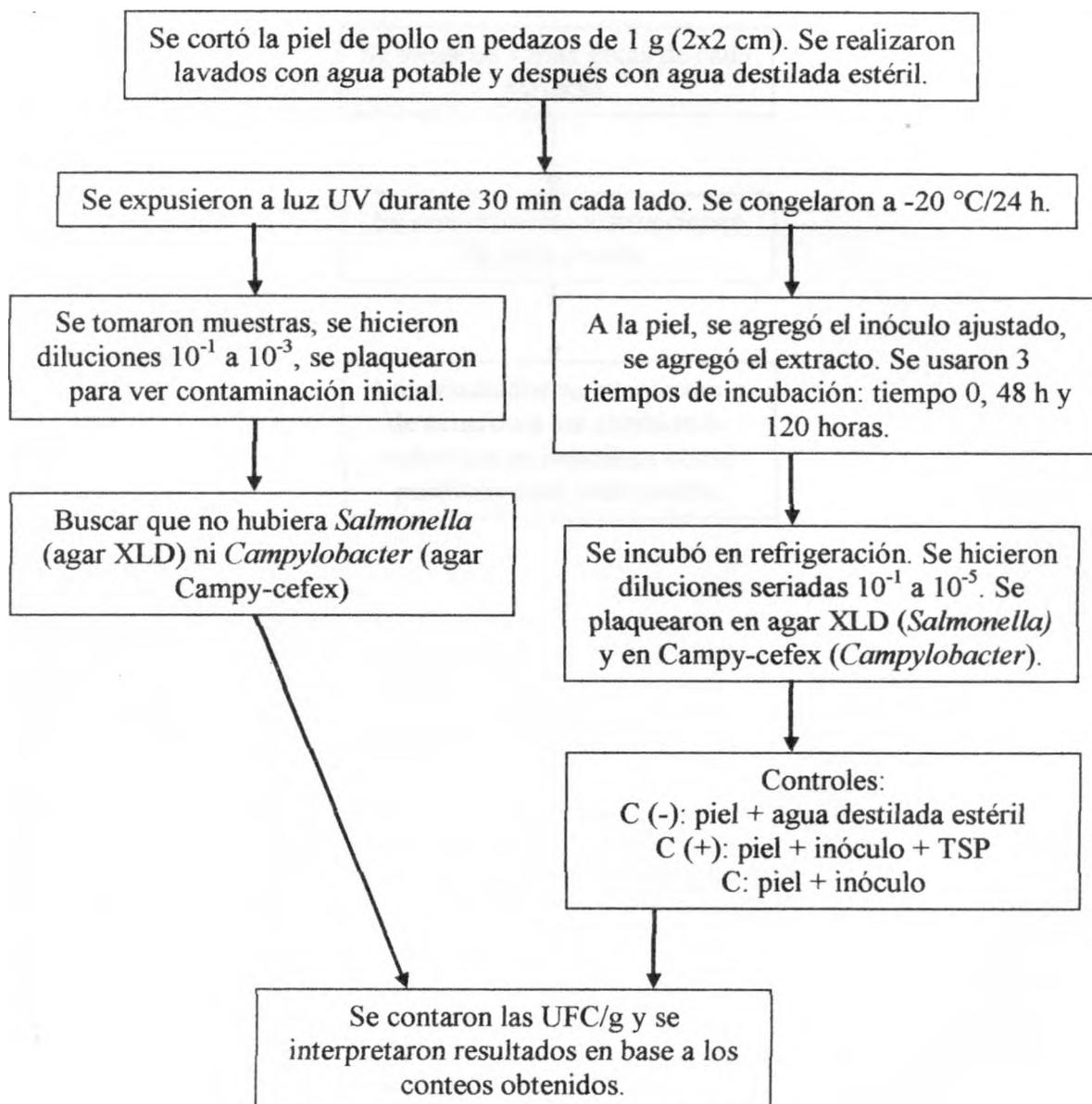
Determinación de las combinaciones efectivas de los extractos. Método de tablero de ajedrez.

	Extracto B %			
Extracto A	100-25	100-50	100-75	100-100
%	75-25	75-50	75-75	75-100
	50-25	50-50	50-75	50-100
	25-25	25-50	25-75	25-100

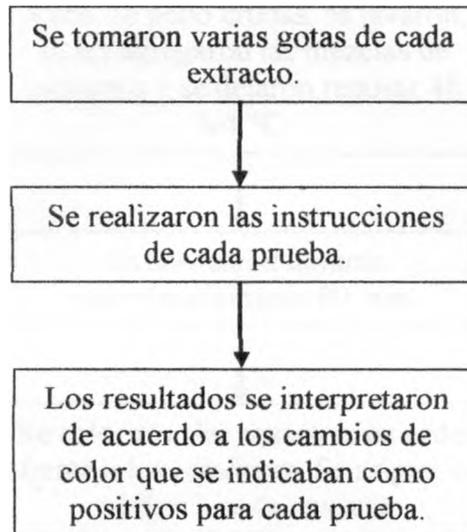
Se usaron microplacas de 96 pozos inoculadas con 5 % de la bacteria ajustada.



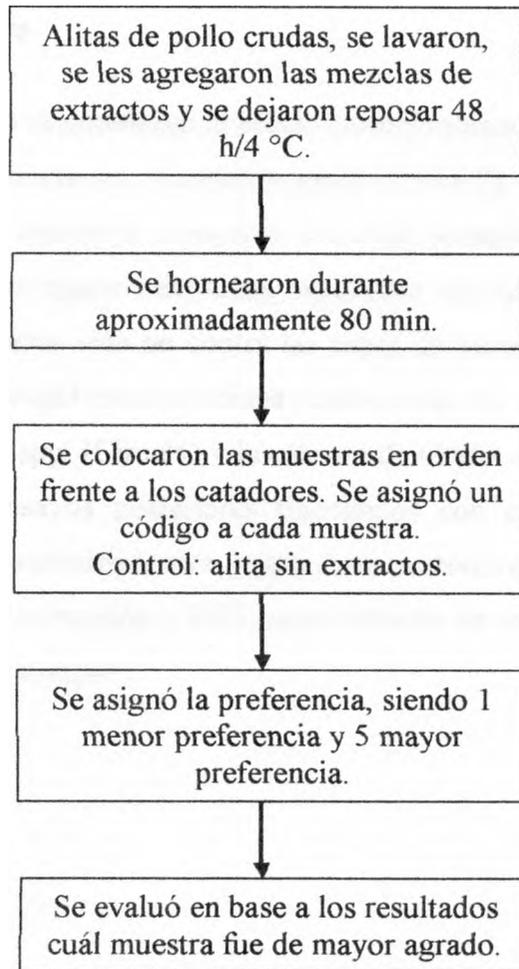
## Aplicación sobre el modelo alimenticio.



**Determinación de grupos funcionales de los extractos.**



### Análisis sensorial.



## RESULTADOS:

### 9.1. Ensayos preliminares.

En el presente trabajo se determinó el efecto antimicrobiano de extractos metanólicos y etanólicos de 29 muestras de material vegetal (Tabla 7); sumando un total de 53 extractos. No todos los extractos mostraron actividad antimicrobiana contra las cepas trabajadas, aunado a que algunos extractos mostraban actividad antimicrobiana contra las cepas de *Campylobacter* mas no contra las cepas de *Salmonella*. Los extractos que mostraron la mayor actividad antimicrobiana contra todas las cepas fueron *Citrus limón* (Limón colima), *Prurtus* spp. (Ciruela) y la cáscara de *Citrus aurantium* (naranja agria); por lo que para los ensayos posteriores trabajamos con estos, ya que eran frutas comestibles sin ninguna variedad tóxica y para fines posteriores. Así también utilizamos etanol como solvente de extracción y **PBS** como solvente de resuspensión ya que no son tóxicos para el consumo humano.

**162903**

Tabla 7.

Efecto antimicrobiano de extractos de frutas y vegetales mediante la técnica de difusión de pozo en agar sobre el crecimiento de *Campylobacter jejuni* 5653, *Campylobacter coli* 19, *Salmonella* Typhi ATCC 19430 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

PLANTA	NOMBRE CIENTÍFICO	SOLVENTE	RESUSP.	MICROORGANISMOS ANALIZADOS			
				S. Typhi 19430	ó Typhimurium 14028	C. jejuni 5653	C. coli 19
Chile poblano	<i>Capsicum</i> spp.	Etanol	Etanol	X	X	X	X
Chile morrón	<i>Capsicum</i> spp.	Etanol	Etanol	X	X	X	X
Pifia	<i>Ananas</i> spp.	Etanol	Etanol	X	X	V	z
Chayóte	<i>Sechium</i> spp.	Etanol	Etanol	X	X	X	X
Cilantro	<i>Coriandrum</i> spp.	Etanol	Etanol	X	X	z	V
Espárrago	<i>Asparagus</i> spp.	Etanol	Etanol	X	X	X	s
Nopal	<i>Opuntia</i> spp.	Etanol	Etanol	X	X	X	X
Tomatillo	<i>Physalis</i> spp.	Etanol	Etanol	X	X	X	X
Tomate	<i>Solcimum</i> spp.	Etanol	Etanol	X	X	X	X
Ciruela	<i>Prurtus</i> spp.	Etanol	Etanol	20 mm VZ	20 mm ///	14 mm //	12 mm ///
Pifia	<i>Ananas</i> spp.	Etanol	PBS		Z	NP	NP
Espárrago	<i>Asparagus</i> spp.	Etanol	PBS	X	X	NP	NP
Cilantro	<i>Coriandrum</i> spp.	Etanol	PBS	X	X	NP	NP
Tomate	<i>Solamim</i> spp.	Etanol	PBS	V	/	NP	NP
Nopal	<i>Opuntia</i> spp.	Etanol	PBS	X	X	NP	NP
Albácar	<i>Ocimum</i> spp.	Etanol	PBS	X	X	NP	NP

Z : poca inhibición (0-5 mm).

SS : mediana inhibición (5-10 mm).

ZZZ : mucha inhibición (>10 mm).

X : No hubo inhibición.

NP : No probado.

mm : diámetro de halo de inhibición.

Continuación de la Tabla 7.

PLANTA	NOMBRE CIENTÍFICO	SOLVENTE	RESUSP.	MICROORGANISMOS ANALIZADOS			
				S. Typhi 19430	S. Typhimurium 14028	C. jejuni 5653	C. coli 19
Ciruela pasa	<i>Prunus</i> spp.	Etanol	PBS	z	yy	yy	yy
Limón real	<i>Citrus</i> spp.	Etanol	PBS	yy	yy	yy	yy
Nopal	<i>Opuntia</i> spp.	Metanol	Etanol	X	X	y	y
Guayaba	<i>Psidium</i> spp.	Metanol	Etanol	X	X	NP	NP
Guayaba	<i>Psidium</i> spp.	Etanol	Etanol	X	X	NP	NP
Guayaba	<i>Psidium</i> spp.	Metanol	Metanol	x	X	NP	NP
Clavo	<i>Caryophyllus</i> spp.	Et/Met	Etanol	X	X	NP	NP
Clavo	<i>Caryophyllus</i> spp.	Et/Met	PBS	y	y	NP	NP
Clavo	<i>Caryophyllus</i> spp.	Et/Met	Metanol	y	y	NP	NP
Ajonjolí	<i>Sesamum</i> spp.	Et/Met	PBS	X	X	NP	NP
Ajonjolí	<i>Sesamum</i> spp.	Et/Met	Etanol	X	X	NP	NP
Semilla calabaza	<i>Cucúrbita</i> spp.	Et/Met	PBS	X	X	NP	NP
Semilla calabaza	<i>Cucúrbita</i> spp.	Et/Met	Etanol	X	X	NP	NP
Semilla calabaza	<i>Cucúrbita</i> spp.	Et/Met	Metanol	X	X	NP	NP
Mijo rojo	<i>Panicum</i> spp.	Et/Met	PBS	X	X	NP	NP
Mijo rojo	<i>Panicum</i> spp.	Et/Met	Etanol	X	X	NP	NP
Mijo rojo	<i>Panicum</i> spp.	Et/Met	Metanol	X	X	NP	NP
S. Pimienta negra	<i>Piper</i> spp.	Et/Met	PBS	X	X	NP	NP
S. p. n.	<i>Piper</i> spp.	Et/Met	Etanol	X	X	NP	NP
S. p. n.	<i>Piper</i> spp.	Et/Met	Metanol	X	X	NP	NP

C . poca inhibición (0-5 rara).  
 CS : mediana inhibición (5-10 mm).  
 SSS mucha inhibición (>10 mm).

X . No hubo inhibición.  
 NP : No probado.  
 mm : diámetro de halo de inhibición.

Continuación de la Tabla 7.

PLANTA	NOMBRE CIENTÍFICO	SOLVENTE	RESUSP.	MICROORGANISMOS ANALIZADOS			
				<i>S. Typhi</i> 19430	<i>A. Typhimurium</i> 14028	<i>C. jejuni</i> 5653	<i>C. coli</i> 19
Anís	<i>Pimpinella</i> spp.	Et/Met	Etanol	X	X	NP	NP
Anís	<i>Pimpinella</i> SPP	Et/Met	PBS	X	X	NP	NP
Anís	<i>Pimpinella</i> spp.	Et/Met	Metanol	X	X	NP	NP
Alpizte	<i>Phalaris</i> spp.	Et/Met	PBS	X	X	NP	NP
Alpizte	<i>Phalaris</i> spp.	Et/Met	Etanol	X	X	NP	NP
Alpizte	<i>Phalaris</i> spp.	Et/Met	Metanol	X	X	NP	NP
S. Mostaza negra	<i>Brassica</i> spp.	Et/Met	PBS	X	X	NP	NP
S. m. n.	<i>Brassica</i> spp.	Et/Met	Etanol	X	X	NP	NP
S. m. n.	<i>Brassica</i> SPP	Et/Met	Metanol	X	X	NP	NP
Limón colima	<i>Citrus</i> spp.	Etanol	PBS	32 mm YYY	28 mm YYY	42 mm YYY	36 mm YYY
Limón sin semilla	<i>Citrus</i> spp.	Etanol	PBS	X	X	Y	Y
Cáscara de n. a.	<i>Citrus</i> spp.	Etanol	PBS	16 mm YYY	16 mm / /	8 mm YYY	8 mm ///
Comino	<i>Cuminum</i> spp.	Et/Met	Etanol	X	X	NP	NP
Comino	<i>Cuminum</i> spp.	Et/Met	PBS	X	X	NP	NP
Semilla girasol	<i>Helianthus</i> spp.	Et/Met	Etanol	X	X	NP	NP
Semilla girasol	<i>Helianthus</i> SPP	Et/Met	PBS	X	X	NP	NP
Semilla girasol	<i>Helianthus</i> spp	Et/Met	Metanol	X	X	NP	NP

S : poca inhibición (0-5 mm).  
 VS : mediana inhibición (5-10 mm).  
 SSS : mucha inhibición (>10 mm).

X : No hubo inhibición.  
 NP : No probado.  
 mm : diámetro de halo de inhibición.

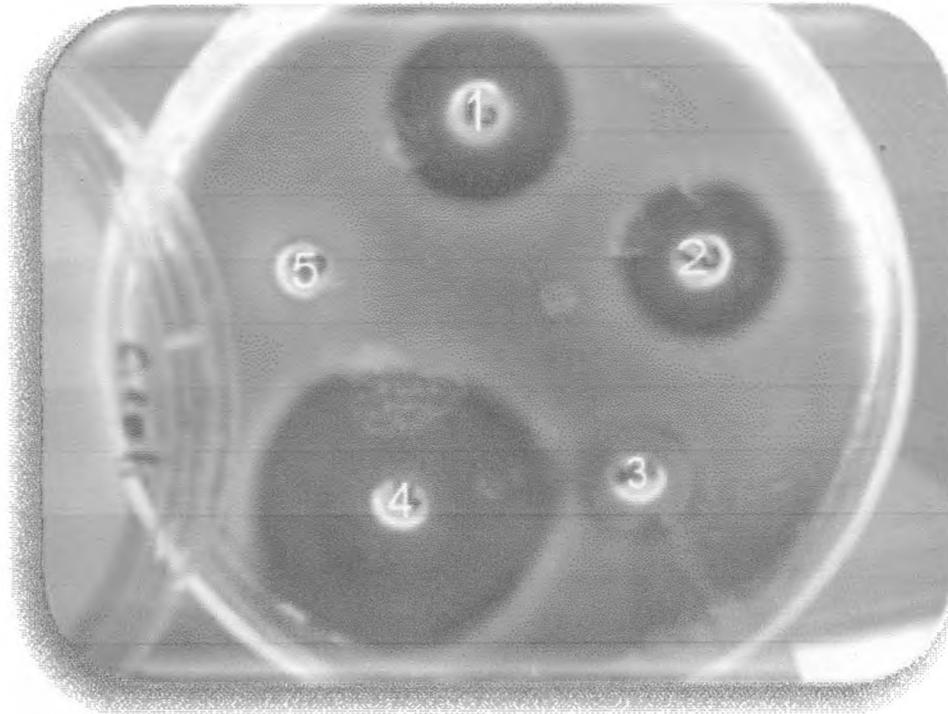


Figura 1. Ensayo preliminar por el método de difusión de pozo en agar con *Campylobacter coli* 19.

1: Cáscara de *Citrus aurantium* (Cáscara de naranja agria)

2: *Prunus* spp. (Ciruela),

3: *Prunus* spp. (Ciruela pasa),

4: *Citrus limón* (Limón colima),

5: Control (PBS).

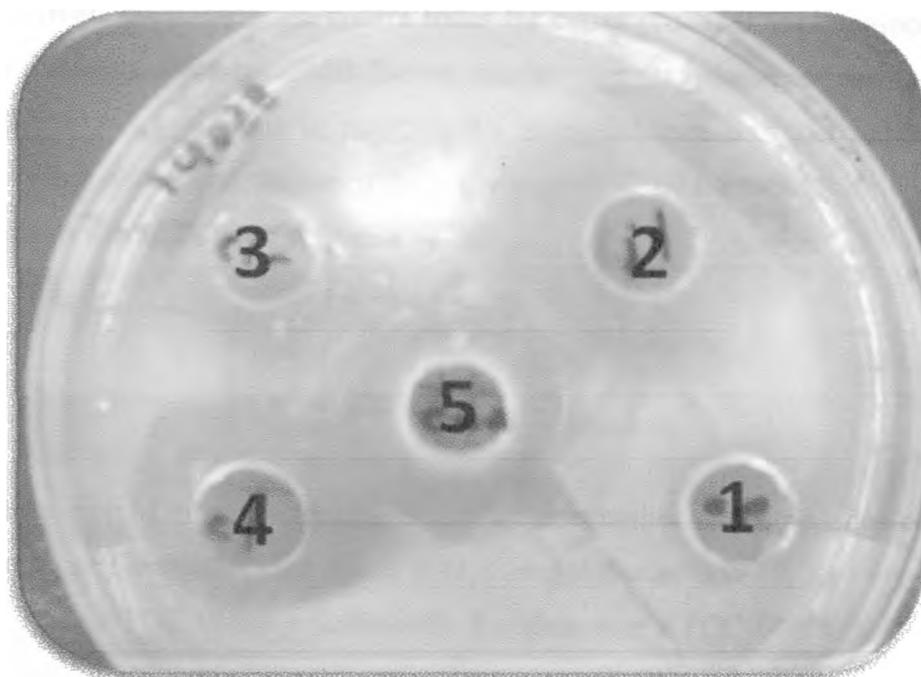


Figura 2. Resultados del ensayo preliminar con el método de difusión del extracto en pozo en agar con la cepa *Salmonella* Typhimurium 14028.

- 1: Control (PBS)
- 2: *Citrus limón* (Limón colima),
- 3: *Prunus* spp. (Ciruela pasa),
- 4: *Prunus* spp. (Ciruela),
- 5: Cáscara de *Citrus aurantium* (Naranja agria)

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

La CMB fue determinada sólo a tres extractos etanólicos seleccionados por mostrar la mayor actividad antimicrobiana contra todas las cepas probadas y obtuvimos que para las cepas de *Salmonella* las CMB fueron mucho más elevadas que para las cepas de *Campylobacter*, situándose en un rango de 8 a 36 mg/ml, mientras que para las cepas de *Campylobacter* obtuvimos un rango de 2 a 3 mg/ml; siendo las CMB de las cepas del mismo género similares entre sí (Tabla 8).

Tabla 8.

Concentración Mínima Bactericida de extractos etanólicos seleccionados contra el crecimiento de *Campylobacter jejuni* 5653, *Campylobacter coli* 19, *Salmonella* Typhi ATCC 19430 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

PLANTA	<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 19430	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> 5653	<i>Campylobacter</i> <i>coli</i> 19
Cáscara de naranja agria	34 ± 1.0* mg/ml	34 ± 1.0 mg/ml	2 ± 0.4 mg/ml	2 ± 0.5 mg/ml
Ciruela	33 ± 0.8 mg/ml	36 ± 0.8 mg/ml	2 ± 0.08 mg/ml	3 ± 0.6 mg/ml
Limón colima	8 ± 0.4 mg/ml	8 ± 0.5 mg/ml	2 ± 0.1 mg/ml	2 ± 0.1 mg/ml

\*Desviación estándar.

## 9.3. Combinaciones de extractos.

Se observó que las mezclas de Limón-Ciruela, Limón-Cáscara de naranja agria y Ciruela-Cáscara de naranja agria realizadas con concentraciones de 25, 50, 75 y 100 % de la CMB de cada extracto, no mostraron sinergismo alguno, situándose en el rango de indiferencia de acuerdo a los FTC obtenidos en promedio y que se situaron entre 1 y 1.5

para la cepa de *Salmonella* Typhi ATCC 19430; 1 y 1.75 para la cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; entre 0.75 y 1.75 para la cepa de *Campylobacter jejuni* 5653; y entre 0.75 y 1.5, para la cepa de *Campylobacter coli* 19.

Finalmente, al obtener todos los valores de cada una de las bacterias, se procedió a determinar el promedio de los FIC correspondientes para cada mezcla con cada una de las bacterias (Tabla 9). Por lo que para los ensayos posteriores se utilizaron las mezclas: Limón 100% (mg/ml), Limón 100%-Ciruela 100% (mg/ml), Limón 100%-Cáscara de naranja agria 100% (mg/ml), y una mezcla de los tres extractos Limón 100%-Ciruela 100%-Cáscara de naranja agria 100% (mg/ml); es decir, 100% equivale al 100% de las CMB obtenidas de cada extracto para *Salmonella* y para *Campylobacter*, respectivamente. Tomando como referencia las bajas CMB del limón, se le consideró como el extracto de mayor fuerza.

Tabla 9.

FIC obtenidos de las mezclas para cada cepa bacteriana.

INDICE DE CONCENTRACIÓN INHIBITORIA FRACCIONARIA (FIC)			
BACTERIA	Limón Ciruela	Limón Can	Ciruela Cna
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 19430	1.3 ± 0.2* (A)	1.2 ± 0.2 (A)	1.5 ± 0.3 (A)
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	1.4 ± 0.1 (A)	1.3 ± 0.2 (A)	1.7 ± 0.3 (A)
<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> 5653	1.1 ± 0.1 (A)	1.3 ± 0.3 (A)	1.0 ± 0.3 (A)
<i>Campylobacter</i> <i>coli</i> 19	1.3 ± 0.3 (A)	1.2 ± 0.3 (A)	1.3 ± 0.4 (A)

\* Desviación estándar.

(A). Rango de indiferencia ( $0.5 < \text{FIC} < 2$ ).

#### 9.4. Aplicación sobre el modelo alimenticio.

Los resultados obtenidos al probar las mezclas de los extractos al 100 % de la CMB encontrada contra la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028 en el modelo alimenticio tuvieron una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (Figura 3), ya que a las 48 h de incubación, el crecimiento bacteriano disminuyó a niveles indetectables (bajando de 3 a 5 logaritmos).

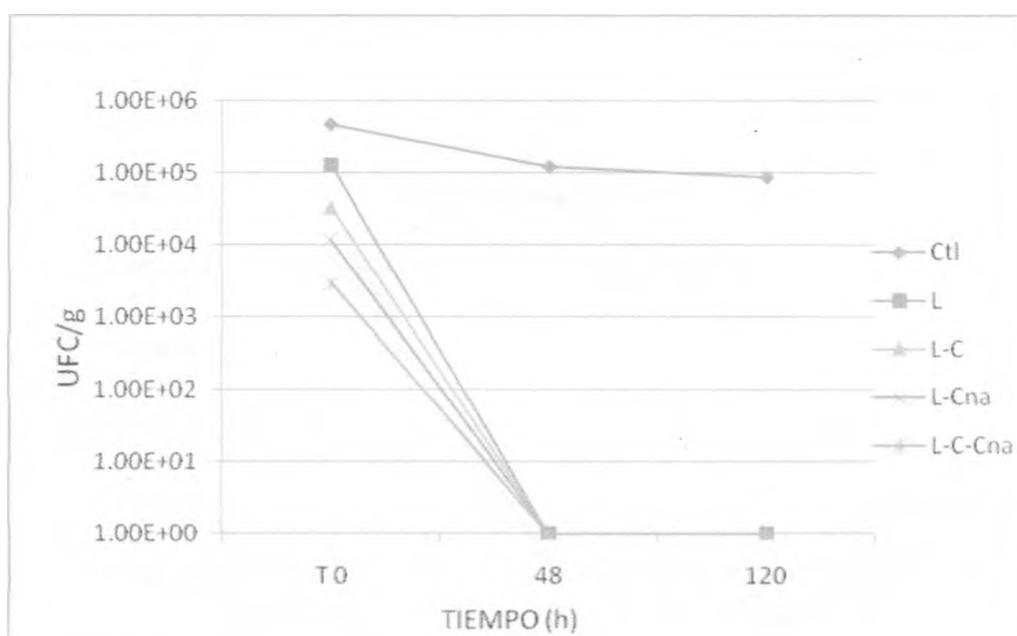


Figura 3. Efecto de las mezclas de los extractos contra *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 en el modelo alimenticio. Ctl: piel inoculada sin agregar extracto alguno. L: piel inoculada más el extracto de limón [100% de la CMB, es decir 8 mg/ml], L-C: piel inoculada más combinación de extracto de limón y extracto de ciruela [100% de la CMB, es decir 8 - 3 6 mg/ml], L-Cna: piel inoculada más combinación de extracto de limón y extracto de cáscara de naranja agria [100% de la CMB, es decir 8 - 3 4 mg/ml], L-C-Cna: piel inoculada más combinación de extracto de limón, extracto de ciruela y extracto de cáscara de naranja agria [100% de la CMB, es decir 8- 36 - 34 mg/ml]. Se observa que el control de bacterias se mantiene viable en 5 logaritmos durante las 120 horas de incubación, mientras que con los extractos probados, a las 48 h se reduce a niveles indetectables.

Las cuentas obtenidas al probar las mezclas de los extractos contra la mezcla de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* (se realizó un mezcla de cepas debido a que el género *Campylobacter* es la causa más importante de enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos contaminados con bacterias) en el modelo alimenticio mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control de piel inoculada solamente con la mezcla de las cepas de *Campylobacter* (Figura 4), ya que a las 48 h de incubación, el crecimiento bacteriano disminuyó a niveles indetectables (bajando 4 logaritmos).

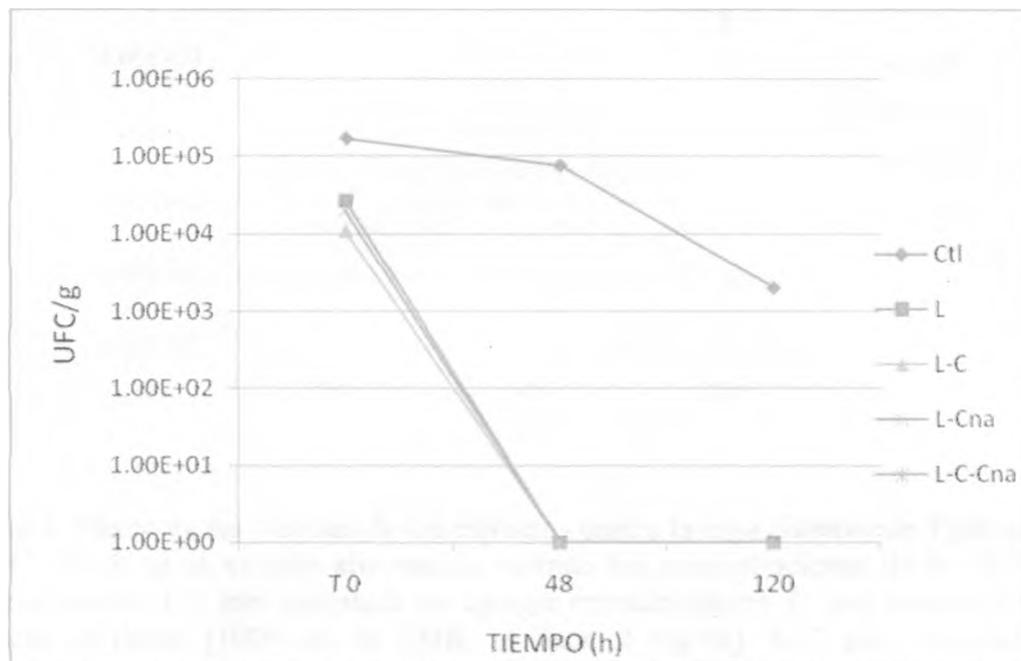


Figura 4. Efecto de las mezclas de los extractos contra la mezcla de las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en el modelo alimenticio. Ctl: piel inoculada sin agregar extracto alguno. L: piel inoculada más el extracto de limón [100% de la CMB, es decir 2 mg/ml]. L-C: piel inoculada más combinación de extracto de limón y extracto de ciruela [100% de la CMB, es decir 2-3 mg/ml], L-Cna: piel inoculada más combinación de extracto de limón y extracto de cáscara de naranja agria [100% de la CMB es decir 2-2 mg/ml], L-C-Cna: piel inoculada más combinación de extracto de limón, extracto de ciruela y extracto de cáscara de naranja agria [100% de la CMB, es decir 2 - 3 - 2 mg/ml]. Se observa que el control de bacterias se mantiene viable disminuyendo casi 2 logaritmos durante las 120 horas de incubación, mientras que con los extractos probados, a las 48 h se reduce a niveles indetectables.

Los resultados obtenidos al probar las mezclas de los extractos utilizando las concentraciones al 100% de las CMB de *Campylobacter*, contra *Salmonella* Typhimurium en el modelo alimenticio no tuvieron una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control de la muestra de piel inoculada solamente con la cepa de *Salmonella* (Figura 5).

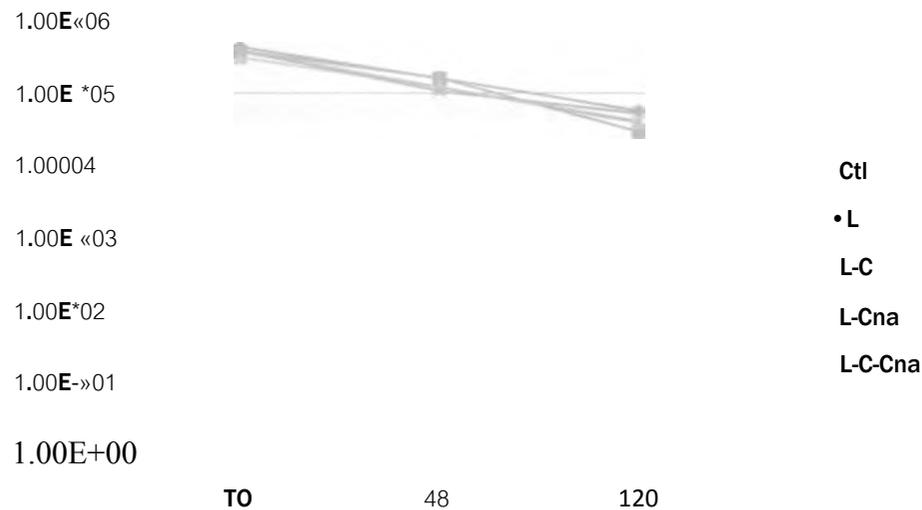


Figura 5. Efecto de las mezclas de los extractos contra la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 en el modelo alimenticio, usando las concentraciones de la CMB para *Campylobacter*. Ctl: piel inoculada sin agregar extracto alguno. L: piel inoculada más el extracto de limón [100% de la CMB, es decir 2 mg/ml], L-C: piel inoculada más combinación de extracto de limón y extracto de ciruela [100% de la CMB es decir 2-3 mg/ml], L-Cna: piel inoculada más combinación de extracto de limón y extracto de cáscara de naranja agria [100% de la CMB, es decir 2-2 mg/ml]. L-C-Cna: piel inoculada más combinación de extracto de limón, extracto de ciruela y extracto de cáscara de naranja agria [100% de la CMB, es decir 2 - 2 - 3 mg/ml]. Se observa que el control de bacterias se mantiene durante las 120 horas de incubación, al igual que para las concentraciones probadas de los extractos.

## 9.5. Análisis sensorial.

Para realizar el análisis sensorial se utilizaron las concentraciones de las CMB que se utilizaron con la cepa de *Campylobacter*, ya que las concentraciones de las CMB de *Salmonella* eran sumamente altas. Para que éste fuera más sencillo, comprensible y práctico para los evaluadores, se realizó un formato con instrucciones breves para que todo pudiera ser evaluado en una sola cuartilla (Figura 7), lo cual a su vez recae en una prueba menos exhaustiva para el panel.

De acuerdo a la prueba de preferencia llevada a cabo en el análisis sensorial, los resultados reflejaron que la mezcla de Limón-Ciruella no mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto al control, indicando así el agrado del panel hacia dicha mezcla; mientras que las mezclas de Limón, Limón-Cáscara de naranja agria y Limón-Ciruella-Cáscara de naranja agria sí tuvieron una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto al control. Esto se traduce en que la mezcla de Limón-Ciruella no afectó de manera negativa las propiedades organolépticas del pollo (específicamente el sabor), mientras que el resto de las muestras sí tenían un impacto sobre el sabor original del pollo.

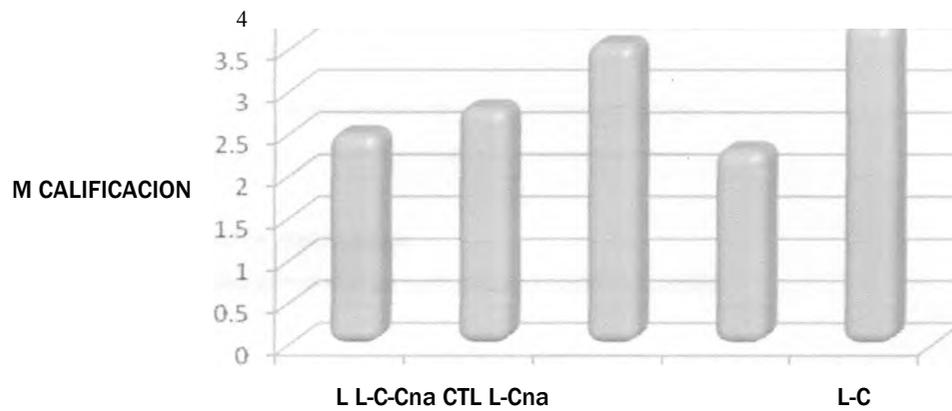


Figura 6. Preferencia de las muestras de alitas de pollo con la combinación de los extractos probados. La mezcla de Limón-Ciruela no mostró una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control; lo cual refleja el agrado por dicha muestra. Las concentraciones fueron seleccionadas de acuerdo a la CMB establecida *in vitro*, siendo ésta la misma que en piel, para *Campylobacter*, ya las concentraciones establecidas para *Salmonella* eran demasiado elevadas. Ctl: alitas sin agregar extracto alguno. L: alitas más el extracto de limón. L-C: alitas más combinación de extracto de limón con extracto de ciruela. L-Cna. alitas más combinación de extracto de limón con extracto de cáscara de naranja agria. L-C-Cna. alitas más combinación de extracto de limón con extracto de ciruela y extracto de cáscara de naranja agria. Asignando la preferencia en orden ascendente, es decir. 1 para la muestra de menor preferencia y 5 para la de mayor preferencia

(VAUAOÓN SCXSCRUU. CX 1UUJ ex j>OUQ

'toa

\*:00 <x MUESTRA

rA»Acrb»istr\*c» ESTUDIADA ;:;V»ASA; ;»■' «j\*!=?;\*< \* Oí S\*fíSg

ultuucciotlts

ANCrj ti. ;CO< 4C Oí CACA V,ES\*A Of ACUHOO \*. OBOEN Of-AS @OSt<3@NeS

-AS 'Aut'SUI 3t ióvtSOA \* DERECHA T ANCTE ti iSAOO Oí isí'iMW: ».

ÍS\*t«\* SO SECOOS ;\*;<?\*\* CASA U.esrM r SESA JH »CCO se AS—A »ASA

E-ii-'w-«S»-EÁAfc3rE vA SO CA.

UOtU EN \*L SECUAOAC QUC sí tECUtNOtt Ot5A.O CX CASA MUEST#A ÍN O\*00-

uaiotwt o< ASAAOC \*:\* AARA te Oí «jset ASAAQO HASTA -J\* SAAA ts. se

VAIO» ASÍAOO

4. »CÍOÍ CBOENA» WMILUWINTI-AS MUESTRAS IN UN O°C<TI »A0 VISEONA- • CÍSBUES  
ÍEC«X>\*A\* A-A»08AB NUÍVAVE.V7t -AS MUESTRAS DE VAVEAA VAS CÍAOAOOSA
5. SI SOS MUESTRAS -E BASE CE «t SUAüES OE00A CUAS. -i -ÍVS\*A VAS \*ASA OVE  
At«A4ANL.rcA JN ottael\* Oia I Al. S

CÓDIGO:	437	322	893	122	780
ORDEN:	<input type="checkbox"/>				
COMENTARIOS:	<hr/> <hr/> <hr/>				

MUCHAS GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN!!!

Figura 7. Formato empleado para realizar la prueba de preferencia sensorial de alitas de pollo. Se muestra la asignación de códigos a cada muestra y recuadros para dar un orden del 1 al 5, siendo el 1 la muestra de menor preferencia y el 5 la muestra de mayor preferencia.

### 9.6. Determinación de grupos funcionales en los extractos.

Se encontraron diferentes grupos químicos en los extractos vegetales analizados. Se determinó que *Citrus limón* (Limón) presenta hidrocarburos insaturados, saponinas, carbohidratos, alcaloides, p-benzoquinonas y taninos. En el extracto de *Prunus* spp. (Ciruela), se encontraron hidrocarburos insaturados, saponinas, carbohidratos, alcaloides, p-benzoquinonas y taninos. Para el extracto de cáscara de *Citrus aurantium* (cáscara de naranja agria) se encontró que posee hidrocarburos insaturados, saponinas, flavonoides, carbohidratos, alcaloides, coumarinas y taninos (Tabla 10).

Tabla 10.

Compuestos funcionales presentes en los extractos vegetales analizados y sus mezclas.

PRUEBA	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Prunus</i> spp.	<i>Citrus limón</i>	<i>P-Ca-Cl</i>
Hidrocarburos insaturados	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+
Flavonoides	+	.	.	-i-
Sesquiterpenlactonas	-	.	.	.
Carbohidratos	+	+	+	+
Alcaloides	+	+	+	+
Coumarinas	+	.	.	+
Aldehidos y cetonas	-	-	-	-
p- benzoquinonas	-	+	+	+
Cloruros	-	.	.	.
Taninos	+	+	+	+

+ : Positivo

- . Negativo

*P*: *Prunus* spp.

*Ca*: *Citrus aurantium*

*CP*: *Citrus limón*



Figura 8. Placa de porcelana mostrando las reacciones para determinar los compuestos funcionales de *Citrus aurantium*.

## DISCUSIÓN:

Las plantas han sido utilizadas como conservadores en base a los compuestos que presentan actividad antimicrobiana. La susceptibilidad de un microorganismo a un extracto de planta depende, primero, de las propiedades del extracto y del microorganismo en sí. Es bien sabido que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a los extractos de plantas y que las bacterias Gram negativas son más resistentes; sin embargo, esto no es solamente con las plantas sino en general (Kalemba and Kunicka; 2003).

En este trabajo encontramos que los extractos de *Citrus limón* (limón), *Prunus domestica* (ciruela) y cáscara de *Citrus aurantium* (naranja agria) fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Salmonella* Typhi ATCC 19430, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Campylobacter jejuni* 5653 y *Campylobacter coli* 19; la actividad antimicrobiana de la cáscara de cítricos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* había sido previamente reportada por Johann *et al*, 2007; mientras que la actividad antimicrobiana de la ciruela fue reportada contra *Leishmania* (L.) *amazonensis* y *Trypanosoma cruzi*, por Luize *et al*, 2005.

Se obtuvo una CMB con el extracto etanólico de *Citrus limón* (limón) de 8 mg/mL para ambas cepas de *Salmonella*; a su vez, la CMB con esta fruta fue de 2 mg/mL para ambas cepas de *Campylobacter*; confirmando así su actividad antimicrobiana tal como lo habían reportado Conte *et al*. (2006), al probar el extracto contra *Bacillus licheniformes*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia subpelliculosa*. Por otra parte, la CMB de *Prunus* spp. fue de 33 mg/mL para *Salmonella* Typhi ATCC 19430 y de 36 mg/mL para *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; mientras que para *Campylobacter jejuni* 5653 fue de 2 mg/mL y de 3 mg/mL para *Campylobacter coli* 19; reafirmando así el efecto antimicrobiano presentado por Luize *et al*, 2005.

La CMB con el extracto de cáscara de *Citrus aurantium* (cáscara de naranja agria) fue de 34 mg/mL para ambas cepas de *Salmonella*, mientras que para ambas cepas de *Campylobacter* la CMB obtenida fue de 2 mg/mL. Lo cual concuerda con la actividad antimicrobiana en cáscaras de cítricos que reportaron Johann *et al*, 2007; difiriendo, sin embargo, en los valores reportados debido a que realizaron purificación de compuestos, siendo éstos los utilizados a partir de dichas cáscaras.

Para establecer la utilidad de los antimicrobianos naturales, deben ser evaluados solos o en combinación, para tomar en cuenta otros factores de preservación y así determinar si presentan o no un efecto sinérgico. Por ello, se evalúa el efecto de los extractos y sus mezclas sobre el crecimiento de diferentes microorganismos (López-Malo *et al*, 1998). Una de las razones principales para buscar un sinergismo, es que en muchas ocasiones para lograr obtener una actividad bactericida, se requiere la combinación de dos o más compuestos, ya que un agente antimicrobiano aunque no sea muy efectivo puede potenciar el efecto del agente con el que se está combinando (Kiri *et al*, 2000).

En nuestro diseño se optó tomar como referencia el extracto de *Citrus limón* (limón) debido a que fue el que mostró *el* mayor potencial, tal como Venegas (2007) reportó que utilizó como base el palo de Brasil como extracto de mayor potencia, al realizar su investigación con extractos de palo de Brasil, huizache, mezquite y ébano.

Ai hacer las combinaciones de los extractos, se obtuvieron los valores de los FIC, para conocer si existía sinergismo, indiferencia o antagonismo entre los extractos seleccionados de acuerdo a los conceptos y fórmulas descritas por Hall *et al* (1983); y aplicadas a su vez por Orhan *et al* (2005). Todos los datos de los FIC obtenidos se situaron en promedio en un rango entre 1.1 y 1.7 correspondiendo a los dentro de los límites de la indiferencia. A pesar de que no hubo un sinergismo, al haber una indiferencia entre sí, los extractos pueden estar mezclados sin afectarse el uno al otro.

*Como modelo alimenticio se utilizó piel de pollo, ya que la mayor parte de la contaminación de canales de pollo se encuentra en su superficie, por lo cual los estudios*



para determinar la efectividad de diversos tratamientos se realizó directamente sobre la piel, tal como reportaron Hwang y Beuchat en 1995. En este trabajo inoculamos la piel de pollo que se expuso a los extractos y posteriormente se incubaron a 4 °C para simular las condiciones normales de refrigeración a las que se puede encontrar el pollo comercialmente Del Río *et al* (2007). Encontramos que el inóculo de bacterias no se vio afectado en sí por la refrigeración, sino que éste se afectó por la interacción entre el patógeno y los extractos.

Los resultados obtenidos con el control que contenía el inóculo más el fosfato trisódico (TSP) fueron “excepcionales” ya que no presentaron crecimiento alguno para ninguna de las cepas inoculadas. El TSP posee un efecto superior comparado con otros fosfatos; y debido a que su pH es de 12-13, esta alta alcalinidad aparentemente remueve la película de grasa y las bacterias, alterando las moléculas de grasa de la membrana celular provocando que las bacterias drenen su líquido intracelular (Oyarzabal, 2006).

Aquí se debe aclarar un punto muy importante; de acuerdo a lo demostrado por Capita *et al* (2003), el TSP es mucho más efectivo al probarse en modelos de piel cortada en trozos que en piezas completas de pollo debido a que las arrugas y las irregularidades de la piel de un pollo completo pueden darle una protección total o parcial a las bacterias y así hacer más difícil su remoción.

En este estudio utilizamos también un control que estaba inoculado únicamente con la cepa a probar, ya que para poder verificar si existe o no una disminución logarítmica de bacterias se tuvo que tener un control en el que a la bacteria no se le estuviera aplicando ningún tratamiento, tal como lo reportaron Del Río *et al* (2007). Al probar todas las mezclas de los extractos contra la cepa de *Salmonella* en el modelo alimenticio se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); es decir, los resultados mostraron que los tratamientos eran efectivos para inhibir el crecimiento de *Salmonella*, por lo que podemos afirmar que todos los tratamientos aplicados, a excepción de el tratamiento aplicado a *Salmonella* con las concentraciones de las CMB para *Campylobacter*, fueron efectivos.

En lo que respecta a las mezclas de los extractos aplicadas contra la mezcla de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en el modelo alimenticio se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); es decir, los resultados mostraron que los tratamientos probados inhibieron el crecimiento de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. De acuerdo a lo reportado por Meldrum y Wilson (2007), se debe hacer un hincapié en que para *Campylobacter* se realizó una mezcla de cepas debido a que se ha encontrado que las medidas de prevención han logrado disminuir las cargas de *Salmonella* de las canales de pollo, mientras que han fallado para disminuir las cargas de *Campylobacter*, indicando así que *Campylobacter* representa actualmente el principal problema en pollo crudo.

En cuanto a las mezclas de los extractos contra la cepa de *Salmonella* en las que se utilizaron las concentraciones de las CMB de *Campylobacter* no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); es decir, estos tratamientos no mostraron ser efectivos para inhibir el crecimiento de *Salmonella*. Sin embargo, estos resultados eran de esperarse ya que a altas dosis de inóculo estas concentraciones de extracto no son efectivas para *Salmonella in vitro* y en modelo alimenticio.

Se debe aclarar que se manejaron altas dosis de inóculo, ya que todos los estudios de esta tesis se realizaron con concentraciones de inóculo bacteriano de  $1 \times 10^8$  UFC/ml, esto se realizó para simular el peor de los escenarios y también porque para evitar la interferencia de la flora acompañante se requieren altas dosis de inóculo. Además de la cantidad de inóculo, intervienen factores como, previamente se mencionaba, tipo de tratamiento, días de almacenaje en refrigeración y tipo de cepas (Del Río *et al*, 2007).

Respecto a que los resultados reflejaron que no hubo incremento en la CMB al utilizarse en el modelo alimenticio, esto puede compararse con los estudios realizados por Kişla (2007); quien en vez de utilizar extractos, simplemente usaron jugo de limón en mejillones rellenos, obteniendo así reducciones de la carga de *Salmonella* Typhimurium.

En lo que respecta a las mezclas de los extractos aplicadas contra la mezcla de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en el modelo alimenticio se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); es decir, los resultados mostraron que los tratamientos probados inhibieron el crecimiento de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. De acuerdo a lo reportado por Meldrum y Wilson (2007), se debe hacer un hincapié en que para *Campylobacter* se realizó una mezcla de cepas debido a que se ha encontrado que las medidas de prevención han logrado disminuir las cargas de *Salmonella* de las canales de pollo, mientras que han fallado para disminuir las cargas de *Campylobacter*, indicando así que *Campylobacter* representa actualmente el principal problema en pollo crudo.

En cuanto a las mezclas de los extractos contra la cepa de *Salmonella* en las que se utilizaron las concentraciones de las CMB de *Campylobacter* no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); es decir, estos tratamientos no mostraron ser efectivos para inhibir el crecimiento de *Salmonella*. Sin embargo, estos resultados eran de esperarse ya que a altas dosis de inóculo estas concentraciones de extracto no son efectivas para *Salmonella in vitro* y en modelo alimenticio.

Se debe aclarar que se manejaron altas dosis de inóculo, ya que todos los estudios de esta tesis se realizaron con concentraciones de inóculo bacteriano de  $1 \times 10^8$  UFC/ml, esto se realizó para simular el peor de los escenarios y también porque para evitar la interferencia de la flora acompañante se requieren altas dosis de inóculo. Además de la cantidad de inóculo, intervienen factores como, previamente se mencionaba, tipo de tratamiento, días de almacenaje en refrigeración y tipo de cepas (Del Río *et al*, 2007).

Respecto a que los resultados reflejaron que no hubo incremento en la CMB al utilizarse en el modelo alimenticio, esto puede compararse con los estudios realizados por Kişla (2007); quien en vez de utilizar extractos, simplemente usaron jugo de limón en mejillones rellenos, obteniendo así reducciones de la carga de *Salmonella* Typhimurium

Respecto a los resultados concernientes al análisis sensorial, se llevó a cabo una prueba de preferencia en la que se compararon las mismas mezclas utilizadas para el modelo alimenticio; en la cual la mezcla de *Citrus limón* (limón) con *Prunus domestica* (ciruela) no tuvo una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto al control (pieza de pollo sin tratamiento alguno), lo cual reflejó que el sabor de esa mezcla era igualmente agradable que el control. Esto mostró una comparación positiva con respecto a la prueba sensorial de preferencia en alas de pollo que reportaron Rodríguez *et al* en 1996; en la cual hicieron pruebas de preferencia, pero en dicho caso se encontró una mayor preferencia por el control.

El propósito de realizar un análisis sensorial radica en que si al realizar un estudio de actividad antimicrobiana de extractos de plantas estos son muy efectivos, no necesariamente pueden ser utilizados efectivamente como conservadores naturales. Para poder darle una aplicación industrial, los extractos que se piensen utilizar como conservadores tienen que ser del agrado del público.

Además de eso, como reportó Kişla (2007), los consumidores hoy en día, solicitan productos alimenticios más frescos, más naturales, más “sabrosos” y libres de conservadores sintéticos, además de que a su vez puedan mantener una seguridad microbiológica. Por ello, este tipo de estudios deben resultar en opciones sencillas, prácticas y naturales para la seguridad de los alimentos.

Las plantas poseen una habilidad ilimitada para sintetizar compuestos, entre ellos se encuentran los metabolitos secundarios. Los compuestos químicos encontrados en los extractos en los extractos estudiados fueron en su mayoría: carbohidratos, saponinas, hidrocarburos insaturados, alcaloides, p-benzoquinonas, flavonoides y taninos; y todos ellos poseen propiedades diferentes. De acuerdo a Stem (1996), los blancos probables de las quinonas en la célula microbiana son las adhesinas expuestas a superficie, los polipéptidos de la pared celular y las enzimas unidas a la membrana.

Los flavonoides, de acuerdo a lo descrito por Cushnie y Lamb (2005), han demostrado actividad antimicrobiana y se cree que ésta se debe a la interacción de los flavonoides con la inhibición de las enzimas, esta interacción puede ser con diversas partes del flavonoide, como el carbohidrato, el anillo fenilo o el anillo de benzopirona. Respecto a los taninos, su poder antimicrobiano se puede deber a su habilidad para inactivar adhesinas microbianas, enzimas y proteínas de transporte (Cowan, 1999).

En resumen, se puede demostrar la necesidad e importancia de realizar investigación en el área de productos naturales extraídos de plantas con el firme propósito de poder darle una aplicación en la industria alimentaria al ser utilizados como conservadores de alimentos.

Finalmente se puede afirmar que se acepta la hipótesis planteada en este proyecto ya que se demostró que los extractos de plantas seleccionados y sus mezclas son capaces de inhibir el crecimiento de *Salmonella* y *Campylobacter in vitro* y en un modelo alimenticio; además de que una de las fórmulas propuestas fue organolépticamente aceptable para su uso posterior como conservador en pollo.

## CONCLUSIONES

De 54 extractos probados, tres resultaron ser efectivos para inhibir el crecimiento de *Salmonella* y *Campylobacter in vi tro*.

Las cepas de *Campylobacter* mostraron una susceptibilidad mucho mayor que las cepas de *Salmonella* con los extractos probados de limón, cáscara de naranja agria y ciruela.

No se presentó sinergismo entre las mezclas realizadas con los extractos, sin embargo, de igual modo tampoco se obtuvo un antagonismo, lo cual indica que los extractos pueden coexistir en una mezcla sin afectarse de manera negativa.

Los extractos seleccionados son efectivos tanto para *Salmonella* como para *Campylobacter* en el modelo alimenticio a las mismas concentraciones requeridas *in vitro*, la CMB no se incrementó al momento de aplicar los extractos en el modelo alimenticio.

Las CMB de *Campylobacter* no son efectivas para inhibir el crecimiento de *Salmonella* a un inóculo de  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

Se encontraron diversos tipos de grupos funcionales en los extractos analizados.

La mezcla de extracto de limón con extracto de ciruela para el análisis organoléptico fue del agrado de los catadores.

**LITERATURA CITADA:**

Adkins J.N, Mottaz H.M, Norbeck A D, Gustin J.K, Rué J, Clauss T R W, Purvine S O, Rodland K.D. 2006. Analysis of the Salmonella Typhimurium proteome through environmental response toward infectious conditions. *Molec. Cell. Proteom.* 5: 1450-1461.

Afeltra J, Vítale R.G, Mouton J.W, Verweij P E. 2004. Potent synergistic in vitro interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. *Antimic. Ag. Chemother.* 48(4): 1335-1343.

Alarcón G. 2000. Análisis de la actividad antimicrobiana de 48 plantas medicinales o comestibles contra bacterias de importancia en alimentos. Tesis (Licenciatura) FCB, UANL.

Alarcón G. 2002. Actividad de extractos de plantas en el crecimiento, la producción de toxina y la unión de *Vibrio cholerae*. [Tesis de maestría] Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Albado E, Saez G, Ataucusi G. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano), [internet] *Rev Med Her.* Disponible en el sitio: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2001000100004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2001000100004&lng=es&nrm=iso) [Revisado el 15 de octubre 2006],

Arcila LCC, Loarca PG., Lecona US, González ME, 2004 El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. ALAN, [internet]. Disponible en el sitio: [http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222004000100015&lng=pt&nrm=iso](http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015&lng=pt&nrm=iso) [Revisado el 15 de octubre 2006],

Arrit F.M, Eifert J.D, Pierson M.D, Sumner S.S. 2002. Efficacy of antimicrobials against *Campylobacter jejuni* on chicken breast skin. *J. Appl. Poult. Res.* 11: 358-366.

Arsenault J, Letellier A, Quessy S, Boulianne M. 2007. Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. Carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. *J. Food Prot.* 70(8): 1820-1828.

Astiasarán I, Martínez J A. 2003. Alimentos, composición y propiedades. McGraw Hill (eds). México D.F, pp. 15-16.

Barriere S.L, Ely E, Kapusnik J.E, Gambertoglio J.G. 1985. Analysis for a new method for assessing activity of combinations of antimicrobials. area under the bactericidal activity curve. *J. Antimic. Chemother.* 16: 49-59.

Betoni J.E.C, Mantovani R.P, Barbosa L.N, Di Stasi L.C, Fernandez J A. 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101(4): 387-390.

Beuchat R.L. 1985. Efficacy of media and methods for detecting and enumerating *Campylobacter jejuni* in refrigerated chicken meat. *App. Environ. Microbiol.* 50(4): 934-939.

Beuchat R.L. 1987. Efficacy of some methods and media for detecting and enumerating *Campylobacter jejuni* in frozen chicken meat. *J. App. Bacter.* 62: 217-221.

Birk T, Rosenquist H, Bronsted L, Ingmer H, Bysted A, Christensen B B. 2006. A comparative study of two food model systems to test the survival of *Campylobacter jejuni* at -18 °C. *J. Food Prot.* 69(11): 2635-2639.

Blanco A.C, Esquivel S, Gianelli R, Acosta M, Aruj A, Moreno R.P. 2007. Sepsis por *Campylobacter coli* en un huésped inmunocompetente. *Arch. Argent. Pediatr.* 105(3): 247-250.

Buck G E, Kelly M.T. 1982. Susceptibility testing of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, using broth microdilution panels. *Antimic. Ag. Chemother.* 21(2). 274-277.

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

Byrd JA, Hargis BM, Caldwell DJ, Bailey RH, Herró KL, McReynolds JL, Brewer RL, Anderson RC, Bischoff KM, Callaway TR, Kubena LF. 2001. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. *Poultry Sci* 80: 278-283.

Calva E, 2001. *Salmonella Typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Tesis [Maestría en Ciencias] Instituto de Biotecnología, UNAM.

Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. 2005. Synergistic activities of fluconazole and voriconazole with terbinafine against four *Candida* species determined by checkerboard, time kill, and E test methods. *Antimic. Ag. Chemother.* 49(4): 1593-1596.

Capita R, Alonso-Calleja C, Prieto M, García-Fernández M.C, Moreno B. 2003. Effectiveness of trisodium phosphate against *Listeria monocytogenes* on excised and non-excised chicken skin. *J. Food Prot.* 66(1): 61-64.

Capita R, Alonso-Calleja C, García-Fernández M.C, Moreno B. 2002. Review: Trisodium phosphate (TSP) treatment for decontamination of poultry. *Food Sci. Tech. Int.* 8(1): 11-24.

Castillo SL, García S, Heredia N. 2006. Productos naturales como inhibidores del crecimiento de *Campylobacter jejuni* y *C. coli*. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria. Monterrey, Nuevo León. 9-11 de Octubre de 2006.

Chávez-de la Peña M E, Higuera I.A.L, Huertas J.M.A, Báez M R, Morales L.J, Arteaga C.F, Rangel F M.S, Ponce de León R.S. 2001. Brote por *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. *Salud Pub. Méx.* 43(3): 211-216.