



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo



Aplicación de métodos combinados
(ácido gálico, luz ultravioleta y/o ultrasonido) para la
inactivación de *Salmonella Typhimurium* en
soluciones acuosas.

Protocolo de TESIS

Para obtener el título de licenciada en
Químico farmacobiólogo.

PRESENTA:

p.Q.F.B. Evelyn Fernández Hernández

Director de tesis:

D.C. Carlos Enrique Ochoa Velasco

Codirector de tesis:

D.C. Irving Israel Ruiz López

Ciudad Universitaria, PUEBLA, 2024



OFICIO C.Q./CT 069P/2023

**C. Evelyn Fernández Hernández
PRESENTE**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo, le comunico que su anteproyecto de Tesis denominado:

“Aplicación de métodos combinados (ácido gálico, luz ultravioleta y/o ultrasonido) para la inactivación de Salmonella Typhimurium en soluciones acuosas”

ha sido autorizado, siendo:

**Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco, Director Interno de Tesis
Dr. Irving Israel Ruiz López, Co-Director de Tesis**

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales que tenga lugar.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., 31 de octubre de 2023

**Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas**



c.c.p. Archivo

Cadena digital: 5Sg,Ha,Ok+Yo,Qa,Ni#Rk,Qy(Bu#CbIxpSag.Rb%Fi'Xr,Ao.Mj*NrIQe*Rr(ZfIzn)Gj%Bx+Li/Zv,Ds)Nf&Nn%Ve-
Ml"Vl/Pm+Du-Vs\$Vm(Am,Tc.Ec%Vy/Hx%5z"Gf-
Mk.EI+La%Km*Xp(Pu&Hg&Cx/Xe/MkIXe(Gd'Ne.Za.Nx%Gj*Rt&Mg\$Zt&Fq!Od'Dm%Gf\$Vv+Fl%Rw#Ac+Ga/Lq/Bn,Zu#Vx(RI%At&
Gc&Ez'Dt*Gs+li.Iy-Gu\$Hv'Wy/If-BI%Gq'Lz!Bi-Ae+

Facultad
de Ciencias
Químicas


San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext. 7390



OFICIO C.Q./CT 055CR/2023

Dra. Paola Hernández Carranza 

Dra. Mariana Aguirre García 

Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez 

Con toda atención comunico a Ustedes que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora del trabajo de Tesis que presenta la pasante de la Licenciatura en Química Farmacobiólogo

Evelyn Fernández Hernández

cuyo título es:

"Aplicación de métodos combinados (ácido gálico, luz ultravioleta y/o ultrasonido) para la inactivación de Salmonella Typhimurium en soluciones acuosas"

Asimismo, les solicitamos que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., 13 de noviembre de 2023



Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena Digital: 3Hp-LI"lo)TF'Ci,Pz*Kh&Ht-Uq*Yt*Vq+Ko,lo*Op+Rr'Ww#BF]Ye+Mx[Rd,Xz/Kz.Pi&Ju*Bw\$Hh%Tc+Xw)Dl%Xk'Tm,Gz\$Ua/Ww*Jr&Jq*Lo-Hr%Wu\$Ld-Hx*Nt,Cu&Qj-Uo!Br-Wu)Lw/Zk-Sc.Yg*Ew-Jj(Lv%Wx&Gh*Yy/Px!Il%Py&Em-Lo+Fz-Gu&Gt%Rk\$Y\$Bc-Qb.Np+Gj&Nz%Hj,Up-lz*Xj)ic)Kh&Np*Vp.Bq*Le*Bc!Dx*Hg.Nh.Oj"Ok.Hf'Vr!F]-Xs%

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390



OFICIO C.Q./CT 057A/2023

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis de la alumna de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Evelyn Fernández Hernández

comunican a Usted la autorización para la publicación del trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco y del Dr. Irving Israel Ruiz López, con el siguiente título:

“Aplicación de métodos combinados (ácido gálico, luz ultravioleta y/o ultrasonido) para la inactivación de Salmonella Typhimurium en soluciones acuosas”

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 5 de diciembre de 2023.

Atentamente
“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., a 5 de diciembre de 2023

Dra. Paola Hernández Carranza, Presidente

Dra. Mariana Aguirre García, Secretario

Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez, Vocal

c.c.p. Archivo

Cadena digital: 4Sk,Hb/Wf&Tb+Cr#Lw+Fm,Gm+Dh/Gw%Lu#Hd"An!Ug,Wy,Si"Ln\$Rz'Cl/Ew%Rd%Ql(BLJs-Ye{P!#Rq"Xm"Dot&Ma\$Wx\$Ts*Wn*Bw%Gj)Sb%Kr!Iv)Up!HI*Hi/Ku&Jk-Zt"Im-Mk,Gy-Fv%Kt*Qe"Oc(Ka!Nf\$Co.Cz!Bt)Ys!Ex/Xi#Rk&Sn*Fr/Fu-Mw,Pr\$Ap%Mt/Bw{Mq}La\$Hh*Bo%Vp{Ab,Rz,Hu'Rj{Ow+Ta"Cj}Wl(Ts-Ux\$Tk#Wh)Ok,Sv+Ma"Kn)Dv,Sv*Pm"

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390

INDICE

1. Introducción	9
2. Marco teórico	10
2.1 <i>Salmonella</i>	10
2.1.1. Generalidades de <i>Salmonella</i>	10
2.1.2. Panorama nacional de salmonelosis	10
2.1.3. Riesgo sanitario	12
2.2 Métodos combinados para la conservación de alimentos	12
2.2.1. Métodos combinados.	12
2.2.2. Aplicación de los métodos combinados	13
2.3 Luz ultravioleta	13
2.3.1. Luz ultravioleta de onda corta	13
2.3.2. Fundamento de su aplicación	14
2.4 Ultrasonido	15
2.4.1. Principio del método	15
2.5 Ácidos fenólicos	18
2.5.1. Compuestos fenólicos	18
2.5.2. Estructura y características del ácido gálico	18
2.5.3. Aplicaciones biológicas	18
2.5.4. Comparativa de ácidos fenólicos	19
2.5.5. Ácido gálico como método combinado con luz UV.	19
3. Justificación	21
4. Objetivos	22
4.1. General	22
4.2. Específicos	22
5. Diagrama de trabajo	23
6. Metodología	26
6.1 Preparación de ácido gálico	26
6.2 Reactivación microbiana	26
6.3 Irradiación de Ácido gálico con luz UV-C:	26
6.4 Procedimiento del ácido gálico	26
6.5 Procedimiento de ultrasonido:	26
6.6 Procedimiento con Luz UV	27

6.7 Análisis microbiológico	27
6.7.1 Recuento de células viables	27
7. Resultados y discusión de resultados.	28
7.1 Evaluación del tiempo de contacto en la inactivación de <i>Salmonella Typhimurium</i> con ácido gálico	28
7.2 Efecto de las concentraciones de ácido gálico sobre la inactivación de <i>Salmonella Typhimurium</i> .	29
7.3 Cinética de inactivación de <i>Salmonella Typhimurium</i> mediante ácido gálico irradiado y sin irradiar.	30
8. Conclusiones	39
9. Recomendaciones	39
10. Referencias	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución estatal de análisis para la detección de Salmonelosis en tejidos cárnicos, productos y subproductos acuícolas y pesqueros (2018-2020) CENAPA. Tomada de: SENASICA, 2021.....	11
Figura 2. Distribución estatal de casos de infección por <i>Salmonella</i> en personas. Tomada de: SENASICA, 2021	11
Figura 3. Espectro electromagnético. Tomada de: Domínguez & Parzanese, 2012.....	14
Figura 4. Dimerización de timina en microorganismos irradiados con luz UV. Tomado de: Martín, 2019.....	15
Figura 5. Representación gráfica de la burbuja de cavitación colapsando y liberando material vegetal en tres pasos. (A) Representación de burbuja y célula vegetal, (B) Ruptura de la pared celular y colapso de la burbuja, finalmente (C) Difusión del solvente a través de la ruptura celular y liberación de los compuestos. Tomada de: Medina-Torrez,2017.	17
Figura 6. Estructura 2D del ácido gálico. Tomada de: Químicafacil.net, 2020.....	18
Figura 7. Esquemmatización del trabajo.....	23
Figura 8. Cinética de muerte de <i>Salmonella Typhimurium</i> por efecto del ácido gálico vs tiempo de exposición.	29
Figura 9. Cinética de muerte de <i>Salmonella Typhimurium</i> por efecto del ácido gálico a diferentes concentraciones.....	30
Figura 10. Cinética de muerte de <i>Salmonella Typhimurium</i> por efecto del ácido gálico sin irradiar (AGSI) a concentraciones de 0.025 M,0.05 M y 0.1 M.....	32
Figura 11. Cinética de muerte de <i>Salmonella Typhimurium</i> por efecto del ácido gálico irradiado (AGI) a concentraciones de 0.025 M,0.05 M y 0.1 M.....	33
Figura 12. Cinética de muerte de <i>Salmonella Typhimurium</i> por efecto combinado del ácido gálico sin irradiar + ultrasonido (AGSIUS) a concentraciones de 0.025 M,0.05 M y 0.1 M y el efecto del ultrasonido.....	34
Figura 13. Cinética de muerte de <i>Salmonella Typhimurium</i> por efecto combinado del ácido gálico sin irradiar + ultravioleta (AGSIUV) a concentraciones de 0.025 M,0.05 M y 0.1 M y el efecto de la luz ultravioleta (UV).	35

Figura 14. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto combinado del ácido gálico irradiado (AGI), AGI + ultrasonido (AGIUS) y AGI+ ultravioleta (AGIUV) a concentraciones de 0.025 M. 36

Figura 15. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto combinado del ácido gálico irradiado (AGI), AGI + ultrasonido (AGIUS) y AGI+ ultravioleta (AGIUV) a concentraciones de 0.05 M. 37

Figura 16. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto combinado del ácido gálico irradiado (AGI), AGI + ultrasonido (AGIUS) y AGI+ ultravioleta (AGIUV) a concentraciones de 0.01 M. 38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla comparativa de propiedades de interés de los ácidos fenólicos. 19

Tabla 2. Equipos utilizados 24

Tabla 3. Métodos y referencias usados 24

RESUMEN DE TRABAJO

Salmonella es un género de bacilos gramnegativos perteneciente a la familia enterobacteriaceae. *Salmonella* es mundialmente reconocida como uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades transmitidas por alimentos y agua, es también una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas a nivel mundial y la causante de la fiebre tifoidea.

El ácido gálico es un compuesto fenólico presente en diversas fuentes naturales, como lo son frutas, verduras y plantas, se le atribuye también actividad antiinflamatoria, antioxidante, antibiótica, anticancerígena y protección cardiovascular. Posee actividad antibacteriana gracias a que promueve la inhibición enzimática de algunos microorganismos y afecta la interacción de proteínas adhesivas ubicadas en la pared celular, también tiene la capacidad de unirse a los polisacáridos y así interferir en el desarrollo de la bacteria. La luz ultravioleta, específicamente la luz UV-C con onda que va de los 200 a los 320 nm, ha demostrado poder antimicrobiano altamente potencial a los 254nm, la inactivación microbiana mediante irradiación ha cobrado interés gracias a que es aplicable a una amplia variedad de alimentos, así como desinfección de agua y superficies, su efecto bactericida se atribuye principalmente a las mutaciones genómicas de las bacterias por la formación de enlaces pirimidicos del ADN bacteriano, lo cual imposibilita su desarrollo y reproducción. Experimentalmente se ha demostrado que la exposición de ácido gálico a la irradiación potencializa el efecto bactericida ya que cuando el ácido gálico es irradiado se promueve la generación de especies reactivas de oxígeno las cuales potencial el efecto antimicrobiano de este fenol, pero este efecto es proporcional a la concentración de ácido gálico que sea expuesto a la luz UV-C. Por otro lado, el ultrasonido como agente antimicrobiano, es una serie de ondas acústicas las cuales de forma alterna se expanden y se contraen propiciando la formación de microburbujas las cuales crecen, se contraen y eventualmente implosionan, pero jamás desaparecen, esta fluctuación de tamaño se produce de manera violenta, causándole estrés mecánico a la bacteria y la producción de radicales libres.

Los métodos combinados son una serie de métodos que se pueden utilizar, ya sea potencializando otro método de conservación, o actuar simultáneamente/sucesivamente con otro método de conservación para potenciar el efecto de ambos, la combinación de los métodos de conservación asegura la estabilidad e inocuidad del alimento.

1. INTRODUCCIÓN

La aplicación de métodos combinados o tecnología de barrera se basa en la combinación de barreras o técnicas, las cuales son insuficientes por separado para poder proteger al alimento, pero cuando son aplicadas de manera conjunta pueden llegar a impedir o retrasar los factores de alteración del alimento, manteniendo así la calidad sensorial y nutritiva, pero asegurando la calidad microbiológica de los mismos. Dicho de otro modo, la aplicación de métodos convencionales como desinfección o tratamiento térmico, presentan reacciones físicas y químicas que influyen negativamente en las características sensoriales y nutricionales del alimento, así como en el valor nutricional y los problemas a la salud asociados con el uso de desinfectantes. Un factor más es la creciente demanda de productos alimenticios mínimamente procesados y con características muy similares a los productos frescos. Lo mencionado anteriormente ha guiado la búsqueda de alternativas tecnológicamente novedosas y no térmicas, como la aplicación de radiación ultravioleta -C (UV-C), ya que la luz UV-C ha demostrado un efecto germicida alto para la desinfección de agua, aire, superficies y conservación de alimentos, también se le atribuye la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS).

La cavitación ultrasónica es una actividad inducida en un líquido o material sólido de consistencia casi líquida, esta genera cavidades o burbujas que contienen gas o vapor, se ha demostrado que con esta se puede afectar un sistema biológico mediante un incremento localizado de stress mecánico, temperatura, y/o producción de radicales libres (como OH⁻ y O⁻), todo este proceso iniciado a través de un mecanismo que no es térmico. La luz UV-C y el ultrasonido pueden actuar como inductores de estrés abiótico en función de la biosíntesis de compuestos bioactivos generando un efecto mínimo sobre la calidad y características sensoriales y nutricionales del producto final.

Por otro lado, el ácido gálico es un compuesto fenólico que naturalmente también presenta actividad antibacteriana ya que promueve la inhibición enzimática de algunos microorganismos y la interacción de proteínas ubicadas en la pared celular de estos, cuenta con la capacidad de unirse a polisacáridos y así interferir en el desarrollo microbiano. Es por ello por lo que este trabajo busca aplicar métodos combinados (ácido gálico, luz ultravioleta o ultrasonido) para la inactivación de *Salmonella Typhimurium* en soluciones acuosas.

2. Marco teórico

2.1 *Salmonella*

2.1.1. Generalidades de *Salmonella*

Salmonella es un género de bacilos gramnegativos que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. *Salmonella Typhimurium* es una bacteria del tipo bacilo, gramnegativa, flagelada, cuyo nombre completo es *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad *Typhimurium* (World Health Organization, 2018).

Salmonella es una bacteria presente y resistente que puede sobrevivir durante varias semanas en un ambiente seco y varios meses en agua. Cada año enferman 550 millones de personas, de las cuales 220 millones son niños menores de 5 años. *Salmonella* es una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas a nivel mundial. *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* y *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium*, son los dos serotipos más importantes de *Salmonella* transmitida de animales a seres humanos en la mayor parte del mundo. (World Health Organization, 2018).

Salmonella es mundialmente reconocida como el principal agente etiológico de enfermedades transmitidas por alimentos y agua.

2.1.2. Panorama nacional de salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa de origen bacteriano que afecta a los animales y al hombre algunos serotipos no tienen relevancia en sanidad animal, sin embargo, son importantes en Salud Pública por ser la causa de algunas de las principales infecciones alimentarias. Los serotipos más frecuentemente implicados en brotes es *Salmonella Typhimurium* (SENASICA, 2021).

La vigilancia de la enfermedad abarcó 16 entidades federativas en 2020 como se puede apreciar en la Figura 1, mientras que para los años anteriores abarcó a 14 (2019) y 29 (2018) estados (SENASICA, 2021).

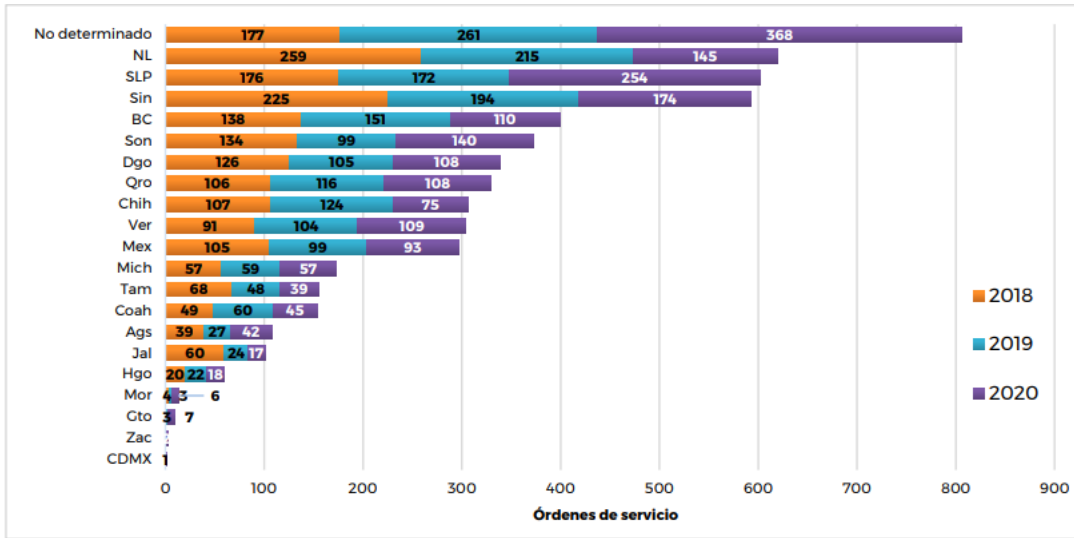


Figura 1. Distribución estatal de análisis para la detección de Salmonelosis en tejidos cárnicos, productos y subproductos acuícolas y pesqueros (2018-2020) CENAPA. Tomada de: SENASICA, 2021.

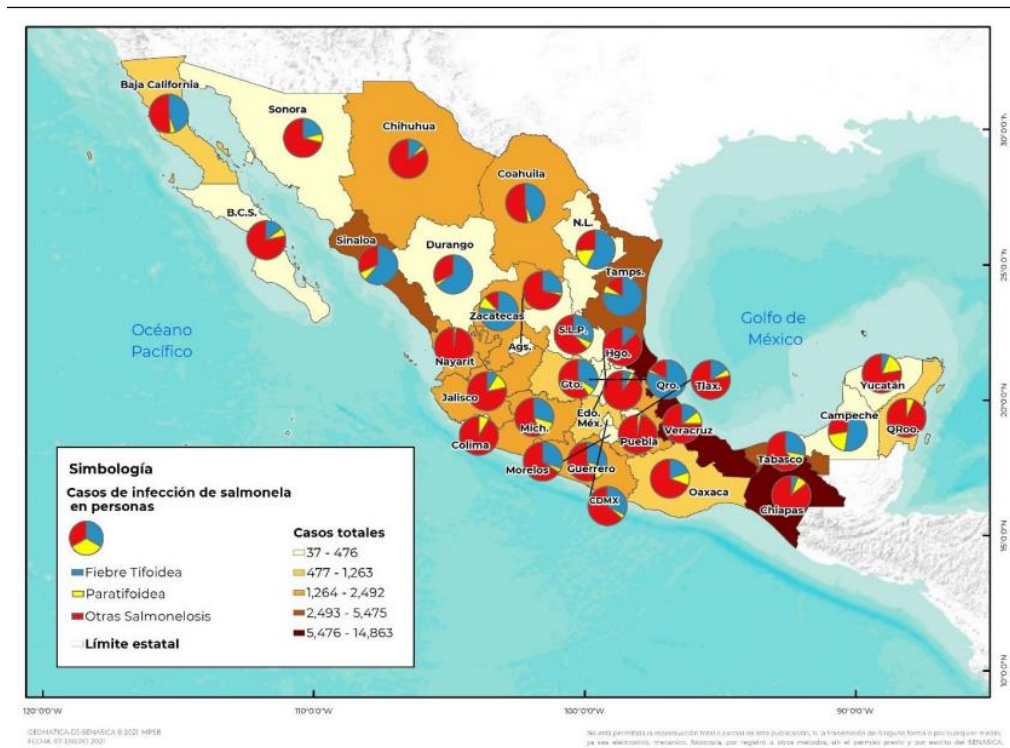


Figura 2. Distribución estatal de casos de infección por *Salmonella* en personas. Tomada de: SENASICA, 2021.

Basado en los estudios realizados y reportados en SENASICA (2021) en la Figura 2 detalla que entre 2018 y 2020, las entidades federativas con la mayor cantidad de diagnósticos positivos a

salmonelosis (distinta a tifoidea y paratifoidea), fueron Chiapas (52,855) Veracruz (38,674), Tabasco (17,885), Puebla (11,512), Nayarit (8,602), Chihuahua (7,831) y Sinaloa (6,354).

2.1.3. Riesgo sanitario

A pesar de los estrictos controles exigidos a la industria alimentaria, se ha calculado que cada año mueren aproximadamente 1.8 millones de personas como consecuencia de enfermedades diarreicas, siendo la causa principal el consumo de agua o alimentos contaminados. En la actualidad se han descrito más de 250 enfermedades diferentes transmitidas a través de los alimentos, dentro de este grupo de enfermedades se encuentra la salmonelosis, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS), representa uno de los principales problemas en salud pública, reportándose anualmente millones de casos en todo el mundo con aproximadamente 1,000 muertes (González- Pedraza et al., 2014).

2.2 Métodos combinados para la conservación de alimentos

2.2.1. Métodos combinados.

La estabilidad y seguridad de que un alimento se mantenga inocuo se basa en una combinación de múltiples factores de conservación denominado efecto obstáculo, barreras o vallas, los cuales, los microorganismos que estén presentes en el alimento sean incapaces de superarlos, esta metodología fue introducida por primera vez por Leistner en 1978. Pero no fue hasta 1985, donde a partir de que se comprendiera el efecto obstáculo se derivó la tecnología de obstáculos, el objetivo era mejorar la calidad microbiana de los alimentos mediante la optimización y modificación inteligente de los obstáculos presentes (Leistner & Gould, 2002).

Los métodos combinados se describen por ser una combinación de obstáculos o barreras, ya sea temperatura, actividad de agua, pH, potencial redox, conservantes (nitrito, sorbato o sulfito), bacterias competitivas y las llamadas tecnologías emergentes, las cuales tienen un efecto bactericida, pero resultan insuficientes para proteger totalmente la inocuidad del alimento en muchos de los casos, en cambio, se ha demostrado que estas metodologías en conjunto pueden llegar a impedir o retrasar la presencia de los factores de alteración, afectando de manera mínima la calidad del alimento, sea esta sensorial o nutrimental, en comparación con los métodos tradicionales de conservación (Leistner, 1992).

Dicho de otro modo, según asegura Tinoco-Martínez (2021) la tecnología de barreras asegura la estabilidad e inocuidad de los alimentos, cuidando sus propiedades sensoriales y nutrimentales, así como su calidad, además de que requiere menos gastos energéticos durante producción y almacenamiento del alimento, lo que la hace una tecnología económica.

2.2.2. Aplicación de los métodos combinados

Hay muchas posibilidades de combinación de los distintos obstáculos o barreras, los procesos combinados se pueden clasificar en dos grupos: 1) los que se basan en la acción específica de métodos de conservación que actúen de manera simultánea o sucesivamente sobre los microorganismos o enzimas en cuestión 2) o bien, aquellos cuya acción se basa en la potenciación del efecto de otros métodos obteniéndose así un efecto sinérgico (Tinoco-Martínez, 2021).

Diversos estudios han demostrado la efectividad del uso combinado por ejemplo del tratamiento de altas presiones (HPP) y bacteriocinas en productos cárnicos o con otras sustancias antimicrobianas naturales como lactato-diacetato. De acuerdo la combinación de sustancias antimicrobianas podría aumentar la efectividad y ventajas en la calidad y seguridad del producto (Tinoco-Martínez, 2021).

2.3 Luz ultravioleta

2.3.1. Luz ultravioleta de onda corta

La luz UV es la radiación electromagnética con longitud de onda más corta que la luz visible y más larga que los rayos X; esta se puede clasificar en UV-A (320-400nm), UV-B (280-320nm) y UV-C (200-280). La UV-C ha demostrado que posee el mayor efecto germicida entre 250 y 270nm y su mayor eficacia de desinfección se sitúa específicamente en 254nm (Millán-Villarreal et al., 2015). En la Figura 3 se muestra gráficamente la región ultravioleta en el espectro electromagnético.

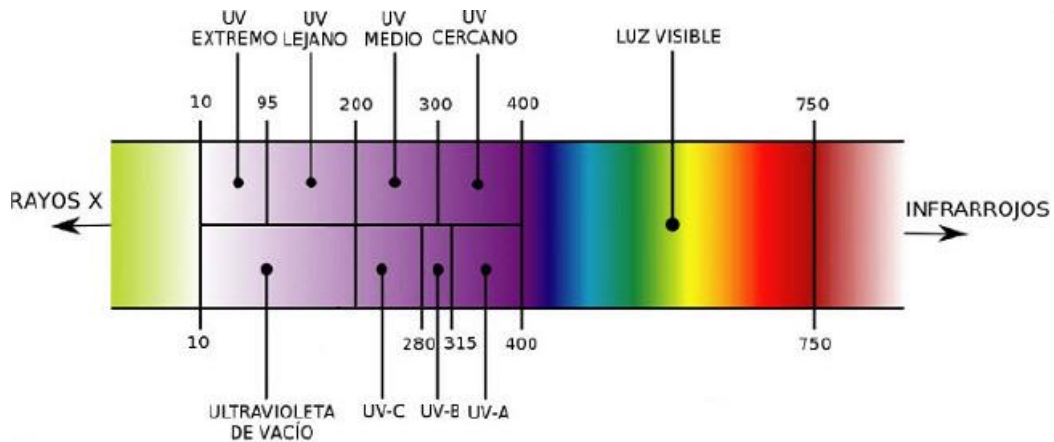


Figura 3. Espectro electromagnético. Tomada de: Domínguez & Parzanese, 2012.

La aplicación de radiación con luz ultravioleta de onda corta (UV-C) es una de las tecnologías emergentes que ha cobrado mucho interés ya que se puede aplicar a una amplia gama de alimentos, así como la desinfección de agua y superficies.

2.3.2. Fundamento de su aplicación

El efecto que posee la luz UV-C se debe a la interacción que tiene con el material genético de la bacteria, ya que se ocasiona cambios físicos en los electrones y el rompimiento de enlaces en el ácido desoxirribonucleico (ADN), de esta manera se inactivan los procesos de crecimiento y reproducción del microorganismo (Peralta-Pérez, 2019).

Cuando la luz UV-C es absorbida ocasiona la formación de enlaces entre nucleótidos vecinos (Figura 4), generando así uniones cruzadas de moléculas dobles o dímeros (nucleótidos de bases pirimidínicas) pertenecientes a la misma cadena, siendo las uniones más comunes entre timina-timina, igual se puede generar la unión: citosina-citosina, citosina-timina y uracilo-uracilo (Peralta-Pérez, 2019).

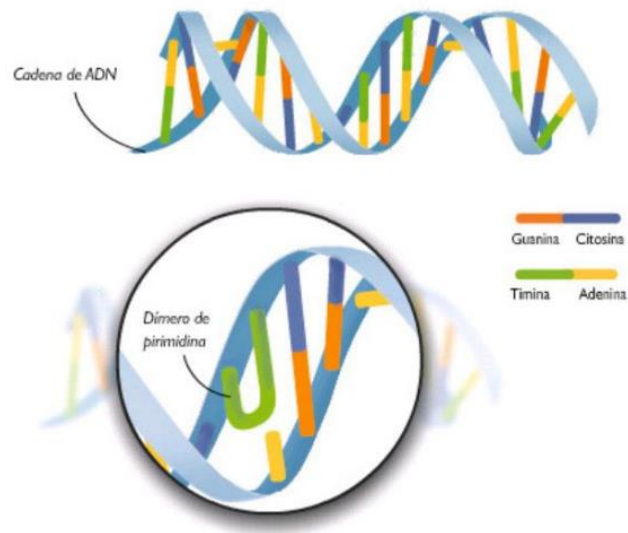


Figura 4. Dimerización de timina en microorganismos irradiados con luz UV. Tomado de: Martín, 2019.

La formación de un número suficiente de fotoproductos dentro de un microorganismo interfiere en el apareamiento adecuado de las bases y ocasiona un bloqueo en la síntesis de ADN impidiendo su replicación y transcripción debido a la mutagénesis. Esto pone un freno a su reproducción y conduce a su muerte celular (García-Carrillo, 2020). Según lo descrito por Martín (2019) los efectos en los enlaces cruzados son proporcionales al tiempo de exposición a la luz UV-C.

2.4 Ultrasonido

2.4.1. Principio del método

El ultrasonido es un sonido que se encuentra por encima de la capacidad del oído humano (frecuencias por arriba de los 20 KHz). La frecuencia de ultrasonido se refiere al número de repeticiones o ciclos de las ondas sónicas por segundo. La energía que se ingresa en el fluido depende la intensidad, la cual relaciona diversas variables; la velocidad de la onda, la densidad del fluido y la diferencia de presión alcanzada en las etapas de la cavitación (Pineda-Muñoz et al.,2017).

2.4.2. Sonicación

La energía sónica se obtiene a partir de la transformación de la energía eléctrica mediante un transductor sónico de tal forma que induce la formación de burbujas, generadas a partir de un campo ultrasónico en un medio líquido generadas a partir de regiones alternadas de compresión y

expansión, donde las burbujas crecen, se contraen y eventualmente implotan. Existen dos tipos de transductores de uso común, los piezoeléctricos y los magnetostrictivos, en donde los primeros son los más utilizados. La razón por la cual se considera al ultrasonido como una fuente de energía notable se debe al fenómeno de cavitación acústica (Pineda-Muñoz et al., 2017).

De otro modo, el ultrasonido se va a transmitir mediante ondas acústicas que, de forma alternada, se extienden y se comprimen generando dos etapas que se conocen como rarefacción y compresión. En la rarefacción se genera una presión negativa lo suficientemente fuerte para superar las fuerzas de atracción intermoleculares, en donde, un volumen muy pequeño del medio líquido pasa a un estado gaseoso en forma de cavidades diminutas también llamadas microburbujas, por otro lado, la compresión, las microburbujas de gas son comprimidas, pero no desaparecen (Pineda-Muñoz et al.,2017).

2.4.3. Cavitación Acústica

La cavitación se refiere a la actividad ultrasónica inducida que ocurre en un líquido o material sólido de consistencia casi líquida que consiste en la formación de cavidades o burbujas, que contienen gas o vapor, es decir, la cavitación se produce en aquellas regiones de un líquido que se encuentran sometidas a presiones de alta amplitud que alternan rápidamente (Robles & Ochoa,2012).

Durante la mitad negativa del ciclo de presión, el líquido se encuentra sometido a un esfuerzo tensional y durante la mitad positiva del ciclo experimenta una compresión. Como se puede observar en la Figura 5, el resultado de dicha compresión es la formación ininterrumpida de microburbujas cuyo tamaño aumenta miles de veces en la alternancia de los ciclos de presión hasta los 50,000 KPa y los 5500 °C. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implodian o colapsan violentamente para volver al tamaño original. La cavitación puede afectar un sistema biológico en virtud de un incremento localizado de stress mecánico, temperatura, y/o producción de radicales libres (como OH⁻ y O⁻), todo esto iniciado mediante un mecanismo no-térmico (Robles & Ochoa,2012; Chaveste- Ledezma, 2006).

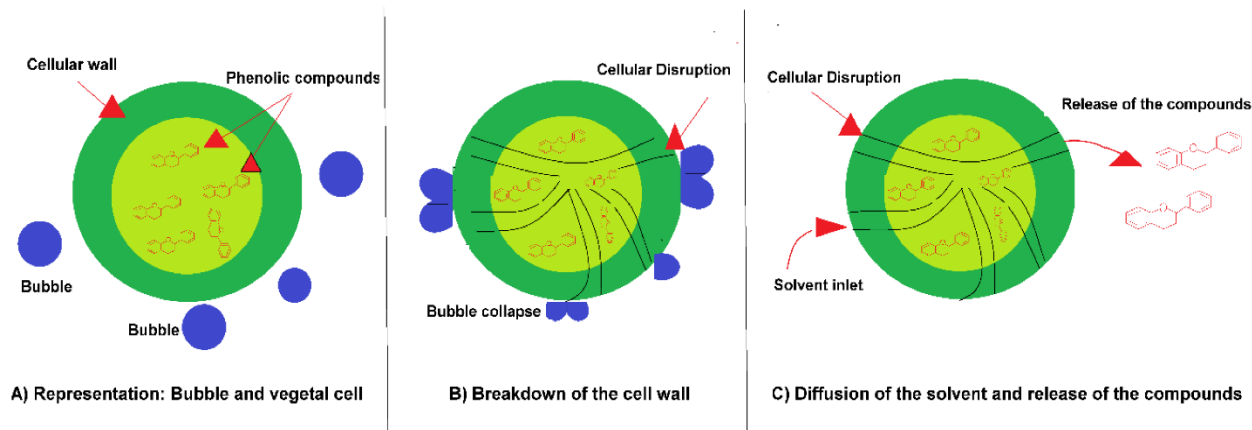


Figura 5. Representación gráfica de la burbuja de cavitación colapsando y liberando material vegetal en tres pasos. (A) Representación de burbuja y célula vegetal, (B) Ruptura de la pared celular y colapso de la burbuja, finalmente (C) Difusión del solvente a través de la ruptura celular y liberación de los compuestos. Tomada de: Medina-Torrez,2017.

2.4.4. Inactivación microbiana

El primer antecedente acerca de los efectos del ultrasonido en seres biológicos fue reportado por Wood & Lomis en 1928, ellos observaron que la ultrasonicación a una frecuencia entre 100-700 kHz, era capaz de matar formas de vida inferiores como ranas y peces pequeños, mientras que las bacterias sobrevivían a esa frecuencia. En el año de 1929 Harvey y Loomis reportaron que, bajo condiciones apropiadas, el ultrasonido a una frecuencia aproximada de 400 kHz era capaz de matar bacterias luminosas en agua a una temperatura de 19°C. Sin embargo, consideraron que el método era demasiado caro para utilizarse de forma práctica o comercial (Pineda-Muñoz et al., 2017).

Más adelante en la década de los 60s, la industria comenzó a utilizar al ultrasonido como método de limpieza, lo cual ocasionó un rápido desarrollo y reducción en el costo del equipo generando así los primeros baños ultrasónicos y fue entonces cuando diferentes laboratorios de biología y bioquímica comenzaron a utilizar a la sonoquímica, básicamente para la ruptura celular. Científicos más adelante en esa época observaron que los mecanismos específicos de desactivación de los microorganismos debido a la ultrasonicación generando así la inactivación de microorganismos basados en diferentes parámetros como; la temperatura, la frecuencia de ultrasonido y la potencia acústica. En 2003, se reportó el efecto de diferentes parámetros ultrasónicos como la frecuencia (desde 20 hasta 850 kHz), la potencia acústica y el tiempo de exposición en la muerte de bacterias (Pineda-Muñoz et al., 2017).

2.5 Ácidos fenólicos

2.5.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Junto con las vitaminas, los compuestos fenólicos se consideran importantes antioxidantes en la dieta, por ejemplo, se encuentran presentes en frutas, hortalizas, raíces y cereales (Rodríguez-Mey et al., 2023).

Los ácidos fenólicos consisten en dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Es importante recalcar que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos (Olivas-Aguirre et al., 2015).

2.5.2. Estructura y características del ácido gálico

El ácido gálico (AG), también conocido como ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico (Figura 6), es un compuesto fenólico presente en diversas fuentes naturales tales como: frutas, verduras y plantas, así mismo se le atribuyen múltiples efectos biológicos tales como actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibiótica incluso protección cardiovascular y anticancerígena.

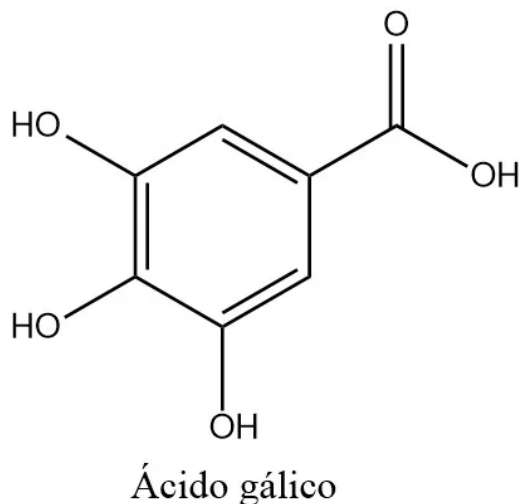


Figura 6. Estructura 2D del ácido gálico. Tomada de: Químicafacil.net, 2020.

2.5.3. Aplicaciones biológicas

El AG tiene aplicaciones en múltiples áreas, tales como la farmacéutica, dado que se considera un precursor de antibióticos de amplio espectro como la trimetoprima, también tiene importancia en el área de alimentos, ya que este se ha utilizado como antioxidante de grasas y aceites, también se

utiliza como aditivo en algunas bebidas y alimentos para evitar su oxidación. Este compuesto también presenta actividad antibacteriana ya que promueve la inhibición enzimática de algunos microorganismos y la interacción de proteínas adhesivas ubicadas en la pared celular de estos y la capacidad que tiene para unirse a polisacáridos y así interferir en el desarrollo microbiano (Govea-Salas, 2013).

2.5.4. Comparativa de ácidos fenólicos

Tabla 1. Tabla comparativa de propiedades de interés de los ácidos fenólicos.

Ácido fenólico	Solubilidad	Toxicidad	Riesgos de manipulación	Referencia
Ácido Cafeico	Poco soluble en agua fría. Soluble en agua caliente y alcohol	No se dispone de datos sobre la carcinogenicidad del ácido cafeico en humanos. Existen pruebas suficientes en animales de experimentación sobre la carcinogenicidad del ácido cafeico. Evaluación general: El ácido cafeico es posiblemente cancerígeno para los seres humanos	Provoca lesiones oculares graves, así como irritación ocular. Provoca hiperplasia epitelial en el estómago de ratas que reciben 20 g/kg de dieta durante 4 semanas. Un irritante se dirige al tracto gastrointestinal y a los riñones.	Centro Nacional de Información Biotecnológica (2023).
Ácido Gálico	Soluble en agua: 1 g se disuelve en 87 ml de agua, 3 ml de agua hirviendo, 6 ml de alcohol petróleo	Toxicidad específica en determinados órganos exposición única Inhalación: Puede irritar las vías respiratorias.	Inhalación: Puede ser nocivo si se inhala. Provoca una irritación del tracto respiratorio. Ingestión. Puede ser nocivo si es tragado. Piel Puede ser nocivo si es absorbido por la piel. Provoca irritaciones de la piel. Ojos: Provoca irritación ocular grave.	QUIMIPUR. (2018). Reactivos Meyer. (2015).
Ácido Ferúlico	Soluble en agua caliente, alcohol, acetato de etilo. Moderadamente soluble en éter. Poco soluble en éter de petróleo y benceno.	No se clasificará como toxicidad aguda Provoca irritación cutánea.	Corrosión o irritación cutánea Lesiones oculares graves/irritación ocular	Centro Nacional de Información Biotecnológica (2023). ROTH. (2016). ácido trans-Ferúlico.

2.5.5. Ácido gálico como método combinado con luz UV-C.

El AG es un compuesto fenólico con limitada actividad microbiana, en cambio se ha podido demostrar que el tratamiento con luz UV-C potencia su actividad bactericida, de este modo se

aumenta su efecto como desinfectante de superficies, instrumentos y productos alimenticios frescos. De acuerdo con Luna-Domínguez et al. (2023) el ácido gálico ya irradiado promete mejorar su actividad como agente desinfectante en frutas y hortalizas en combinación con nuevas tecnologías ya sean de índole tradicionales o novedosas para poder reducir la carga microbiana o incluso puede ser utilizado como conservante para poder mantener la carga microbiana durante el tiempo en almacén de los productos.

La luz UV-C tiene la habilidad de fotocalizar muchos compuestos orgánicos mediante la generación de radicales libres, tales como HO^\cdot y O_2^\cdot , estos radicales pueden destruir compuestos orgánicos ya que son reactivos electrófilos y de este modo van a reaccionar rápidamente con los compuestos orgánicos que sean ricos en electrones por la adición de radicales, la extracción de hidrogeno y por la transferencia de electrones (Luna-Domínguez et al., 2023).

3. Justificación

A lo largo de la historia, las industrias alimentarias han utilizado numerosos desinfectantes, incluidos el cloro (hipoclorito sódico), peróxido de hidrogeno, ácidos orgánicos y el ozono para lograr reducir la carga bacteriana en los alimentos, no obstante, los ya mencionados han demostrado eliminar o inactivar solo de manera parcial las bacterias, atribuyendo lo anterior con el efecto toxico que estas sustancias poseen. En la actualidad se ha demostrado que su eficacia dependerá de la cantidad de cloro libre disponible en el agua que se pone en contacto con los microorganismos, también depende del pH, y se ha demostrado que pierde efectividad ante la exposición con el aire, la luz y metales, anexando a todo esto los daños a la salud que estar a su exposición continua puede provocar como irritación en piel y daños en las vías respiratorias. Durante la última década, se han investigado y propuesto varios métodos de conservación no térmicos o tratamientos desinfectantes, estos incluyen desinfectantes como ácidos orgánicos, agua electrolizada, ozono, revestimiento antimicrobiano e intervenciones físicas como plasma frío, luz ultravioleta (UV-C) y ultrasonido, que se utilizan de manera independiente para la conservación de alimentos, sin embargo, algunos estudios recientes indican que la unión de estos puede potencializar el efecto antimicrobiano de un antimicrobiano natural. En ese sentido, el ácido gálico es un compuesto que cuando es irradiado por la luz UV-C puede incrementar su capacidad antimicrobiana lo cual lo hace adecuado para poder usarlo en alimentos. Por lo anterior este estudio pretende evaluar el efecto combinado del ácido gálico irradiado con ultrasonido o ultravioleta para la inactivación de *Salmonella Typhimurium* inoculado en soluciones acuosas.

4. Objetivos

4.1.General

Evaluar métodos combinados (ácido gálico, UV o ultrasonido) para la inactivación de *Salmonella Typhimurium* en soluciones acuosas.

4.2.Específicos

1. Valorar el efecto de la activación del ácido gálico mediante luz ultravioleta en la inactivación de *Salmonella Typhimurium*.
2. Comparar el efecto individual del ultrasonido y la luz ultravioleta sobre la inactivación de *Salmonella Typhimurium*.
3. Demostrar el efecto combinado del ácido gálico irradiado y ultrasonido o luz ultravioleta

5. Diagrama de trabajo

En el desarrollo y proceso de este proyecto se debe seguir un orden de acciones, en el siguiente diagrama se puede observar la esquematización de trabajo a realizarse.

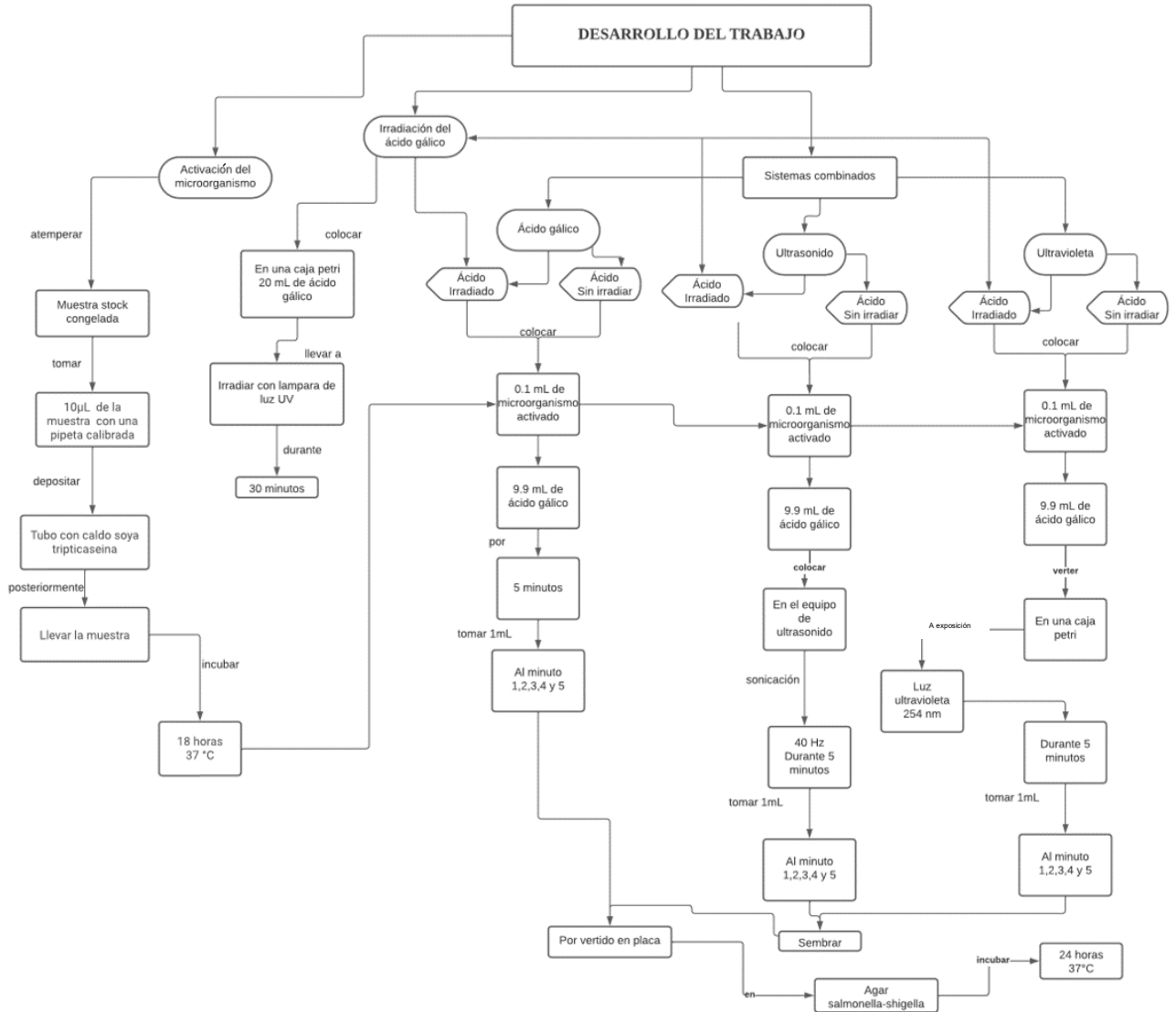


Figura 7. Esquematización del trabajo.

Materiales y métodos

Material de vidrio: El necesario para cada determinación.

Material biológico: *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

Reactivos: Los necesarios para cada determinación grado analítico o grado alimenticio.

En la tabla 1 y 2 muestran los métodos utilizados en la investigación.

Tabla 2. Equipos utilizados

EQUIPO	MARCA	MODELO
Autoclave	CISA	AS25
Balanza analítica	Ohaus, serie Pioneer	PA 224C
Baño de agua	Barnstead Lab-Line	18005AQ
Campana de flujo laminar vertical	Prendo	CFLV-102
Contador de colonias	SOL-BAT	Q-20
Incubadora orbital	Prendo	INO-650
Lámpara de Luz UV-C	Stenner pump Company (254 nm, 12 W, TodoAgua, México)	170MD5
Limpiador ultrasónico	VEVOR	JPS-08A
Parrilla digital	Fisher Scientific	Isotemp
Refrigerador	MABE	RMT510
Vortex	IKA	VORTEX3

Tabla 3. Métodos y referencias usados

Método	Referencia	Determinación
---------------	-------------------	----------------------

Activación de <i>Salmonella Typhimurium</i>.	NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-114-SSA1-1994.	Restauración de las células de <i>Salmonella Typhimurium</i>
Efecto bactericida del ácido gálico	Soriano, A. (2020)	Ácidos fenólicos como agentes antioxidantes y antibacterianos.
Métodos combinados	Leistner, L. (1992)	Combinación de métodos para potenciar efecto bactericida del método por sí solo.
Proceso de irradiación UV-C	Rossel -Bernarndo et al. 2020	Radiación ultravioleta-c para desinfección bacteriana
Proceso de ultrasonido	Chaveste -Ledezma, S. (2006).	Ultrasonido como un método potencial de inactivación microbiana
Vertido en placa	NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-199.	Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas.

6. Metodología

6.1 Preparación de ácido gálico

En un frasco limpio y hermético se colocó agua destilada, se rotuló y se metió a la autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Por otro lado, con la ayuda de una balanza analítica correctamente calibrada se pesó el AG para lograr las concentraciones, según sea el experimento realizado.

Una vez que salió el agua de la autoclave se dejó enfriar a temperatura ambiente, una vez a temperatura ambiente se colocó el AG en el agua estéril, todo este procedimiento se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar para que el sistema se mantuviera estéril.

6.2 Reactivación microbiana

Se atemperó un eppendorf de 1mL de *Salmonella Typhimurium*, se agitó en vórtex y se tomó 10 µL con una pipeta automática calibrada, se colocó en un tubo con 10 mL de caldo soya tripticasa y se agitó con vórtex nuevamente. Posteriormente se llevó a encubar a 37° C por 18 horas hasta lograr un crecimiento de 1×10^9 por mililitro.

6.3 Irradiación de Ácido gálico con luz UV-C:

Se colocó en una caja Petri estéril 20 mL de ácido gálico y se irradió con lampara UV-C por 30 minutos.

6.4 Procedimiento del ácido gálico

Se colocó en un tubo 9.9mL con AG sin irradiar 100 microlitros de *Salmonella Typhimurium* proveniente del caldo soya tripticasa. Se agito con vórtex y se tomó 1mL a los minutos 1,2,3,4 y 5, y se suspendió en el tubo con buffer. Posteriormente del tubo con buffer se realizaron las diluciones correspondientes para poder tener un recuento viable en las placas. Por último, se sembró por la técnica de vertido en placa, se llevó a encubar a 37° C por 24 horas para su posterior recuento de UFC.

Se realizó el mismo procedimiento con el AG irradiado.

6.5 Procedimiento de ultrasonido:

Se colocó en un tubo 9.9mL con AG sin irradiar 100 microlitros de *Salmonella Typhimurium* proveniente del caldo soya tripticasa. Se agito con vórtex y se ajustó al equipo de zonificación por

5 minutos, de igual manera se tomó 1mL cada minuto (del minuto 1-5) y se suspendió en el buffer. Posteriormente del tubo con buffer se realizaron las diluciones correspondientes para poder tener un recuento viable en las placas. Por último, se sembró por la técnica de vertido en placa, se llevó a encubar a 37° C por 24 horas para su posterior recuento de UFC.

Se realizó el mismo procedimiento con el AG irradiado.

6.6 Procedimiento con Luz UV

Se colocó en un tubo 9.9mL con AG sin irradiar 100 microlitros de *Salmonella Typhimurium* proveniente del caldo soya tripticasa. Se agitó con vórtex y se colocó en una placa estéril para ponerla ante la luz UV-C por 5 minutos, de igual manera se tomó de esta placa 1mL cada minuto (del minuto 1-5) y se suspendió en el buffer. Posteriormente del tubo con buffer se realizaron las diluciones correspondientes para poder tener un recuento viable en las placas. Por último, se sembró por la técnica de vertido en placa, se llevó a encubar a 37° C por 24 horas para su posterior recuento de UFC.

Se realizó el mismo procedimiento con el AG irradiado.

6.7 Análisis microbiológico

De los 6 sistemas realizados se evaluó el crecimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC) de *Salmonella Typhimurium* obtenidas en placas sembradas en un tiempo de incubación de 24h a 37°C.

6.7.1 Recuento de células viables

Es la medida de la concentración de células. Para realizarlo se obtuvo 1mL de suspensión de bacterias y se realizaron diluciones seriadas 1:10, posteriormente se cultivaron alícuotas de 1mL en medio agar salmonella-shigella, según lo descrito en la **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA**. Cada bacteria o acumulación de bacterias creció para poder formar una colonia visible que fue contada, de manera estadística, el resultado se obtiene del conteo en la placa \times la dilución \times 10.

7. Resultados y discusión de resultados.

7.1 Evaluación del tiempo de contacto en la inactivación de *Salmonella Typhimurium* con ácido gálico

Como parte inicial de la experimentación se buscó tener la base en cuanto a tiempo de exposición para *Salmonella Typhimurium* a los diferentes sistemas, por lo cual se miden 2 parámetros inicialmente, el efecto de ácido gálico contra el tiempo de exposición. A continuación, en la Figura 8 se presenta la cinética de inactivación de *Salmonella Typhimurium* por el efecto del AG con relación al tiempo de contacto entre estos dos. Se observó que la inactivación tiene mayor eficiencia en los primeros 5 minutos de contacto, logrando reducir alrededor de 3 ciclos logarítmicos, después de este lapso ya no existe efecto ante el tiempo de exposición, observándose un efecto de cola.

Lo descrito anteriormente concuerda con lo reportado por Cheng et al. (2020), pues explica que cuando las bacterias se encuentran expuestas a un ambiente con presencia de ROS, estas pueden desarrollar distintos mecanismos de protección para resistir sus inactivaciones, entre estos mecanismos se pueden enlistar la adaptación al ambiente, el cambio de un estado latente y la activación de genes que le ayuden a resistir estrés, lo que se conoce como mutaciones adaptativas. Cheng et al. 2020, menciona que, la membrana celular intenta reducir su superficie para poder minimizar lesiones, requerimiento de energía y actividades metabólicas, cuando las ROS exógenas están causando daño al ADN bacteriano, se activa el sistema de reparación SOS para mantener la integridad del genoma. Esto se resume en que las bacterias pueden mutar de manera adaptativa, lo cual selecciona positivamente genes gracias al sistema de reparación SOS.

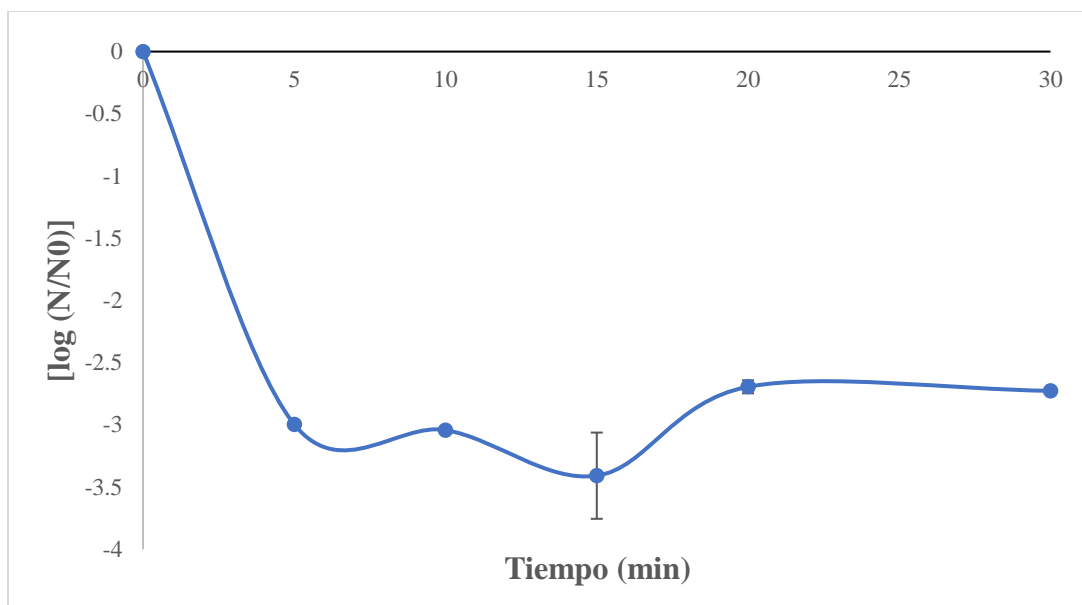


Figura 8. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto del ácido gálico vs tiempo de exposición.

7.2 Efecto de las concentraciones de ácido gálico sobre la inactivación de *Salmonella Typhimurium*.

A continuación, se buscó estudiar una nueva variable, el comportamiento de *Salmonella Typhimurium* ante diferentes concentraciones de AG de forma ascendente para ver si el aumento de la concentración genera cambios importantes en la viabilidad del microorganismo, en la Figura 9 se muestra un gráfico que permite observar el poder de un agente antimicrobiano natural, así como la capacidad de resistencia que la bacteria adquirió con relación al aumento en concentración a la que fue sometida.

Se logra observar que hay mayor inactivación proporcional al aumento en la concentración del AG, logrando reducir casi 4 ciclos logarítmicos a una concentración de 0.1M de AG, concentraciones más altas incrementan la reducción microbiológica a 7 ciclos no observándose diferencia significativa a las distintas concentraciones (0.15M, 0.2M y 0.25M).

Lo que se muestra en la figura concuerda con el trabajo presentado por Niño Herrera et al. (2020), quienes trabajaron diferentes concentraciones de AG frente a cepas de bacterias ácido- lácticas (BAL) (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii*/*Streptococcus thermophilus*) y *E. coli*. En general, los efectos que obtuvieron fueron dependientes de la concentración de AG al que fueron expuestas las cepas, ya que los compuestos polifenólicos

pueden activar o inhibir el metabolismo de un microorganismo dependiendo de sus estructuras y concentración. Los autores explican que cuando trabajaron a una concentración de 200ppm (0.0016M) de AG se notaba como disminuía de manera importante el crecimiento de las BAL, en cambio cuando se aumentaba la concentración a 1000ppm (0.008M) o más, el comportamiento era similar para todos los casos, es decir no había cambio alguno en la disminución de población bacteriana, aunque se siguiera aumentando la concentración de AG. Para trabajar con *Salmonella Typhimurium* se tomó 0.1M como concentración máxima para desarrollar la experimentación y evaluar el comportamiento en la inactivación mediante la combinación de métodos.

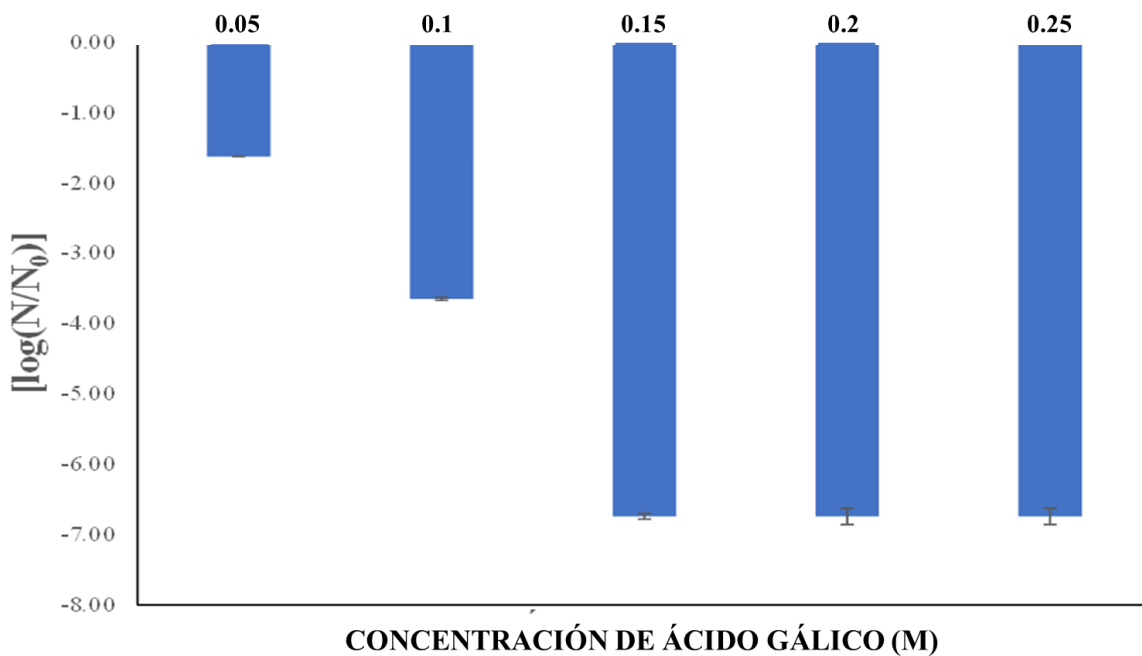


Figura 9. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto del ácido gálico a diferentes concentraciones.

7.3 Cinética de inactivación de *Salmonella Typhimurium* mediante ácido gálico irradiado y sin irradiar.

El ácido gálico presente en numerosas plantas, frutas y verduras contiene un efecto antimicrobiano, este afecta de manera importante el mecanismo de la síntesis de proteínas de las células, es decir, interfiere en el metabolismo microbiano que ayudan a retardar o inhibir el crecimiento de los microorganismos y como beneficio extra se ha observado que, las bacterias no generan resistencia ante estos ácidos de origen vegetal (Cerón-Carrillo et al., 2014). Es necesario valorar el efecto

antimicrobiano como agente individual por lo cual, en la Figura 10 se muestra la cinética de inactivación de *Salmonella Typhimurium*, se observó que cuando se expone *Salmonella Typhimurium* a una concentración de 0.025 de AG el efecto se ve reflejado únicamente conforme avanza el tiempo ya que al primer contacto el AG no es tan fuerte como para poder reducir la mitad de un ciclo logarítmico, en comparación a cuando se sube la concentración a 0.05 se puede apreciar un efecto positivo desde el primer minuto y de igual manera se va favoreciendo la inactivación en cuanto avanza el tiempo, a diferencia de cuando se trabaja con 0.1 se logra reducir poco más de 1.5 ciclos logarítmicos en el primer minuto, por consiguiente a medida que avanza el tiempo se logra una inactivación de 3 ciclos logarítmicos es decir un mayor número de muerte microbiana en comparación a los casos anteriores. El aumento del efecto inhibitorio del AG es debido al aumento en la cantidad de ácido gálico presente, esto concuerda con lo obtenido por Cerón-Carrillo et al. (2014) ya que, entre mayor cantidad de AG presente en sus muestras de chiles serrano, habanero y poblano, mayor fue su inhibición contra *Lactobacillus casei* debido a que los compuestos fenólicos tienen la capacidad de penetrar la membrana bacteriana causando lisis. También concuerda con lo reportado por el autor Rodríguez Vaquero et al. (2007), quien en su experimentación con vinos, evaluó 5,10, 25, 50, 100, 200, 500 y 1,000 (mg/L) de ácido gálico contra cepas de *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Flavobacterium sp.*, y observó que en el caso de las bacterias *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* y *Flavobacterium sp.*, el AG no tuvo actividad antimicrobiana, en cambio en *E. coli* se observó que a 5 y 10 mg/L había una débil inhibición y a medida que incrementó la concentración se produjo una ligera inactivación. En cambio, para el caso de *Klebsiella pneumoniae*, a medida que incrementa la concentración de AG aumenta la actividad antimicrobiana de este, afirmando que el incremento en la concentración de los polifenoles en las muestras de vino aumenta la actividad antimicrobiana, dependiendo también de la sensibilidad que el microorganismo tenga ante el fenol utilizado.

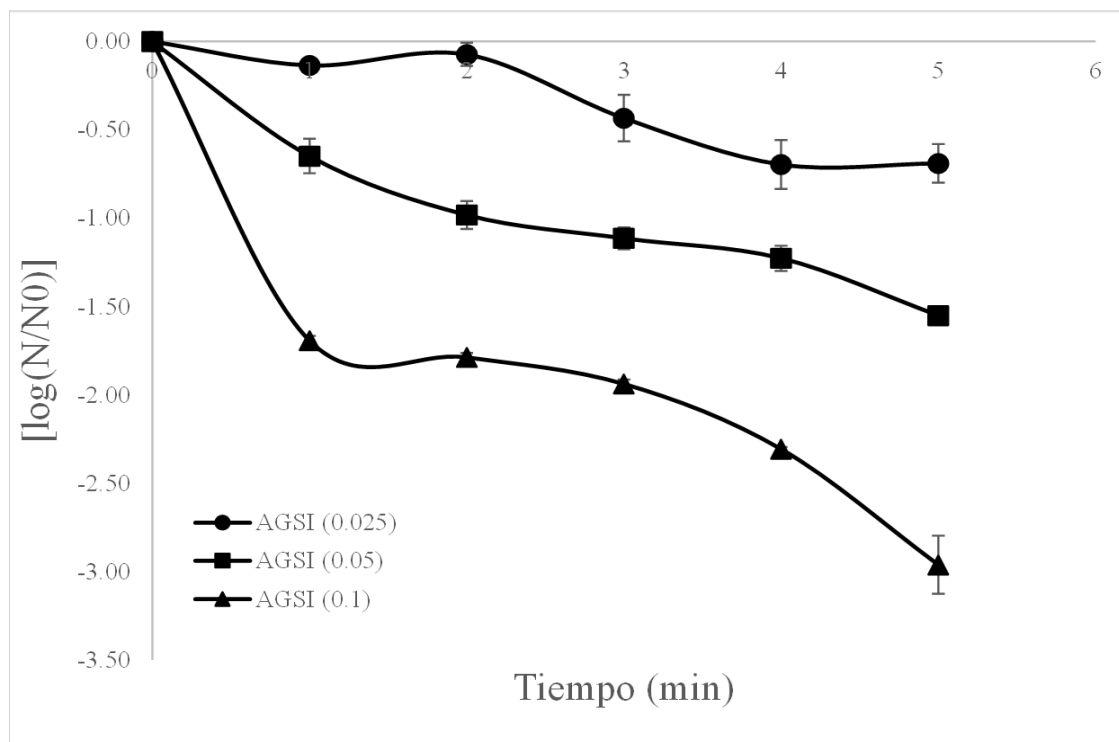


Figura 10. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto del ácido gálico sin irradiar (AGSI) a concentraciones de 0.025 M, 0.05 M y 0.1 M.

Como se demostró anteriormente, el ácido gálico por sí solo posee un efecto antimicrobiano, este efecto se ha asociado primordialmente a la capacidad que tiene de generación de especies oxidativas reactivas (ROS) y el efecto sobre la membrana bacteriana, utilizándolo ahora en combinación de la irradiación, sometimos las mismas concentraciones de AG, pero en este caso como se puede apreciar en la Figura 11 como el efecto inhibitorio del AG aumenta desde la concentración más baja que es de 0.025M, se observa una reducción de un ciclo logarítmico desde los 3 min. Cuando se pone a actuar la concentración de 0.1M se obtienen efectos más satisfactorios que la metodología donde no se usó la irradiación, ya que para esta situación se logran reducir hasta 4 ciclos logarítmicos a los 5 min.

El efecto nocivo en la membrana bacteriana se debe a la generación de ROS debido a la auto oxidación de AG generando así compuestos foto oxidados, se ha demostrado que cuando se irradia con luz UV-C presenta una actividad antimicrobiana mejorada (Wang et al., 2019)

Cossu et al. (2016) en su trabajo experimental pone a prueba AG (4nM) irradiado con luz UV-A, que es una onda que va de los 320 a 400nm (Domínguez & Parzanese, 2012) durante 15 min contra

Staphylococcus aureus y observó que se podía lograr una reducción > 5 log, se le atribuye esta actividad antimicrobiana mejorada de AG por la oxidación de lípidos de la membrana bacteriana a partir de ROS, como lo es el peróxido de hidrógeno y los radicales generados por la exposición del AG a la luz UV-C. El mismo grupo de investigación también evaluó la actividad antimicrobiana mejorada de los compuestos fenólicos contra bacterias Gram positivas y negativas y aunque el efecto fue positivo para ambos casos, notaron que las cepas Gram negativas son más susceptibles. Se puede observar que, de manera similar, el efecto de la concentración tiene importancia en cuanto a mayor concentración, mayor es la generación de ROS que atacan la pared bacteriana.

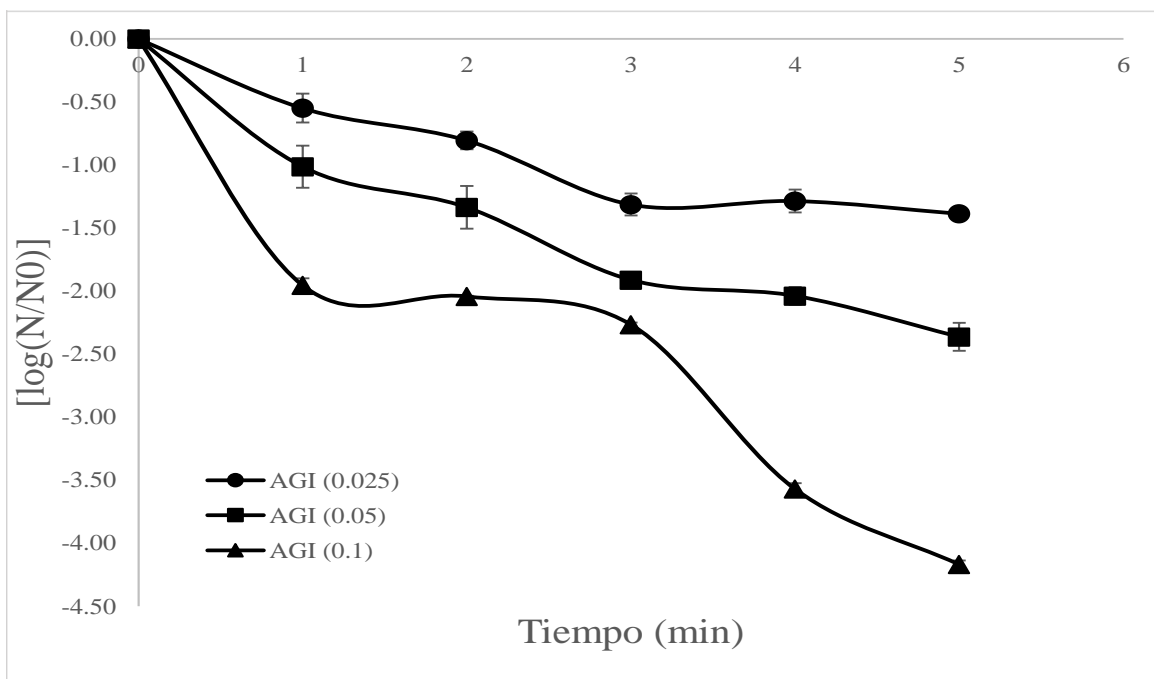


Figura 11. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto del ácido gálico irradiado (AGI) a concentraciones de 0.025 M, 0.05 M y 0.1 M.

El efecto antimicrobiano del tratamiento con ultrasonido se debe a la cavitación y generación de radicales libres, que alteran la membrana celular y generan daños en las estructuras de ADN bacteriano. Este procedimiento consiste en aplicar ondas con frecuencia de 20 KHz, como se puede observar en la Figura 12, el ultrasonido (US) aplicado logra una reducción de >5 log, en cambio cuando se utiliza en combinación con el ácido gálico sin irradiar, se observa un fenómeno muy particular ya que el efecto antimicrobiano de ambas metodologías se ve contrarrestado incluso con el aumento en la concentración de AG utilizado. Gonzales-Limón (2016) afirma que la

disminución en el contenido fenólico puede ser atribuido al consumo de fenoles de las especies reactivas (ROS) causado por el tratamiento de ultrasonido.

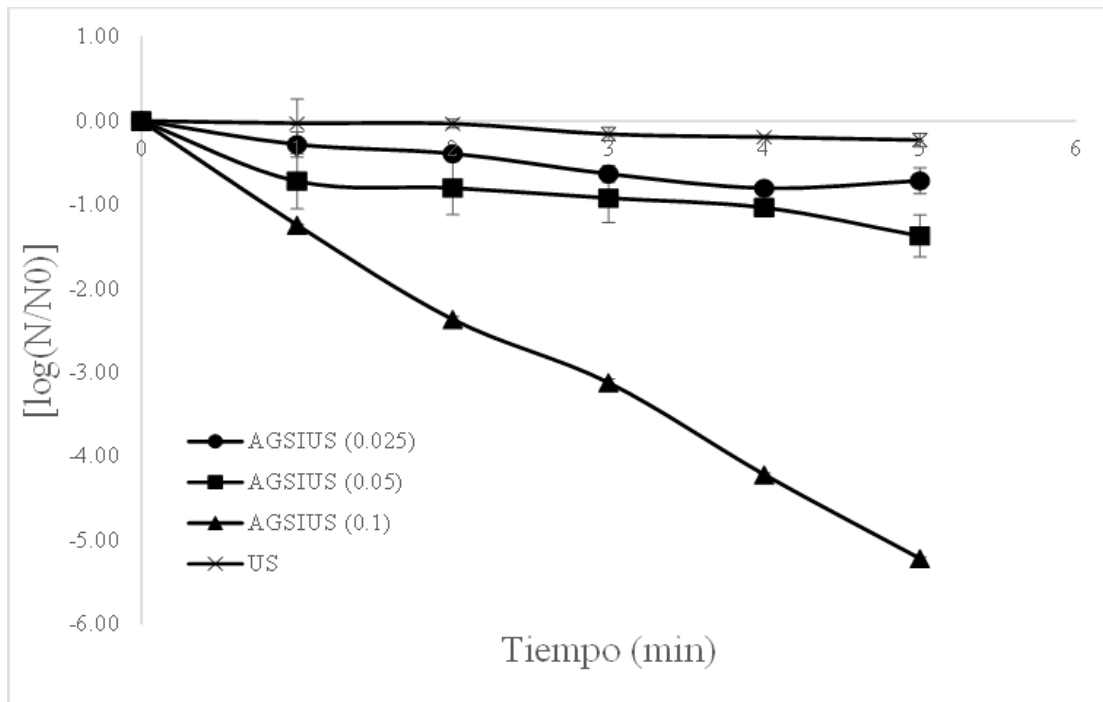


Figura 12. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto combinado del ácido gálico sin irradiar + ultrasonido (AGSIUS) a concentraciones de 0.025 M, 0.05 M y 0.1 M y el efecto del ultrasonido.

El mecanismo de inactivación por luz UV-C se debe a los cambios inducidos en el ADN de la célula microbiana, una vez que la luz UV-C es absorbida, esta promueve la formación de dímeros de pirimidina que por consiguiente se genera mutagénesis y muerte celular (Hernando-Avenidaño, 2023). En la Figura 13 se observa el comportamiento de la luz UV-C en contacto con *Salmonella Typhimurium* esta exposición logra reducir >6 log, esto comparado con lo obtenido utilizando ultrasonido es una respuesta más favorable. Esto se debe a que en la solución acuosa que se irradia solo está presente la bacteria, entonces cuando el sistema es irradiado los rayos logran atravesar por un fenómeno denominado transmitancia, esto se define como la capacidad que tiene el agua para dejar pasar la luz (Rossel-Bernedo, 2020), en este caso deja pasar la luz UV-C y ésta penetra la pared celular y es absorbida produciendo así daños en el ADN del microorganismo, dejándolo inhabilitado para reproducirse llevándolo a la muerte celular. En cambio, cuando se combina con ácido gálico, disminuye la transmitancia por ciertos componentes orgánicos, así como sólidos suspendidos, pudiendo reducir su efectividad de 100% (sin interferentes) a 75%- 95% (con

interferente) (Rossel-Bernedo, 2020). Este fenómeno se puede asociar con lo que se observa en la Figura 13 ya que se observa una mejor respuesta de inhibición que en el caso de la luz UV-C aplicada de manera independiente que cuando se aplica en combinación con AG, en esta figura también se puede observar, como incrementa la potencia de inhibición a medida que transcurre el tiempo y cuando se combina con el uso del AG a las 3 diferentes concentraciones, se logra observar una relación favorable a la reducción en ciclos logarítmicos con relación al aumento de concentración y tiempo de contacto transcurrido.

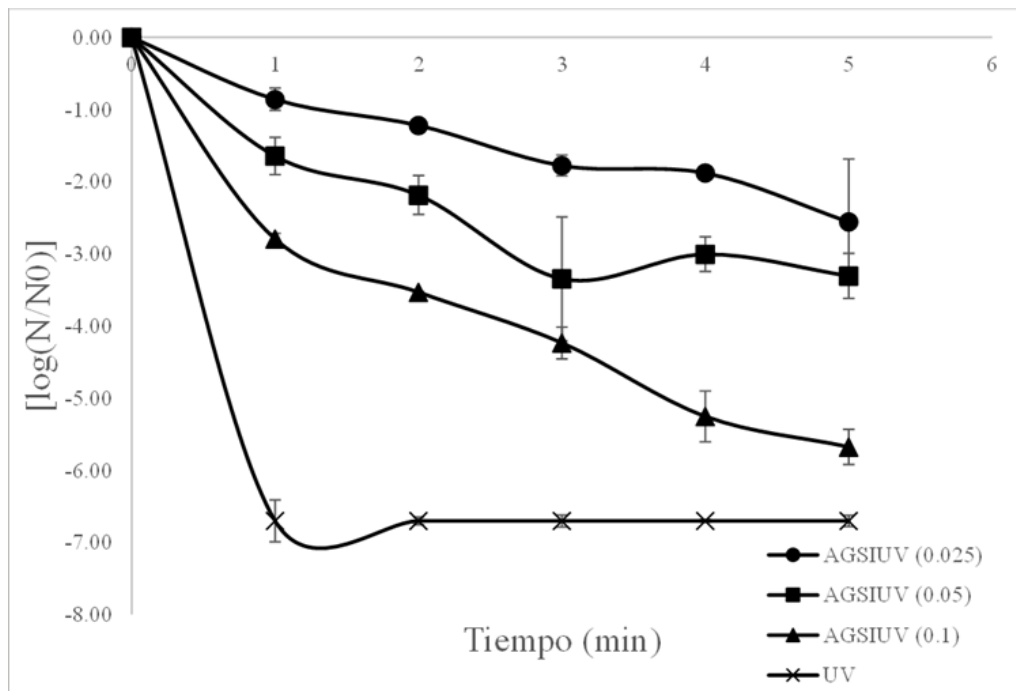


Figura 13. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto combinado del ácido gálico sin irradiar + ultravioleta (AGSIUV) a concentraciones de 0.025 M, 0.05 M y 0.1 M y el efecto de la luz ultravioleta (UV).

El efecto de diferentes agentes antimicrobianos aplicados a una población depende de varios factores, como lo es el tipo de agente, la intensidad y para este caso como se potencializan si se utilizan de manera combinada, hasta este momento se ha venido explicando cómo funcionan las metodologías de manera individual y cómo actúan de manera combinada, se ha explicado que cada metodología tendrá interferentes que pueden potencializar o contrarrestar en efecto a la otra. De este modo se evaluó el efecto de la combinación de los 3 métodos de manera no simultánea como se describe a continuación; el AG irradiado (AGI), AGI más el uso de ultrasonido (AGIUS) y el AGI más la aplicación de luz UV-C (AGIUV). El efecto de la combinación de las metodologías

se estudiará sobre una misma concentración para conocer cómo influye la combinación de los métodos para cada caso y no la dependencia en función a la cantidad de ROS producida por el AG. En la Figura 14 podemos corroborar lo visto en la Figura 13, la aplicación de luz UV-C tiene mayor efecto inhibitorio sobre *Salmonella Typhimurium*, cuando se utiliza el AG irradiado, ya que se esta favoreciendo de esta manera que aumente la producción de ROS y radicales libres que interfieren con la reproducción bacteriana.

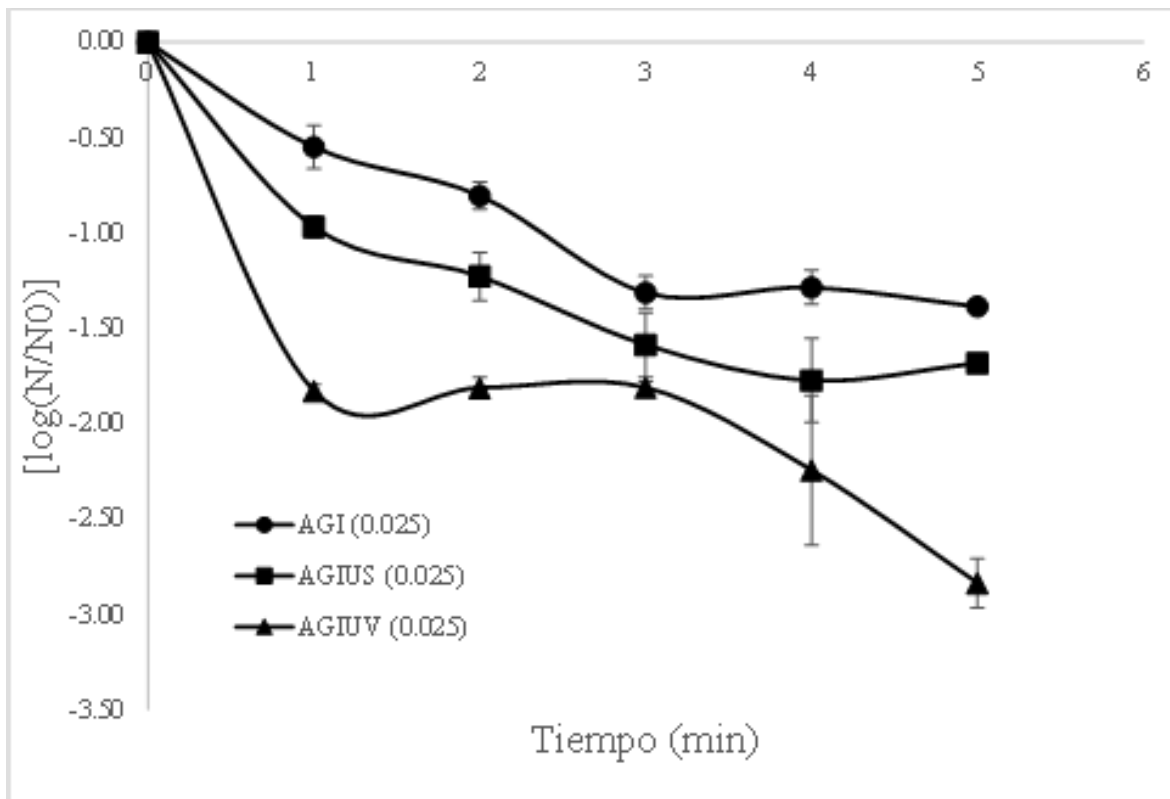


Figura 14. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto combinado del ácido gálico irradiado (AGI), AGI + ultrasonido (AGIUS) y AGI+ ultravioleta (AGIUV) a concentraciones de 0.025 M.

En la Figura 15 podemos observar que cuando se aumenta la concentración a 0.05M, se puede ver como el AGI tiene un mejor comportamiento ya que logra una reducción >1 log, debido a la relación aumento de concentración- aumento en el efecto inhibitorio (Cerón-Carrillo et al. 2014), en cambio en el caso del AGIUS se observa el fenómeno descrito por Gonzales-Limón (2016), quien explica que el efecto del AG disminuye porque se está utilizando para formar especies reactivas de oxígeno durante el tratamiento de US, de este modo no se ve favorecido el efecto del US ni el efecto del fenol.

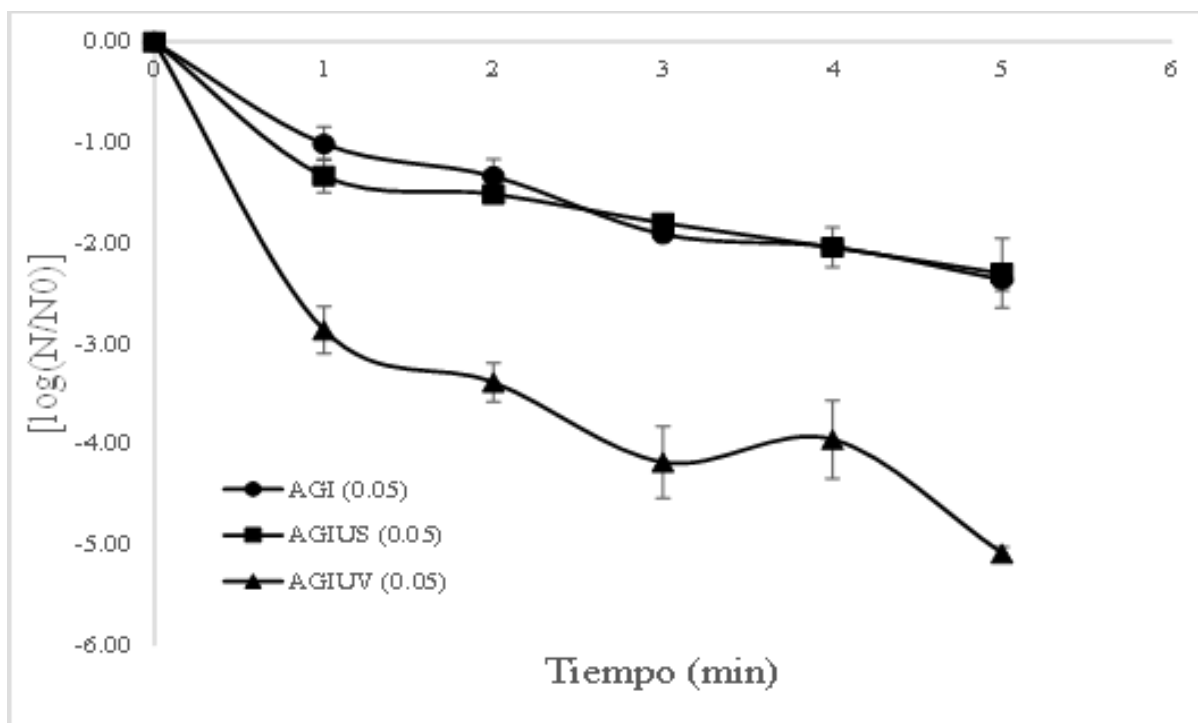


Figura 15. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto combinado del ácido gálico irradiado (AGI), AGI + ultrasonido (AGIUS) y AGI+ ultravioleta (AGIUV) a concentraciones de 0.05 M.

En la Figura 16 se observa el efecto de inactivación microbiana favorecida por el aumento en la concentración, ya que el AGI logra una reducción de >4 log, de este modo, cuando se aumentó la concentración de AGI favoreció la cantidad de ROS generados y cuando se combinó con US se logró una reducción >5 log, a pesar de que no hay mucho respaldo bibliográfico se infiere que, cuando aumento la cantidad de fenoles se favoreció la cantidad para producir radicales libres y de esta manera afectar la estabilidad bacteriana en el sistema. Para el caso del efecto combinado de AGI más el uso de luz UV-C, este tiene un mejor comportamiento antimicrobiano, ya que interpretamos de lo obtenido que, la luz UV-C fue capaz de generar más ROS y radicales libres que lograron una disminución mayor en todos los casos, de igual manera se favoreció con el incremento en la cantidad de fenol a la que fue expuesta, es decir de manera dependiente, entre mayor fue la concentración, mayor efecto bactericida se obtuvo gracias al daño provocado en la pared celular y su falta de viabilidad para que la bacteria pudiera reproducirse.

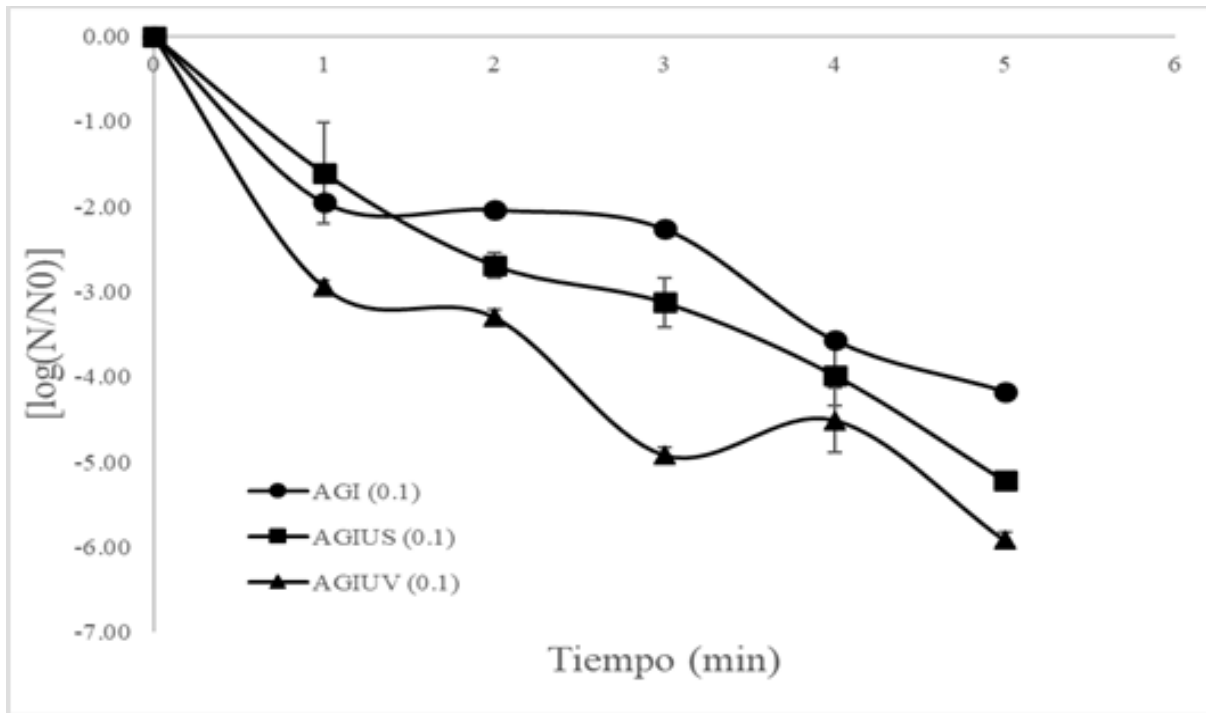


Figura 16. Cinética de muerte de *Salmonella Typhimurium* por efecto combinado del ácido gálico irradiado (AGI), AGI + ultrasonido (AGIUS) y AGI+ ultravioleta (AGIUV) a concentraciones de 0.01 M.

8. Conclusiones

- La irradiación del ácido gálico con luz UV-C promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual incrementa el poder antimicrobiano de este.
- La inactivación microbiana del ácido gálico es dependiente de la concentración utilizada, a mayor concentración, mayor inactivación.
- La luz UV-C tiene la capacidad de atravesar un medio acuoso y penetrar sin dificultad la pared bacteriana, dicha capacidad se ve afectada cuando en el medio hay partículas de ácido gálico suspendidas.
- Combinar ácido gálico irradiado con ultrasonido y luz UV-C incrementa la inactivación microbiana en comparación con el ácido gálico sin irradiar.
- La combinación del ácido gálico irradiado con luz UV-C presenta mayor inactivación microbiana en comparación con el ácido gálico irradiado combinado con ultrasonido.

9. Recomendaciones

- Evaluar el efecto del ácido gálico irradiado en alimentos acuosos comerciales, para estudiar como afectarían nuevos interferentes como la colorimetría de la solución, saborizantes y conservadores.
- Evaluar el efecto del ácido gálico irradiado en alimentos sólidos, para exponer cuanta efectividad tienen las metodologías solas y combinadas y así abrir el campo de aplicación a más alimentos.
- Evaluar el efecto de la aplicación de ácido gálico sobre las características sensoriales y nutrimentales de los alimentos.

10.Referencias

- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2023). Resumen de compuestos de PubChem para CID 689043, ácido cafeico. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-Acid>
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2023). Resumen de compuestos de PubChem para CID 445858, ácido ferúlico. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>
- Cerón Carrillo, Munguía Pérez, Silvia García, Santiesteban López. (2014). Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (capsicum). *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 1(2). 2-8. https://www.researchgate.net/profile/Tere-Ceron/publication/273320012_Actividad_antimicrobiana_de_extractos_de_diferentes_especies_de_chile_capsicum/links/54fe30920cf2741b69ef9d1a/Actividad-antimicrobiana-de-extractos-de-diferentes-especies-de-chile-capsicum.pdf
- Chaveste Ledezma, S. (2006). Uso de ultrasonido como técnica alternativa en la desinfección de vegetales. Tesis de maestría. Tecnológico de Monterrey. <https://repositorio.tec.mx/ortec/handle/11285/567515>
- Cheng, J.-H., Lv, X., Pan, Y. y Sun, D.-W. (2020). Respuestas al estrés bacteriano transmitido por los alimentos especies reactivas de oxígeno (ROS) exógenas inducidas por tratamientos con plasma frío. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos*, 103, 239–247.
- Cossu, A., Ercan, D., Wang, Q., Peer, WA., Nitin N., Tikekar, R. (2016). Antimicrobial effect of synergistic interaction between UV-A light and gallic acid against *Escherichia coli* O157:H7 in fresh produce wash water and biofilm, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 37.44-52, ISSN 1466-8564, [https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.020.\(https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856416301527\)](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.020.(https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856416301527))
- Domínguez L., Parzanese M., (2012) Concepto y descripción de la técnica de UV. <http://avibert.blogspot.com/2012/10/concepto-y-descripcion-de-la-tecnica-uv.html>

- García Carillo, M. (2020). Evaluación de la efectividad del uso de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) asistido por temperatura moderada en la preservación de jugos turbios. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires en el área de Química Industrial. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6799_GarciaCarrillo.pdf
- González Limón M. (2016) Aplicación de ultrasonido de potencia, luz visible y ultravioleta en hojas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) y su efecto sobre actividad y concentración de compuestos antioxidantes. Tesis de maestría. BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
- González Pedraza, J., Pereira Sanandres, N., Soto Varela, Z., Hernández Aguirre, E., & Villarreal Camacho, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella spp.* y herramientas moleculares para su detección. *Revista Salud Uninorte*, 30(1), 73-94. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522014000100009&lng=en&tlng=es.](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522014000100009&lng=en&tlng=es)
- Govea Salas, M., Zugasti Cruz, A., Silva Belmares, Y.M., Valdivia Urdiales, B., Rodríguez Herrera, R., Aguilar González, C.N., Morlett Chávez, J. (2013). Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, Volumen 5, No 9, pp 5-9.
- Hernando Avendaño, CA. (2023). Evaluación del efecto de la luz UV-C y del antimicrobiano natural vainillina sobre la calidad microbiológica de bebidas proteicas. <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/195765/Evaluacion-del-efecto-de-la-luz-uv-c-y-del-antimicrobiano-natural-vainillina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Leistner, L. (1992). Food Preservation by Combined Methods. *Food Research International*. Volume 25. Issue 2,1992. Pages 151-158. ISSN 0963-9969. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90158-2](https://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90158-2)
- Leistner, L., Gould, GW. (2002). El concepto de obstáculo. En: *Hurdle Technologies. Serie Ingeniería de Alimentos*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0743-7_2

- Luna-Domínguez, R.A., Hernández-Carranza, P., Ávila-Sosa, R., Valadez-Blanco, R., Ruiz-López, I.I., Ochoa Velasco, C.E. (2023). Enhancing gallic acid antimicrobial activity against *Escherichia coli* by ultraviolet-C light irradiation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Volume 86. ISSN 1466-8564. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103378>
- Martín, V. (2019). Rediseño y evaluación de un equipo de radiación ultravioleta de onda corta para alimentos de origen vegetal. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Cuyo. https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/13929/tesis-brom.-matin-vanesa-2019.pdf
- Medina Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa Andrews, H., Sánchez Contrera, Á., y Neith Pacheco. (2017). "Extracción asistida por ultrasonido para la recuperación de compuestos fenólicos de fuentes vegetales" *Agronomy* 7, No. 3, 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
- Millán Villarroel, D., Romero González, L., Brito, M., Ramos-Villarroel, A. Y. (2015). Luz ultravioleta: inactivación microbiana en frutas SABER. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, vol. 27, No.3, pp. 454-469 Universidad de Oriente Cumaná, Venezuela.
- Niño Herrera, S. A., Iliná A., Chávez González, M. L., Martínez Hernández, J. L., Aguilar González C. N., Rodríguez Herrera, R., Flores García, M., Govea Salas, M. (28 octubre 2020). *Efecto del ácido gálico y resveratrol sobre el crecimiento de microorganismos probióticos y bacterias patógenas*. *CienciAcierta*.
<http://www.cienciacierta.uadec.mx/2020/07/03/efecto-del-acido-galico-y-resveratrol-sobre-el-crecimiento-de-microorganismos-probioticos-y-bacterias-patogenas/>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *salmonella* en alimentos

- Olivas Aguirre F.J., Wall-Medrano A., González-Aguilar G., López-Díaz J., Emilio Álvarez-Parrilla E. (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. <https://scielo.isciii.es/pdf/nh/v31n1/05revision05.pdf>
- Peralta Pérez, Arely. (2019). Aplicación de métodos combinados para aumentar la vida útil del jugo de naranja. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/618e5a5b-228d-4510-ad17-ea3f4116e57b/content>
- Pineda Muñoz, C. F., Medina Moreno, S. A., Téllez Jurado, A., Ramírez Vargas, M., Villanueva Ibáñez, M. Lucho Constantino, C. A., Trejo Aguilar, G. M. y Jiménez González, A. (2017). Ultrasonificación de baja frecuencia aplicada a la producción biológica de hidrógeno. Universidad Politécnica de Pachuca. Ciencias Biológicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca.
- QUÍMICA.NET. (2020). Estructura química del ácido gálico. Recuperada de <https://quimicafacil.net/compuesto-de-la-semana/acido-galico/>
- QUIMIPUR. (2018). Ácido gálico. <https://quimipur.com/pdf/acido-galico.pdf>
- Reactivos Meyer. (2015). Ácido gálico. https://reactivosmeyer.com.mx/datos/pdf/reactivos/hds_0160.pdf
- Robles Ozuna, L., Ochoa Martínez, L. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. <https://www.redalyc.org/pdf/813/81325441002.pdf>
- Rodríguez Mey L., Ruíz Flores N., Sangoi Ferreira D., Milena Guerrero A., Ciangherotti C., Bermúdez J., Israel A., Bor M. (2023). Efecto comparativo de la actividad antioxidante del Ácido Gálico y diferentes Alquilgalatos. http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff/article/view/26847/144814492719
- Rodríguez Vaquero., Alberto B., Manca de Nadra. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. ELSEVIER. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.08.010
- Rossel Bernedo, L.J., Rossel Bernedo, L.A., Ferro M., Ferro Gonzales, A.L., & Zapana Quispe, R.R. (2020). Radiación ultravioleta-c para desinfección bacteriana (coliformes totales y

