



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

TESIS PROFESIONAL

“Inhibición de *Escherichia coli* por medio de aceite esencial de *Salvia officinalis* extraído por hidrodestilación y aplicado en fase de vapor en hojas de espinacas baby (*Spinacia oleracea* L.)”

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ZAIRA SAMARA VARGAS SOSA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN JOSÉ LUNA GUEVARA

CODIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA LORENA LUNA GUEVARA

H. Puebla de Z. a 04 de marzo de 2024

AGRADECIMIENTOS

Estoy muy agradecida del esfuerzo de este trabajo, la dedicación y tiempo me han hecho aprender mucho y desarrollarme como profesionista.

Le doy gracias a Dios y a la virgen, por bendecirme en el camino y darme la fortaleza de afrontar los retos de la vida y que cada uno de ellos me ha llevado por un camino de sabiduría y resiliencia.

Estoy muy agradecida con mi familia, mi madre Zaira M. Sosa Ortega y mi hermano Luis Armando Vargas Sosa. Soy muy afortunada de tenerlos en mi vida, su apoyo incondicional y desinteresado han hecho que aprecie el amor que me tienen, y que esperan que yo triunfe en todo lo que me proponga en la vida. Sin el apoyo de ellos yo no estaría en este camino. Los amo mucho.

A mi director de tesis Dr. Juan José Luna Guevara y codirectora de tesis Dra. Lorena Luna Guevara, que además de profesores y guías a lo largo de la carrera, han sido un gran apoyo en la realización de esta gran investigación, les agradezco las veces que tenía que interrumpir su tiempo para resolver mis dudas, y que, debido a eso, esta investigación tuvo grandes resultados. Les agradezco que hayan puesto su confianza en mí.

A mis sinodales MES. Madai Gizeh Sánchez Arzubide y M.I.Q. Montserrat González Limon por aceptar ser parte de este proyecto y por su ayuda y consejos brindados durante la elaboración de esta tesis. Gracias por su tiempo brindado.

A mis amigas de laboratorio Mariana Aguirre, Martha Ramos, Leydi Jaimes y Xochitl Luna por esas platicas, risas, consejos, salidas infinitas que hicieron que el trabajo experimental de esta tesis se hiciera más agradable. Las quiero mucho y agradezco su ayuda y consejos en base a su experiencia.

A mi amigo Sergio Eloa, por igual echarme porras y brindarme su ayuda siempre que lo necesite, eres el mejor, agradezco tu amistad a pesar de que nos vemos muy poco. A mis amigas Liss Gamboa y Samantha Cortés que formaron parte de las risas de mi camino a lo largo de la carrera.

A cada una de las personitas involucradas en este proyecto que me guiaron, ayudaron e hicieron que esto caminara, a Janeth Gasca por sus consejos y darme detalles sobre este tema y también por su amistad. A Héctor Moctezuma y a Alexia López por ayudarme en la parte experimental de manera significativa y por también todas esas risas y locuras que compartimos durante su estancia. Gracias, amigos.

Finalmente, a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Facultad de Ingeniería Química por haberme brindado tantas oportunidades donde me fortaleció y enriqueció en conocimiento.

Índice

Resumen.....	1
I.Introducción	3
II.Planteamiento del problema	6
III.Justificación	8
IV.Objetivos	10
IV.I Objetivo general.....	10
IV.II Objetivos específicos.....	10
V.Hipótesis	10
CAPITULO 1: Antecedentes	11
1.1 Importancia y beneficios del consumo de vegetales de hojas verdes.....	11
1.2 Origen de la Espinaca.....	12
1.3 Propiedades nutricionales de la espinaca.....	14
1.4 Extractos vegetales.....	16
1.5 <i>Salvia Officinalis</i>	17
1.6 Extracción por arrastre de vapor.....	18
1.7 Generalidades del arrastre de vapor.....	18
1.8 Microorganismos patógenos causantes de ETAs en vegetales frescos.....	19
CAPITULO 2: Metodología.....	21
VI.Materiales y Métodos.....	21
7.1 Etapa 1: Secado de la planta <i>Salvia officinalis</i>	22
7.1.1 Material vegetal.....	22
7.1.2 Proceso de secado	22
7.2 Etapa 2: Destilación y obtención del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i>	23
7.2.1 Solventes y Reactivos	23
7.2.2 Proceso de destilación	24
7.3 Etapa 3: Análisis microbiológico e impregnación en fase de vapor del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> en espinacas crudas	25
7.3.1 Cepa bacteriana.....	25
7.3.2 Preparación del inóculo.....	25
7.3.3 Acondicionamiento de las espinacas y evaluación del comportamiento de <i>E coli</i> inoculado en hojas de espinaca “baby”. .	27

7.3.4 Recuento bacteriano	28
7.3.5 Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial aplicado en fase de vapor	29
7.4 Etapa 4: Evaluación sensorial.....	30
7.5 Análisis estadístico	30
CAPITULO 3: Resultados y discusión	31
1. Secado de la planta <i>Salvia officinalis</i>	32
2. Destilación y obtención del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i>	33
3. Análisis microbiológico e impregnación en fase de vapor del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> en hojas de espinacas baby	34
3.1 Fase de vapor	35
3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente al tiempo del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> frente a <i>E. coli</i> en fase de vapor a temperatura ambiente.	36
3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente al tiempo del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> frente a <i>E. coli</i> en fase de vapor a temperatura de refrigeración.	38
3.4 Comparación de los tres tratamientos en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> frente a <i>E. coli</i> en fase de vapor a temperatura ambiente.	42
3.5 Comparación de los tres tratamientos en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> frente a <i>E. coli</i> en fase de vapor a temperatura de refrigeración.	43
3.6 Compuestos bioactivos del aceite esencial de <i>S. officinalis</i> y su acción bactericida.....	44
4. Evaluación sensorial	46
VII.Conclusiones	49
VIII.Recomendaciones	50
IX.Referencias Bibliográficas	51
X.ANEXOS	60
Anexo 1. Evaluación sensorial	60
Anexo 2. Encuesta de la población a estudiar para la evaluación sensorial	61

Índice de Tablas

Tabla 1. Aporte nutricional	15
Tabla 2. Grupos funcionales presentes en <i>Salvia officinalis</i>	17
Tabla 3. Bacterias patógenas comúnmente encontradas en hortalizas de hojas verdes	19
Tabla 4. Etapas de acondicionamiento de la espinaca	28
Tabla 5. Puntaje asignado al atributo de la escala hedónica	30
Tabla 5. Recuentos y reducciones logarítmicas de las tres concentraciones a temperatura ambiente	42
Tabla 6. Recuentos y reducciones logarítmicas de las 3 diferentes concentraciones a temperatura de refrigeración	43

Índice de Figuras

Figura 1. Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i> L.)	13
Figura 2. a) Elíptica ancha, b) Oval ancha, c) Oval, d) Triangular	13
Figura 3. Espinaca baby	15
Figura 4. Diagrama de proceso dividida en 5 etapas.	21
Figura 5. Recepción de materia prima	22
Figura 6. Secado y acondicionamiento de la <i>Salvia officinalis</i>	22
Figura 7. Proceso de secado de <i>Salvia officinalis</i>	23
Figura 8. Hidrodestilación	24
Figura 9. Cepa e inoculación de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	25
Figura 10. Diluciones seriadas y extensión en superficie en placa de agar EMB26	
Figura 11. Espinacas marca “Vegeta Listos” pesadas, desinfectadas, enjuagadas y centrifugadas	27
Figura 12. Agitación de la muestra en Stomacker y recuento bacteriano del tiempo 028	
Figura 13. a) Cámara con efecto de la fase de vapor y b) conteo en placa de colonias	29
Figura 14. Materia vegetal seca	32
Figura 15. Destilación de aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i>	33
Figura 16. Aceite esencial resultante	34

Figura 17. Recuentos bacterianos de las 3 concentraciones a temperatura ambiente en Log ₁₀ UFC/mL	37
Figura 18. Recuento bacteriano del día 3 en temperatura ambiente. a) PC, b) 500 ppm, c) 1000 ppm	38
Figura 19. Recuentos bacterianos de las 3 concentraciones a temperatura de refrigeración en Log ₁₀ UFC/mL	39
Figura 20. Recuento bacteriano del día 3 en temperatura de refrigeración. d) PC, e) 500 ppm, f) 1000 ppm.....	41
Figura 21. Prueba hedónica de 5 puntos para un total de 30 panelistas	46
Figura 22. Panelistas durante la evaluación sensorial.....	47

Resumen

En la actualidad ha surgido la necesidad de buscar alternativas de conservación en seguridad alimentaria. Los aceites esenciales son una alternativa de antimicrobianos naturales que prometen resultados favorables en la desinfección de vegetales frescos en contra de diversas bacterias patógenas y hongos. En esta investigación se demuestra la eficacia del aceite esencial de Salvia (*S. officinalis*) en contra de la bacteria de *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI) en una matriz alimentaria como las hojas de espinacas baby, donde se utilizaron concentraciones de 500 ppm y 1000 ppm por el método de fase de vapor; esta es una técnica que implica colocar el microorganismo y el aceite por separado en un ambiente controlado. Los resultados presentaron diferencias significativas en las dos temperaturas en estudio, siendo el tratamiento más eficaz el de 1000 ppm con la temperatura de refrigeración teniendo recuentos parcialmente completos. También se demostró que la temperatura juega un papel importante ya que pueden fluctuar los recuentos y por tanto la eficacia en el tratamiento. De igual manera, se realizó una evaluación sensorial para estudiar los cambios en los atributos de sabor, olor, color y apariencia (frescura) donde los cuatro atributos mostraron aceptación por encima del promedio de la escala hedónica de 5 puntos, destacando al mejor umbral el color con un puntaje de 4.167 en nivel de preferencia de “me gusta moderadamente”.

Abstract

Nowadays, the need has arisen to look for conservation alternatives in food safety. Essential oils are an alternative to natural antimicrobials that promise profitable results in the fresh vegetables disinfection against several pathogenic bacteria and fungus. This research demonstrates the effectiveness of Salvia (*S. officinalis*) essential oil against *Escherichia coli* enteroinvasive (ECEI) bacteria in a food-matrix such as baby spinach leaves, where concentrations of 500 ppm and 1000 ppm were used by the steam phase method, this is a technique that involves setting the microorganism and the oil separately in a controlled environment. The study revealed results with significant differences in the two temperatures, with the most effective treatment being 1000 ppm in refrigeration temperature having partially complete counts. It demonstrated that temperature plays an important role too as the re-counts can fluctuate and therefore the effectiveness of the treatment. Likewise, a sensory evaluation was implemented to study the changes in the flavour attributes, smell, colour, and appearance (freshness) where the four attributes showed acceptance above the average of the 5-point hedonic scale, with colour standing out at the best threshold with a score of 4.167 in the preference level of “I like it moderately”.

I. Introducción

Las frutas y verduras aportan una gran cantidad de vitaminas y minerales. Por su naturaleza, agregan diversos sabores y texturas, además, dentro de una dieta son clave para mantener una alimentación saludable. Sin embargo, la población mexicana no consume suficientes frutas y verduras. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda consumir por lo menos 400 g diarios para obtener sus beneficios nutricionales (OMS, 2019).

En este sentido, los vegetales son una parte importante dentro de la dieta del ser humano ya que aportan muchos nutrientes, especialmente micronutrientes como lo son las vitaminas A, C, las del complejo B, E y K y minerales como el potasio, calcio, hierro, magnesio, sodio, entre otros (Roca, 2020); también incluyen macromoléculas como carbohidratos, proteínas, lípidos y fibras. Los vegetales de hojas verdes, en ocasiones, se ven afectadas por contaminación de patógenos durante su cosecha o manejo inadecuado, esto se debe a que los microorganismos se pueden adherir a la superficie de las hojas e incluso penetrarlas (CDC, 2022). Si el consumidor llegase a consumirlas de manera cruda o sin antes desinfectarlas cocinarlas podría enfermarse y presentar una enfermedad transmitida por un alimento (ETA) o una intoxicación alimentaria. Se estima que las enfermedades transmitidas por los alimentos afectan a la salud de 600 millones de personas y causan 420,000 muertes cada año en todo el mundo (OMS, 2015).

Dada la preocupación por la contaminación de estos vegetales y debido a que los consumidores podrían eliminarlos de su dieta y disminuir su consumo diario, las características de los vegetales frescos en su naturaleza perecedera justifican que se preste especial atención durante sus condiciones de producción y de manejo postcosecha ante cualquier posibilidad de contaminación. La tecnología e innovación ha procurado comercializar verduras de hojas verdes pre lavadas industrialmente como productos listos para su consumo o en sus siglas en inglés “Ready to Eat” (RTE), esto para un consumo y una preparación segura.

Las espinacas *Spinacia oleracea* L. es un vegetal de color verde oscuro, tiene un alto contenido de vitaminas, carotenoides, ácidos orgánicos y componentes minerales alcalinos, así como antioxidantes; su contenido en proteínas también es alto (Lisiewska et al, 2011). Como cultivo posee ciertas ventajas, entre las que destacan su rápido desarrollo (logrado a veces en 60 a 90 días) pero su tolerancia climática resulta ser débil ante las heladas.

A nivel mundial la producción de espinaca es de alrededor de 14 millones de toneladas, posicionándose China como el primer productor destacando con un aporte de 24,484,507 de toneladas, seguido de Estados Unidos de América (E.U.A.) con 323,620 toneladas y en tercer lugar se encuentra Japón con 248,000 toneladas. A nivel Latinoamérica se encuentran posicionados de la siguiente forma: en primer lugar, México con 41,967 en producción de espinacas por toneladas, seguido de Perú con 28,535 toneladas y Colombia con 8,118 toneladas. (Atlas Big, 2018-2020)

Tan solo en México los estados con mayor superficie cosechada de espinacas son: Guanajuato con 12,256 toneladas, seguido de Puebla con 11,695 toneladas y Baja California con 10,895 toneladas. (Axayacatl, 2022)

A lo largo de la cadena productiva de estos productos, que inicia en el campo hasta su consumo deben de existir estándares de inocuidad y de calidad que avalen el consumo seguro de los productos. Sin embargo, las características de inocuidad son los aspectos más complicados de detectar ya que pueden pasar desapercibidos hasta que el alimento sea consumido y cause problemas de salud inmediatamente, como la intoxicación alimentaria por la bacteria *Escherichia coli* u otras bacterias asociadas a las verduras de hoja verde como: *norovirus*, *Salmonella*, *Listeria* y *Cyclospora*. (CDC,2022)

Los agentes antimicrobianos químicos como sustancias cloradas, plata coloidal, u otras sustancias conocidas como desinfectantes, han causado controversias por su empleo en los alimentos, ya que, a pesar de tener una amplia efectividad de eliminar bacterias como *Listeria*, *Salmonella* o *Cólera* (Revista del consumidor, 2001). Estas pueden causar intoxicaciones graves o efectos secundarios sobre la salud humana debido a la sobredosificación con altas concentraciones o tiempos de exposición

prolongados en alimentos ya que son productos químicos que no son aptos para el consumo. Por otro lado, algunas investigaciones se han centrado en compuestos biológicamente activos extraídos de plantas para combatir microorganismos patógenos, disminuyendo así el uso de desinfectantes de origen sintético (Essawi & Srour, 2000).

En la presente investigación se pretende conocer un método de inhibición de microorganismos por agentes naturales provenientes de aceites esenciales de la planta *Salvia officinalis* y comprobar su eficacia ante la contaminación causada por la bacteria *Escherichia coli* en hojas de espinacas baby (*Spinacia oleracea* L.).

II. Planteamiento del problema

El estilo de vida acelerado de los seres humanos ha provocado que el tema de la alimentación ya no sea considerado como una prioridad, y por ello cada día se le dedica menos tiempo; esto se refleja en los hábitos que integran con más frecuencia el consumo de la comida rápida y de fácil acceso.

Sin embargo, como sector informal de la economía alimentaria, los alimentos de venta callejera a menudo pasan inadvertidos a las inspecciones y controles formales. Por lo tanto, pueden transformarse en el origen de problemas de inocuidad alimentaria y también pueden contribuir al deterioro de la higiene ambiental (FAO, 2023).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAS) son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por diversos microorganismos o sustancias químicas que penetran al organismo a través de diferentes fuentes como los son el agua o los alimentos contaminados (OMS, 2020).

Las frutas y verduras frescas y mínimamente procesados son susceptibles a la contaminación por microorganismos incluidas las bacterias patógenas tales como, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, entre otras, las cuales causan severos daños a la salud humana y a la economía de los países en donde se detectan. (Cortés Higareda et al, 2021)

La sintomatología de las enfermedades bacterianas en la salud humana es extremadamente variada, pero generalmente característica para un patógeno en particular. Se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas (1 de cada 10 habitantes) por ingerir alimentos contaminados y que 420 000 mueren por esta misma causa (OMS, 2020).

Asimismo, los alimentos contaminados por bacterias pueden infectarse de diversas formas, por ejemplo, algunos vegetales pueden tener una infección pasiva, es decir accidental. Las bacterias pueden entrar a la planta a través de aberturas naturales tales como estomas, hidatodos o lenticelas y también por heridas en hojas, tallos o raíces, o ser introducidas por ciertos insectos fitófagos (Vidaver, & Lambrecht, 2004).

La mayoría de las bacterias pueden formar biopelículas en la superficie del hospedero lo que permite su sobrevivencia a pesar del método de control. Las condiciones de nutrición de las plantas pueden favorecer al mecanismo de defensa en contra de las bacterias invasivas (Cortés Higareda et al, 2021).

En la actualidad, se utilizan métodos preventivos para el control de las bacterias patógenas, los cuales se basan en métodos químicos como los compuestos clorados y de oxígeno activo. Sin embargo, el uso de sustancias químicas puede provocar intoxicaciones agudas o enfermedades de larga duración, como el cáncer (OMS, 2020).

Otros métodos preventivos son aquellos denominados métodos físicos como la irradiación ultravioleta y algunos que aún se encuentran bajo investigación son la aplicación del quitosano y aceites esenciales. (Cortés Higareda et al, 2021)

En este sentido, se propone la investigación de alternativas más naturales de desinfección provenientes de plantas para evaluar la actividad antimicrobiana mediante extractos esenciales y que contribuyan a la inocuidad del producto, sean seguros y sin afectar sus cualidades sensoriales.

III. Justificación

El ritmo de vida es cada vez más acelerado y complejo, los horarios para comer se vuelven reducidos, los integrantes de familia comen cada vez menos en el hogar, sus rutinas sorpresivamente van contra reloj sin darse cuenta. Por lo anterior, las personas buscan alimentarse de la forma más cómoda posible, ya sea de manera rápida, saludable, sencilla y sin problemas que conlleven el transportar sus alimentos.

Si bien las crecientes tendencias globales de los consumidores por disponer de alimentos saludables como una opción de comida rápida pero que estos mismos sean fáciles de adquirir, les ahorre tiempo y sean de fácil acceso, determinan pautas de consumo de alimentos listos para su consumo (RTE); la necesidad de mantener una dieta rica en frutas y vegetales han hecho que aumente el consumo de frutas y verduras listas para su consumo. Directamente del envase a la mesa. Sin embargo, los vegetales de hojas verdes que a menudo se comen crudas pueden ser susceptibles a la contaminación por bacterias patógenas a lo largo de la cadena de producción y pueden verse afectadas e implicadas en brotes alimenticios.

De acuerdo con Uhlig et al., 2022, los vegetales de hojas verdes listos para su consumo a menudo son empaquetados con atmosferas modificadas que contienen una mezcla de 0.5-3% oxígeno, 5-15% CO₂ y el resto de N₂, con el fin de suprimir la oxidación y prolongar la vida útil del producto como una estrategia económica beneficiosa. No obstante, algunos de los microorganismos patógenos, pueden multiplicarse en este entorno. Los recuentos de *E. coli* en productos de hojas verdes dependen de las prácticas postcosecha, entre otros factores (Uhlig et al., 2022; De Giusti et al., 2014).

En este sentido, el uso de sustancias antimicrobianas sintetizadas químicamente ha demostrado en numerosos estudios que son de vital cuidado cuando se habla de su manejo.

En cuanto a la búsqueda de desinfectantes que prometan un efecto similar de desinfección en verduras, pero que estas provengan de fuentes naturales, se han

llevado a cabo estudios de agentes antimicrobianos de origen vegetal, como sustitutos de los que son tradicionalmente utilizados.

Algunos antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias. La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos o aceites esenciales (Beuchat y Golden, 1989; Nychas, 1995). De ahí la importancia de estudiar el efecto bactericida de la planta *Salvia officinalis* como alternativa de desinfección en vegetales frescos, como alternativa inocua y amigable con el medio ambiente

IV. Objetivos

IV.I Objetivo general

- ✓ Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre *Escherichia coli* en hojas de espinacas frescas aplicando el método de fase de vapor

IV.II Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos naturales obtenidos mediante destilación por arrastre de vapor, aplicados por fase de vapor en concentraciones de 0, 500 y 1000 ppm sobre *E. coli* en espinacas frescas.
- ✓ Determinar la influencia de la concentración, temperatura, y tiempo de almacenamiento sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Salvia officinalis* aplicado en fase de vapor sobre *E. coli* en espinacas frescas.
- ✓ Evaluar sensorialmente las espinacas frescas impregnadas con el aceite esencial en fase de vapor en concentraciones de 0, 500 y 1000 ppm.

V. Hipótesis

1. alguna de las 2 concentraciones de aceite esencial de *Salvia officinalis* aplicada en fase de vapor presenta una actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* en hojas de espinacas frescas.
2. Ninguna de ambas concentraciones de aceite esencial de *Salvia officinalis* aplicadas en fase de vapor presenta una actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* en hojas de espinacas frescas.

CAPITULO 1: Antecedentes

1.1 Importancia y beneficios del consumo de vegetales de hojas verdes

La importancia del consumo de hortalizas de hojas verdes se debe a su contenido en compuestos fitoquímicos que son difíciles de obtener en otras fuentes de alimentos. Estos compuestos químicos son producidos por las plantas de manera natural durante su desarrollo y crecimiento, asimismo, juegan un papel importante en la defensa contra patógenos o depredadores. Los fitoquímicos describen los compuestos de las plantas y los beneficios sobre los efectos en la salud, además aportan cualidades sensoriales.

Es importante destacar que estos vegetales son bajos en calorías, bajos en grasas, contienen proteínas, fibra, hierro, magnesio, calcio, vitamina A y C, ácido fólico; son también una buena fuente de antioxidantes que ayudan a disminuir los efectos del envejecimiento celular, reducen los riesgos de cáncer, fortalecen el sistema inmunológico, previenen enfermedades cardiovasculares, por lo que su ingesta es fundamental para una salud óptima y la prevención de enfermedades (Caballero, 2013).

Estos compuestos se crean durante la fotosíntesis donde las hojas verdes crean un proceso químico mediante el cual se producen la clorofila, estas utilizan la luz del sol y el dióxido de carbono para formar alimentos y liberar oxígeno. Las hojas verdes son el mejor ejemplo de la ley natural de dar oxígeno y recibir dióxido de carbono aprovechando la luz solar, para beneficio del medio ambiente.

Por lo anterior, las plantas de hojas verdes cumplen la labor más importante para la vida en el planeta, elaboran alimentos, forman sustancias orgánicas a partir de sustancias inorgánicas, son el origen de los carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales que se necesitan para la realización de las funciones vitales (Caballero, 2013) en el ser humano. Su ingesta al día puede aportar la cantidad adecuada de macro y micronutrientes que favorece al metabolismo para crear los suficientes procesos físicos y químicos en el cuerpo para convertirlo en energía. Las verduras en general son una parte importante de una dieta saludable.

Si bien, las conductas alimentarias son complejas y están conformadas por una mezcla de factores físicos, biológicos, psicológicos, históricos y culturales (FAO, 2021) que hacen que la ingesta repercuta en el conocimiento de los beneficios que las verduras traen consigo. Muchos de los factores emergen de la disponibilidad de tiempo, dinero, condiciones climatológicas, la educación, la cultura, la falta de conocimiento de los productos, política, marketing y sobre todo la inocuidad alimentaria.

La inocuidad alimentaria a diferencia de muchos alimentos procesados, las frutas y verduras deben lavarse o pelarse y quizás cocinarse antes de poder comerlas. Comer frutas y verduras contaminadas puede causar una enfermedad transmitida por un alimento. La contaminación puede producirse durante la producción a partir del agua de riego, el suelo, los fertilizantes o los plaguicidas o provenir de un procesamiento o preparaciones antihigiénicas (FAO, 2021).

Es necesario adoptar medidas a nivel nacional para aumentar la producción y el consumo de frutas y verduras y hacerlas más asequibles para los consumidores, generando al mismo tiempo beneficios económicos, sociales y ambientales en consonancia con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (FAO, 2021).

1.2 Origen de la Espinaca

Según el diccionario etimológico (Anders, 2022) la palabra espinaca pareciera que tiene que ver con el vocablo latino *spina* (astilla o espina). La planta no posee espinas puesto que su nombre tuvo su origen en Persia, uno de sus lugares de origen, donde se le nombraba como *aspanach* y luego pasó al árabe con el nombre *isfinaj* que fue adoptado por el latín vulgar como **Spinacia** (Jiménez et al., 2010).

La espinaca fue introducida en Europa alrededor del año 1.000 d. C. procedente de regiones asiáticas, probablemente de Persia, pero únicamente a partir del siglo XVIII comenzó a difundirse por Europa y se establecieron cultivos para su explotación, principalmente en Holanda, Inglaterra y Francia; posteriormente se cultivó después en otros países y más tarde pasó a América (Jiménez et al., 2010).

La planta pertenece a la familia amarantáceos y la especie se denomina *Spinacia oleracea* L. siendo un vegetal bastante dócil, se puede plantar durante todo el año, pero la mejor época es entre febrero y marzo. Su crecimiento hortícola en primera fase forma una roseta de hojas de duración variable según condiciones climáticas y posteriormente emite el tallo el cual dan lugar a ramificaciones secundarias, en las que pueden desarrollarse flores. El órgano de consumo de esta hortaliza lo constituyen sus hojas (Serrano, 1997).

Figura 1. Espinaca (*Spinacia oleracea* L.)



Fuente: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2016)

Existen diversas formas para clasificar y determinar los cultivares de espinacas, ya sea en función de las hojas, mismas que son de color verde oscuro: hojas lisas y de hojas crespas (savoy), la forma desde la sección longitudinal deberá observarse en las hojas centrales (UPOV, 2006).



Figura 2. a) Elíptica ancha, b) Oval ancha, c) Oval, d) Triangular

Fuente: UPOV (2006).

Marhuenda y García (como se citó en Gasca, 2021) El tiempo de crecimiento varía en función de la ubicación geográfica y el periodo del año, su cosecha oscila entre 4 a 9 semanas para la espinaca baby (Figura 3), donde se buscan hojas que tengan de 9 a

12 centímetros y para la espinaca adulta va de las 6 a las 15 semanas con hojas de 15 a 20 centímetros (Gasca, 2021).

1.3 Propiedades nutricionales de la espinaca

La espinaca por su aporte nutricional contiene vitamina K que participa en la formación de la protrombina, proteína necesaria en la coagulación de la sangre, vitamina E y C también las contiene, aporta hierro que es el constituyente esencial de la hemoglobina y mioglobina, forma parte de algunos procesos enzimáticos y es importante en el transporte de oxígeno. Otro nutriente importante que contiene la espinaca es el ácido fólico, vitamina hidrosoluble que cumple una función importante en el desarrollo del material genético, participación en la producción de células y reparación de músculos. Este aporte a la salud, a través de la dieta, es tal vez la propiedad nutraceutica más importante de la espinaca (Jiménez, 2010).

Los aportes en fibra proporcionan un suave efecto laxante que mejora el estreñimiento y colabora en la reducción del colesterol. Para mejorar la salud ocular, las espinacas pueden ser incluso más efectivas que las zanahorias, ya que contiene una gran cantidad de vitamina A (Caballero, 2013).

También es una fuente importante de micronutrientes como los flavonoides como la quercetina, miricetina, espinacetina, luteína, jaceídina, patuletina, epóxido de luteína, neoxantina, ácido glucurónico 3,5,7,30, 4'pentahidroxi-6-metoxiflavona, feofitina b, neoluteína, fenoles como los polifenoles, ejemplo de uno es el ácido paracumárico, el ortocumárico y ácido ferúlico y carotenoides como la luteína, violaxantina y β caroteno. Adicionalmente actúa como cofactor de enzimas que participan en la síntesis de colágeno, carnitina y neurotransmisores; ayuda a la estimulación del sistema inmune (Gasca, 2021).

La composición de minerales de la espinaca es determinada por la estación, y condiciones de cultivo. Del mismo modo contiene minerales como el nitrógeno, potasio, calcio, magnesio, cobre, zinc y manganeso (Tabla 1).

Figura 3. Espinaca baby



Fuente: Lewin (2014)

Tabla 1. Aporte nutricional

Hojas de espinacas crudas (100 g)	
Calorías	22 kcal
Proteína	2,9 g
Grasa	0,4 g
Carbohidratos	3,4 g
Fibra	3,2 g
Fósforo	49 mg
Calcio	94 mg
Hierro	2,7 mg
Sodio	79 mg
Potasio	558 mg
Magnesio	79 mg
Zinc	0,53 mg
Cobre	0,13 mg
Manganeso	0,90 mg
Vitamina A	6715 UI
Tiamina	0,08 mg
Niacina	0,7 mg
Ácido pantoténico	0,07 mg
Vitamina B6	0,20 mg
Ácido fólico	194 mg
Ácido ascórbico	28 mg

Fuente: Jiménez (2010).

La humedad en la espinaca puede deteriorar a la hoja, es recomendable consumirla fresca, si se llega a almacenar en refrigeradores esta de preferencia que se mantenga en una bolsa resellable con suficiente espacio y libre de la posibilidad de que se aplaste o maltrate con otros alimentos. No hay que lavarla antes de guardarla, sino

más bien, justo antes de consumirla, ya que, el exceso de agua puede hacer que se marchite o pudra.

1.4 Extractos vegetales

Actualmente, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados como son las frutas y verduras frescas y frescas cortadas envasadas bajo diferentes atmósferas y refrigeradas, está aumentando el interés por los antimicrobianos de origen natural que puedan extraerse para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y la seguridad para el consumidor (Blanchard, 2000).

Los antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias. Los más difíciles de extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin que este afecte la calidad sensorial y seguridad (Beuchat y Golden, 1989). La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos o aceites esenciales.

Los antimicrobianos pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo:

- Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- Daño a la integridad de las membranas.
- Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos (Rodríguez, 2011).

El modo de acción de estos compuestos fenólicos no ha sido determinado, éstos pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético y se ha observado que las grasas, proteínas, concentraciones de sal, pH y temperatura afecta la actividad antimicrobiana de estos compuestos. Los componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que ésta puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo

de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas (Rodríguez, 2011)

1.5 *Salvia Officinalis*

Las plantas del género *Salvia*, con cerca de 900 especies han sido utilizadas en fitopreparaciones y productos alimenticios en todo el mundo. La especie más popular, *Salvia officinalis* se ha empleado de manera extensiva en la preparación de alimentos como agente preservante y como especia, en la industria cosmética, como protector de la radiación UV (Piccaglia 1998).

El aceite esencial de *S. officinalis* demostró un amplio espectro de inhibición microbiana sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Los aceites esenciales generalmente son una mezcla de compuestos que consisten principalmente en hidrocarburos monoterpénicos que son una clase de sustancias química principalmente grupos funcionales que se hallan en los aceites esenciales de plantas aromáticas y son los principales componentes con mayor actividad antimicrobiana. En la *S. officinalis* ha sido reconocida y se ha atribuido a la presencia de compuestos fenólicos, como el 1,8-cineol, tujona y canfor, en concentraciones que pueden variar de acuerdo con condiciones ecológicas y estacionales. Además, se ha demostrado que los compuestos minoritarios pueden tener un efecto sinérgico de gran importancia Tabla 2 (Dorman y Deans, 2000, Tyagi y Malik 2011, Khalil y Li 2011)

Tabla 2. Grupos funcionales presentes en *Salvia officinalis*

Compuesto	Grupo funcional	Ejemplo	Propiedades
Cetona	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}^1 - \text{C} - \text{R}^2 \end{array}$	Alcanfor, tujona	Mucolítico regenerador celular, neurotóxico
Éteres	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \quad \\ \text{R} \quad \text{R}' \end{array}$	Cineol	Expectorante, estimulante

Fuente: Merino (2011).

Muchos investigadores han evaluado la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *S. officinalis* frente a numerosos microorganismos involucrados en alteraciones o con enfermedades transmitidas por alimentos. (Hayouni et al., 2008)

advirtieron actividad antibacterial de estos aceites esenciales contra *Salmonella spp.* en muestras de carne. Y *E. coli* por presencia de material fecal proveniente de etapas precosecha y postcosecha.

1.6 Extracción por arrastre de vapor

La extracción o destilación con arrastre con vapor es una técnica de laboratorio empleada ampliamente para la obtención y purificación de compuestos. Es un tipo de destilación simple; con la principal diferencia de que en el matraz de destilación se utiliza vapor de agua junto con el material que se va a destilar por aparte, donde por medio de los vapores generados por parte de nuestro solvente se arrastraran hacia la materia seca y provocara el desprendimiento de sus sustancias volátiles, mismas que se conducirán hacia un serpentín refrigerante para separar las fases acuosas de la oleosa, estas reposan para separar sus fases y poder sacar el aceite mejor llamado aceite esencial.

1.7 Generalidades del arrastre de vapor

El agua es uno de los solventes por excelencia, que se ha usado desde los inicios del método. Uno de los primeros intentos de extraer la esencia de las plantas fue poner en contacto estas con agua caliente, pero la dificultad de separar después los materiales hizo que se buscaran nuevas alternativas (Armijo C. J. et al, 2012).

Posteriormente se ideo colocar las plantas en un recipiente superior para que el vapor formado en la parte inferior lo atravesase y posteriormente fuese condensado en un serpentín, así surgió el alambique para extracciones de aromas y esencias. Con la revolución industrial, la necesidad de producir extractos en proporciones más grandes que los métodos artesanales pudieran alcanzar hizo que estos métodos fueran adaptados a la escala industrial con buenos resultados. Así que del alambique se pasó a un extractor donde se coloca el material vegetal y se pone en contacto con el vapor generado en un calderín anexo o una caldera, para después llevar ese vapor a un condensador, y recogido en un tanque de decantación, donde saldrían el aceite esencial y el agua (hidrolato) por aparte (Armijo C. J. et al, 2012).

La extracción funciona gracias a que, cuando el vapor entra en contacto con el material vegetal, hace que los compuestos aromáticos se vaporicen y sean arrastrados junto con el vapor hasta el condensador, donde se condensan junto con el vapor de agua. También la temperatura del vapor hace que las células y las estructuras vegetales se rompan y liberen más compuestos esenciales (Molina, 2009).

1.8 Microorganismos patógenos causantes de ETAs en vegetales frescos

Miles de tipos de bacterias se introducen en los alimentos, pueden ocasionar enfermedades transmitidas por los alimentos. Cada año ocurren millones de casos de estas enfermedades. La mayoría de dichos casos pueden prevenirse, otras son tratadas en centros de salud y se reportan como casos de estudios para prevenir la propagación de la bacteria y encontrar la cura de la misma. (USDA, 2008)

A continuación, se mostrarán los microorganismos patógenos presentes en vegetales frescos (Tabla 3)

Tabla 3. Bacterias patógenas comúnmente encontradas en hortalizas de hojas verdes

Vegetal	Bacteria patógena
Espinaca	<i>E. coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Yersinia enterocolítica</i> , <i>Aeromonas ssp.</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i>
Lechuga	<i>E. coli</i> , <i>Shigella ssp.</i> , <i>Salmonella ssp.</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Cyclospora ssp.</i>
Cilantro	<i>E. coli</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Perejil	<i>E. coli</i> , <i>S aureus</i> y <i>aeromonas</i>
Albahaca	<i>Salmonella ssp.</i> Y <i>Cyclospora ssp.</i>

Fuente: Elviss et al. (2009); Xanthopoulos et al. (2010); Elhariry (2011); Cerón et al. (2015); Gómez et al., (2015); Rodríguez et al., (2015); Mayton et al., (2018); Luna et al., (2019); Azimirad et al., (2021) como se citó en Gasca, (2021).

Las bacterias patógenas representan el principal peligro microbiológico para este tipo de vegetales frescos y más aún que estas bacterias presentan multiresistencia a antibióticos (Iwu et al., 2019).

Cuando se determina un posible brote, los funcionarios de salud pública encuentran algo en común que vincula las enfermedades entre sí, como comer la misma comida, tener contacto con el mismo tipo de animal, comprar en la misma tienda de comestibles o asistir al mismo evento. La realización de pruebas de patógenos y rastreo sirve para identificar el origen de un brote posteriormente se informa al público y a la industria sobre las acciones que pueden prevenir a estas enfermedades y se puedan controlar. (CDC, 2022)

CAPITULO 2: Metodología

VI. Materiales y Métodos

El plan de trabajo utilizado sobre la investigación se muestra en la **Figura 4**:

Figura 4. Diagrama de proceso dividida en 5 etapas.



La metodología realizada constó de 5 etapas, la etapa 1: secado de la planta vegetal *Salvia officinalis*, la etapa 2: extracción del agente antimicrobiano, la etapa 3: evaluación microbiológica de las espinacas inoculadas con *E. coli* y la impregnación del agente antimicrobiano en diferentes concentraciones por el método de fase de vapor, la etapa 4: evaluación sensorial por medio de una escala hedónica de 5 puntos, y la etapa 5: análisis de varianza (ANOVA). Todas estas etapas se describen a continuación:

7.1 Etapa 1: Secado de la planta *Salvia officinalis*

7.1.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado fue obtenido de un proveedor de *Salvia officinalis* que cumpliera con los requisitos de clasificación y género de la planta, el agricultor produce Salvia de manera orgánica en la zona de Atlixco, Puebla (Figura 5). Posteriormente fue seleccionada y separada en hojas y tallos, verificando que no existiera daño físico y microbiológico aparente.

Figura 5. Recepción de materia prima



7.1.2 Proceso de secado

En la Figura 6 se ilustra lo que se realizó para la primera etapa.

Figura 6. Secado y acondicionamiento de la *Salvia officinalis*



Para el secado de la Salvia, y después del acondicionamiento de la planta que se describe en la sección de material vegetal, se lleva a un primer pesado para determinar el peso de la materia fresca. Posteriormente, se introducen a una estufa de secado, donde de acuerdo con Muñoz, (1996) el rango de temperaturas utilizado para el secado

de la mayoría de las materias vegetales es de 30 a 40°C; si se utilizan temperaturas superiores se corre el riesgo de que los vegetales comiencen a perder sus propiedades bioactivas. De este modo, se determinó utilizar la temperatura de 37°C por un lapso de 48 horas (Figura 7)

Finalmente, cuando la *Salvia officinalis* estuvo seca, se retiró y se colocó en un desecador durante 20 minutos. Igualmente se determinó el peso final para conocer su rendimiento (Formula 1), y el % de humedad (Formula 2). Finalmente se obtiene la planta acondicionada para la segunda etapa misma que será almacenada en bolsas de papel y colocadas dentro de una bolsa oscura para evitar la exposición a la luz.

Rendimiento del secado = Peso de la materia fresca – Peso de la materia seca (Formula 1)

$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso de la charola con salvia fresca} - \text{Peso de la charola con salvia seca}}{\text{Peso de la charola con salvia fresca} - \text{Peso de la charola}}$ (Formula 2)

Figura 7. Proceso de secado de *Salvia officinalis*



7.2 Etapa 2: Destilación y obtención del aceite esencial de *Salvia officinalis*

7.2.1 Solventes y Reactivos

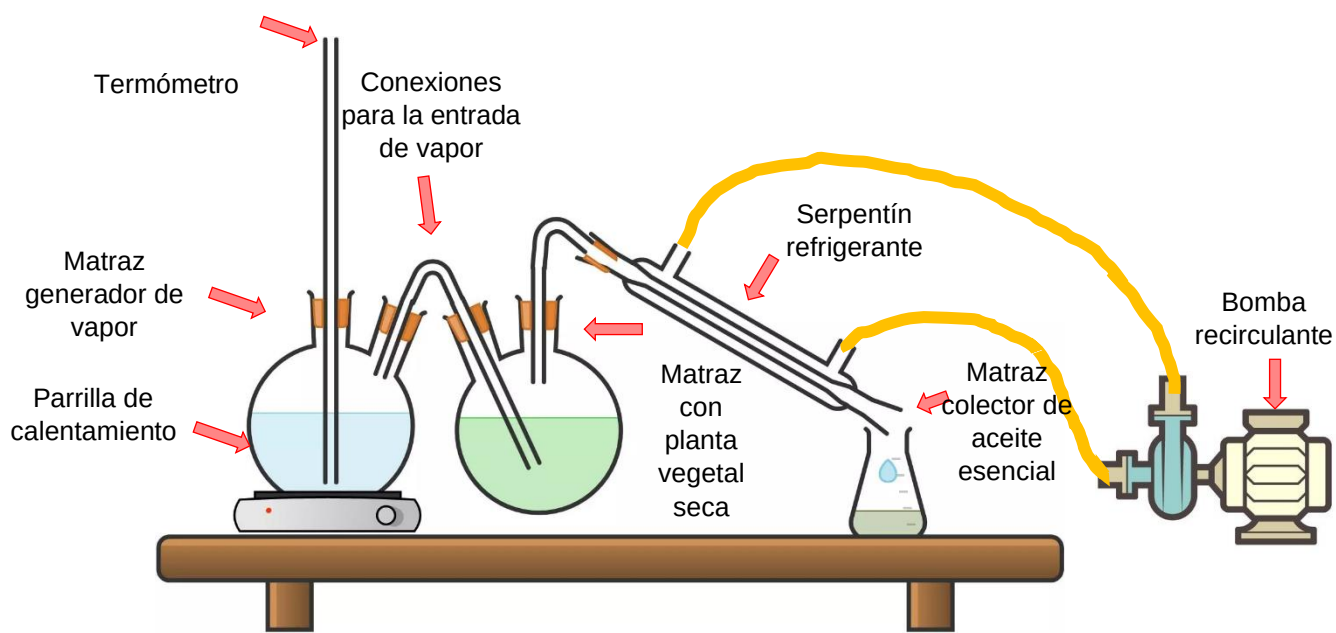
El solvente para la extracción del aceite esencial grado alimenticio fue agua destilada, y el refrigerante fue de marca BARDAHL Anticongelante 50/50.

7.2.2 Proceso de destilación

Se pesaron 100 gramos de hojas y tallos de *Salvia officinalis* seca, y se introdujeron en un matraz de destilación de un equipo marca GRAHAM DESCHEM modelo 2L HT. Durante la hidrodestilación (Figura 8) conforme se genera vapor saturado, este entra en contacto con la hierba, la calienta de tal forma que va liberando el aceite esencial, a su vez se desprende la fase líquida y oleosa contenida en ella (Rodríguez Álvarez M. et al, 2012). El aceite esencial resultante se utiliza como agente antimicrobiano. El rendimiento del proceso de destilación depende de la preparación y la humedad de la planta, la manipulación anterior al secado y cortado, de la presión y temperatura del vapor de agua usado para el proceso. El cálculo del rendimiento de aceite esencial obtenido por hidrodestilación se determinó mediante la fórmula 3. Al recuperar el aceite esencial después de la destilación se almacenó en recipientes transparentes, se pusieron a congelación para facilitar la separación del aceite y posteriormente el aceite se almacena en recipientes de vidrio de color topacio.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{vol. del aceite (mL)} * \text{Densidad del aceite} \left(\frac{g}{mL} \right)}{\text{masa de hojas secas (g)}} * 100 \text{ (Formula 3)}$$

Figura 8. Hidrodestilación



Fuente: Figura tomada y creada por Chemix. (2021).

7.3 Etapa 3: Análisis microbiológico e impregnación en fase de vapor del aceite esencial de *Salvia officinalis* en espinacas crudas

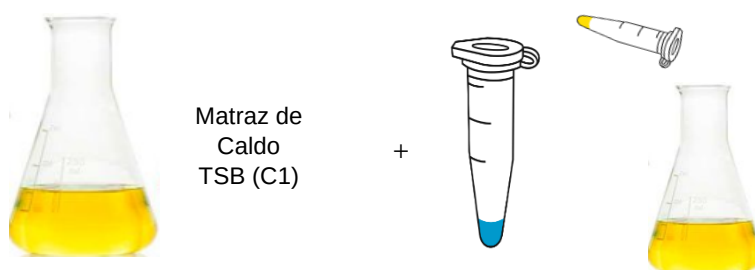
7.3.1 Cepa bacteriana

La cepa bacteriana de *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI) fue obtenida del cepario de la Dra. María Lorena Luna Guevara, Facultad de Ing. Química/BUAP.

7.3.2 Preparación del inoculo

Se hizo crecer la bacteria *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI) en 100 ml de caldo soya tripticaseína (TSB) (Figura 9). Durante el acondicionamiento de la cepa para inoculación se le añade el antibiótico (ácido nalidíxico) al primer caldo TSB, una vez inoculado se incuba a 37°C por 24 horas en una incubadora de agitación orbital modelo INO.4-50 marca AYSPEL APARATOS.

Figura 9. Cepa e inoculación de *Escherichia coli* enteroinvasiva

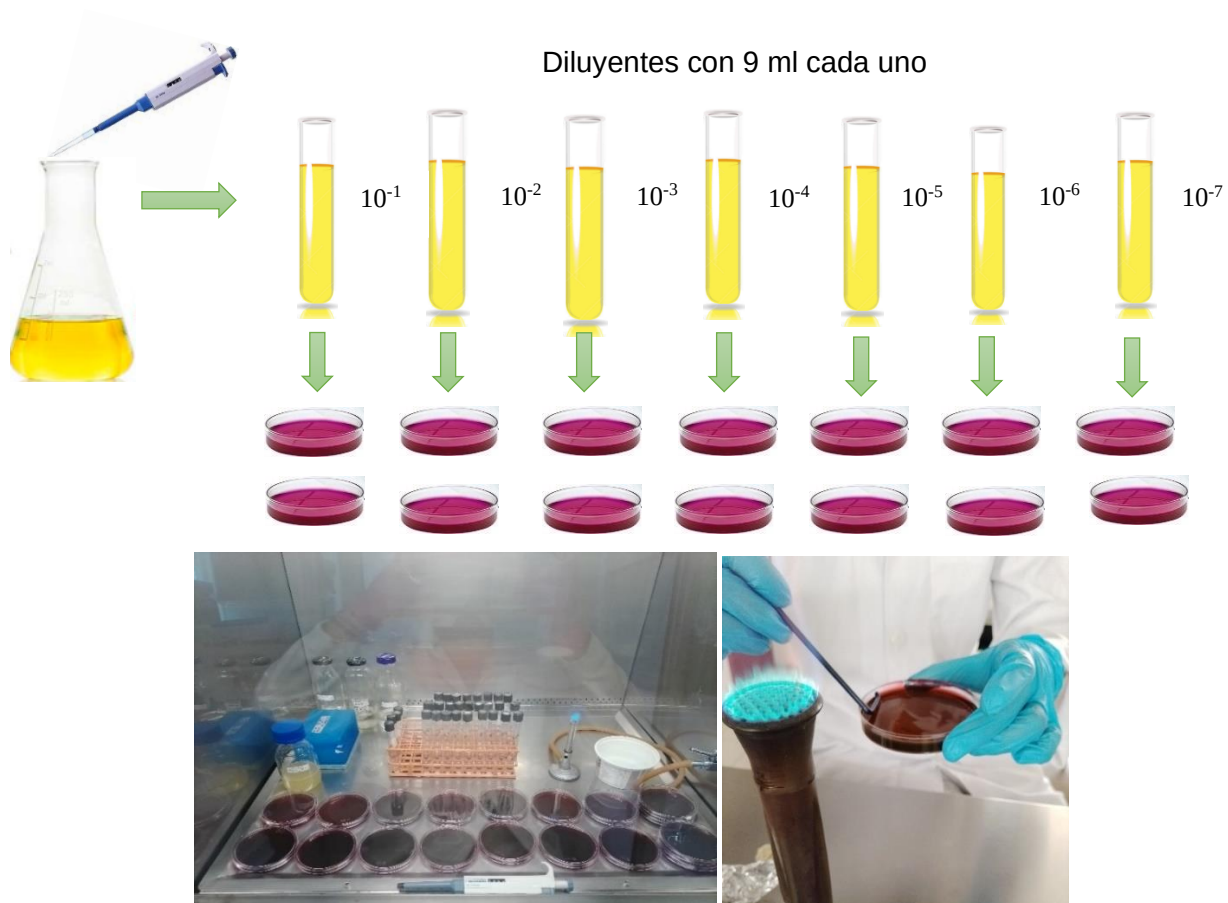


Posteriormente, pasadas las 24 horas en un segundo matraz con caldo soya tripticaseína (TSB), se colocará el inoculo hasta garantizar un crecimiento de 10^7 UFC/mL, esto mediante un ajuste con espectrofotómetro modelo JENWAY 6405 UV/VIS, utilizando una densidad óptica de transmitancia (DO) de 1.1 y una absorbancia

de 620 nm. Finalmente, se incubó a 37°C por 24 horas en incubadora de agitación INO.4-50 marca AYSPEL APARATOS.

Para confirmar la población del microorganismo en estudio se realizan recuentos con 7 diluciones seriadas de peptona de caseína con 9 ml de diluyente en cada tubo y en medio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) mediante el método de extensión en superficie (Figura 10), posteriormente, las placas pasan a incubación por 24 horas en incubadora modelo LUZEREN.

Figura 10. Diluciones seriadas y extensión en superficie en placa de agar EMB



7.3.3 Acondicionamiento de las espinacas y evaluación del comportamiento de *E. coli* inoculado en hojas de espinaca “baby”.

Se tomo la metodología utilizada en Gasca, 2021, que propone: tratamientos de lavado, desinfección, enjuague y centrifugado descrita en la Tabla 4, utilizando espinacas de la marca “vegeta listos” (Figura 11). Se pesan 40 gramos de espinacas, se someten a un pretratamiento de desinfección en una solución de hipoclorito de sodio al 5% (5 mL/1L de agua) durante 15 minutos, se enjuagan con agua destilada, y, posteriormente se le adicionan 4 mL del inóculo que está presente en el segundo matraz de caldo TSB (10^7 UFC/mL) en una bolsa plástica hermética estéril, se agitan vigorosamente durante 1 min y se dejan reposar durante 1 hora a temperatura ambiente ($20-24^{\circ}\text{C}$) y otra a temperatura de refrigeración ($4-6^{\circ}\text{C}$). Por otro lado, 10 gramos de espinacas desinfectadas se sometieron a recuento mediante 3 diluciones seriadas en extensión en placa con Agar EMB para garantizar que no haya presencia de otros microorganismos.

Figura 11. Espinacas marca “Vegeta Listos” pesadas, desinfectadas, enjuagadas y centrifugadas



Fuente: Vegeta listos (2018)

Tabla 4. Etapas de acondicionamiento de la espinaca

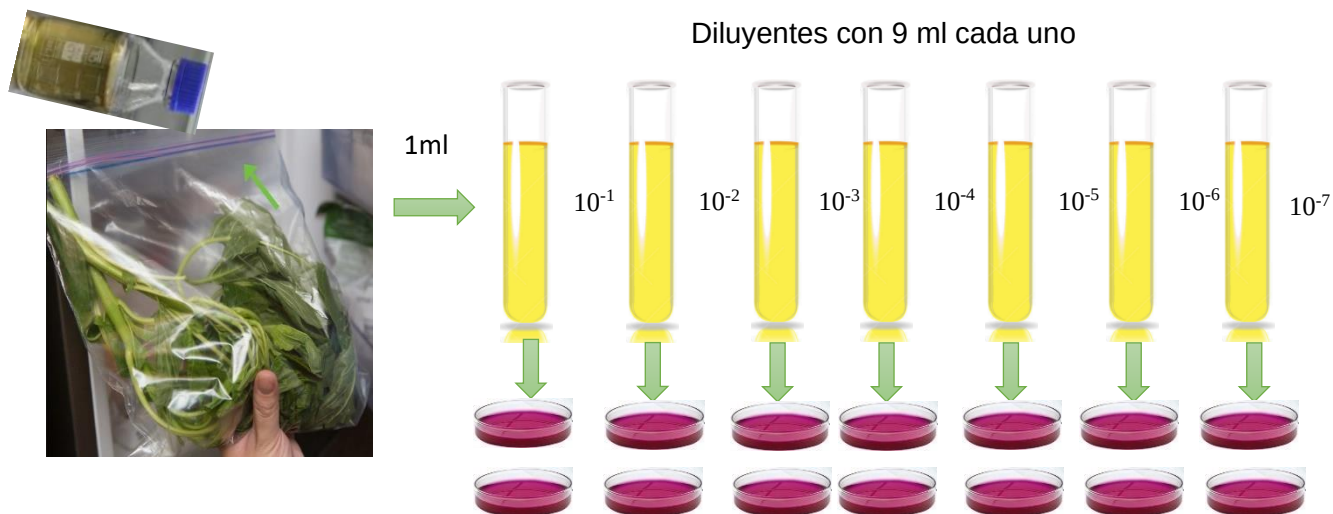
Etapas	Descripción
Desinfección	Inmersión de las hojas de espinaca baby en 1 litro de agua destilada con hipoclorito de sodio al 5% con el fin de reducir la carga microbiana previa.
Enjuague	Eliminación del agente antimicrobiano con agua destilada a chorro.
Centrifugación	Aislamiento de las partículas suspendidas de agua presentes en las hojas de espinacas.
Almacenamiento a temperatura ambiente	Comportamiento cronológico de las hojas de espinacas en condiciones de temperatura ambiente (20-24°C), en tiempos de día 0 (1 hora), 3 días y 7 días.
Almacenamiento a temperatura de refrigeración	Comportamiento cronológico de las hojas de espinacas en condiciones de temperatura de refrigeración (4-6°C), en tiempos de día 0 (1 hora), 3 días y 7 días.

7.3.4 Recuento bacteriano

Posteriormente a la desinfección de las espinacas y de que hayan reposado durante 1 hora a temperatura ambiente (20-24°C) y de refrigeración (4-6°C), se realiza un recuento inicial considerando el tiempo (Día 0). Por lo anterior, se toma de muestra de 10 g y son introducidas en un frasco de 90 mL de agua peptonada, y se lleva al stomacker y se agita el contenido por un minuto (Figura 12), finalmente se realizan una serie de diluciones con extensión en placa de agar EMB, las placas se incuban a 37°C por 24 horas.

Figura 12. Agitación de la muestra en Stomacker y recuento bacteriano del tiempo 0





7.3.5 Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial aplicado en fase de vapor

Las hojas de espinacas se someten a impregnación en fase de vapor con el aceite esencial de *Salvia officinalis* en concentraciones de 0, 500 y 1000 ppm, cada una en temperatura ambiente (20-24°C) y refrigeración (4-6°C) durante 3 y 7 días, el efecto de la impregnación se evalúa en una cámara hermética estéril, introduciendo las hojas de colgadas y en contacto con el agente antimicrobiano (aceite esencial) colocando previamente en una caja Petri abierta (Figura 13.a). Posteriormente, el recuento bacteriano se realiza mediante una serie de diluciones y extensión en placa en superficie con agar EMB. Las placas se incuban por 24 horas en incubadora modelo LUZEREN y se realiza recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), en los tiempos mencionados anteriormente (Figura 13.b).

Figura 13. a) Cámara con efecto de la fase de vapor y b) conteo en placa de colonias



7.4 Etapa 4: Evaluación sensorial

La aplicación de una evaluación sensorial permite determinar el grado de aceptación por parte del consumidor sobre los atributos de impregnación con aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre espinacas crudas. Por ello, se utiliza una prueba hedónica de 5 puntos, misma que determina si existe una diferencia perceptible en el nivel de agrado.

En la siguiente tabla 5 se muestran los puntajes de la escala hedónica de 5 puntos de acuerdo con sus características:

Tabla 5. Puntaje asignado al atributo de la escala hedónica

Puntaje	Característica
5	Me gusta extremadamente
4	Me gusta moderadamente
3	No me gusta ni me disgusta
2	Me disgusta moderadamente
1	Me disgusta extremadamente

Se determinó evaluar el tratamiento con la concentración de 1000 ppm en el tiempo de 7 días a temperatura de refrigeración, debido a que presento la mayor reducción de población bacteriana **Anexo 1**. El panel deberá contestar una encuesta con el fin de conocer el rango de edad entre personas quienes compran productos listos para el consumo y su interés por productos que sean desinfectados de manera natural. En el **Anexo 2**, se muestra la encuesta que define las características de la población a estudiar.

7.5 Análisis estadístico

Los análisis microbiológicos se realizaron para cada dilución por duplicado en cada concentración, los datos a estudiar se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), para determinar si existe diferencia entre las medidas de los tratamientos estudiados con un 95% de confianza y un valor de ($\alpha=0.05$).

CAPITULO 3: Resultados y discusión

Las hortalizas frescas y mínimamente procesadas son susceptibles a la contaminación de diversas bacterias patógenas; en especial aquellas que son de hojas verdes ya que en su mayoría se consumen de manera cruda. Las malas prácticas, como un mal lavado o el uso de agua contaminada puede permitir la presencia de microorganismos patógenos. Sin embargo, un método preventivo de lavado y desinfección puede contribuir a disminuir el riesgo de consumir vegetales contaminados.

Por ello, las tendencias actuales de los consumidores indican su preferencia por alimentos de fácil preparación, de calidad, seguros, y naturales, que estén poco procesados, pero a la vez tengan una mayor vida útil, así como, aquellos alimentos que son listos para su consumo (RTE). Las tecnologías de conservación de alimentos tienen como reto, obtener productos más duraderos sacrificando al mínimo sus características nutricionales y sensoriales iniciales (Del Valle, 2003).

El uso de antimicrobianos es una práctica común en la industria de los alimentos y de los hogares. Por muchos años, se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente; sin embargo, algunos estudios han demostrado que su aplicación puede provocar daños a la salud, si se usan en grandes dosis, llegando a ser tóxicos y provocando el rechazo por parte de los consumidores. Por lo cual, ha surgido la necesidad de alternativas de agentes antimicrobianos de origen natural. En esta búsqueda, se han encontrado resultados muy interesantes para contrarrestar la presencia de bacterias como *Escherichia coli* en hojas de espinacas tipo baby (Gasca, 2021).

Por otro lado, existe la posibilidad de una creciente actividad multirresistente de bacterias tanto Gram positivas y Gram negativas, lo que se traduce en una búsqueda de alternativas en el uso de agentes antimicrobianos naturales como los extractos de *Salvia officinalis*, el cual ha demostrado su efectividad como agente antimicrobiano.

1. Secado de la planta *Salvia officinalis*

El objetivo del secado es estabilizar y conservar a lo largo del tiempo un alimento con las mismas propiedades y composición en principios activos que contiene la planta fresca y evitar su deterioro (Hornok, 1992). El secado forzado empleado ayuda a la pérdida de agua de la planta a través de la evaporización por diferencia de humedad.

La calidad de la planta *Salvia officinalis* inicialmente de manera visual conto con buenas características en cuanto a frescura, color y olor. El aspecto final del material vegetal obtuvo un color verde grisáceo natural (Figura 14). Se emplearon entre 1 y 2 días para el secado dependiendo del tamaño de las hojas en estufa a 37 °C. La manera en la que se separaron el tamaño de las hojas hizo que se tomara en cuenta la delicadeza de la planta durante el tiempo de exposición en el secado.

Figura 14. Materia vegetal seca



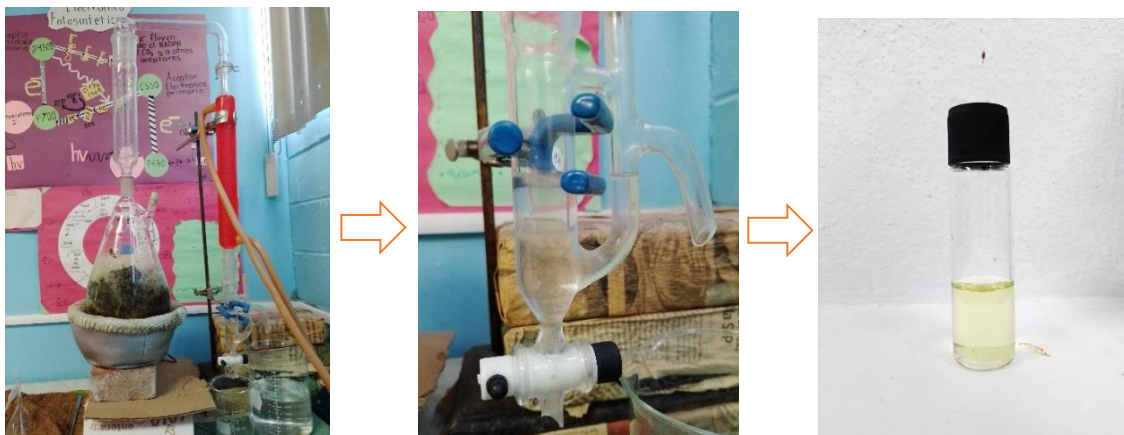
El porcentaje de humedad final se calculó con la fórmula 1. De acuerdo con Hornok, 1992, la humedad máxima de las plantas frescas oscila entre el 60% y el 80%. Asimismo, Merino, 2011 reportó una humedad en *Salvia officinalis* de 69,8%, por lo que, el porcentaje de humedad que se obtuvo en la presente investigación de 69.16% de la planta coincide con la bibliografía reportada, (Hornok, 1992, Merino, 2011).

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(4.1956 - 2.8100)}{(4.1956 - 2.1924)} * 100 = \mathbf{69.16\%} \quad (\text{Fórmula 1})$$

2. Destilación y obtención del aceite esencial de *Salvia officinalis*

En la destilación por arrastre de vapor los componentes volátiles son retenidos por las membranas del material vegetal seco lo que hace necesario un remojo del material, y esto se logra con la condición de vapor saturado (Figura 15). Para obtener la mejor calidad del aceite es necesario asegurar que durante la destilación haya una baja temperatura, o tener altas temperaturas durante el menor tiempo posible o con el fin de evitar pérdidas de aceite esencial por volatilización cuidando la calidad del producto. (Albarracín, 2003, Merino, 2011)

Figura 15. Destilación de aceite esencial de *Salvia officinalis*



Al finalizar el proceso de extracción del aceite, este presentó cualidades fisicoquímicas como: claro, transparente, incoloro y limpio (Figura 16), generalmente, los aceites esenciales son muy susceptibles al daño por agentes como la humedad, la luz, el calor o el aire que pueden afectar sus propiedades químicas.

El rendimiento del aceite esencial depende de la especie vegetal, la época de cosecha, el estado fenológico de la planta, la edad de la planta, las condiciones edáficas y climáticas, y el propio proceso de destilación empleado. El aroma debe ser característico de la planta cultivada. Los aceites esenciales, en general, constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta. (Rodríguez, 2011, Hornok, 1992)

Figura 16. Aceite esencial resultante



Para estudiar la eficiencia de la destilación se calculó el porcentaje de rendimiento. Se obtuvo un volumen de aceite esencial destilado de 0.7 ml en una masa de 100 g de hojas y tallos de *Salvia officinalis* seca, con un volumen de agua purificada de 2 litros en cada destilación; la densidad de la salvia es de 0.910 g/mL.

$$\% \text{ de rendimiento} = 0.637\%$$

De acuerdo con Hernández et al., (2002) el contenido de aceite esencial de *Salvia officinalis* L. debe ser de 1,5% v/m. Sin embargo, de acuerdo con Castrillon et al., (2019) y Hernández, (2019) los aceites esenciales de *Salvia officinalis* obtenidos mediante destilación por arrastre con vapor como método de extracción, alcanzaron un rendimiento del 0.16% y 0.5664% respectivamente, por lo que el rendimiento obtenido en la presente investigación es coincidente con lo reportado por otros autores.

3. Análisis microbiológico e impregnación en fase de vapor del aceite esencial de *Salvia officinalis* en hojas de espinacas baby

La bacteria *Escherichia coli* es uno de los microorganismos más estudiados debido a su incidencia, resistencia ante los antibióticos y en algunos casos debido a su patogenicidad. Es el principal anaerobio facultativo de la flora microbiana que reside en el colon humano. El huésped se coloniza desde el nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y establecen una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida. Asimismo, esta bacteria dentro de sus subgéneros

patogénicos presenta con frecuencia los brotes más comunes como agente etiológico (Rodriguez, 2011, Ministerio de Salud y Protección Social, 2013).

A pesar de la creciente importancia de los productos frescos como vehículo de agentes patógenos humanos, actualmente existe un limitado conocimiento acerca de dónde se produce la contaminación en la cadena de suministros o sobre el mecanismo por el cual los agentes patógenos humanos colonizan y sobreviven en las frutas y verduras. (Michanie, 2003).

Por lo anterior, se hace imprescindible contar con mecanismos efectivos para desinfectar los vegetales, y que sean de fácil acceso tanto para los hogares como para la industria. Una alternativa puede ser la aplicación de aceites esenciales, debido a su modo de acción generado por la presencia de compuestos hidrocarburos e hidrofílicos en sus grupos funcionales. Algunos reportes de investigadores mencionan que los compuestos en los aceites esenciales saturan los sitios de acción en la membrana celular produciendo un daño grave, provocando que se colapse la membrana y de lugar a la muerte de la bacteria (Raibaudi, et, al., 2006).

En esta investigación se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de salvia (*S. officinalis*) frente a la bacteria *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI) por el método de fase de vapor en concentraciones de 0, 500 y 1000 ppm en temperatura ambiente y refrigeración.

3.1 Fase de vapor

La técnica de fase de vapor es una alternativa cuando los aceites esenciales y los microorganismos se colocan por separado en algún ambiente sellado, por lo tanto, la inhibición microbiana se logra a distancia sin contacto directo del agente antimicrobiano con el alimento. Pocos estudios han sido publicados sobre la inhibición de microorganismos por la fase de vapor generada con aceites esenciales. Y se debe resaltar que, no existen artículos que reporten la inhibición de *E. coli*, utilizando aceite esencial de salvia (*Salvia officinalis*) por el método de fase de vapor y aplicado en una matriz alimentaria. (Avila-Sosa et al., 2012, Velázquez, et al 2013).

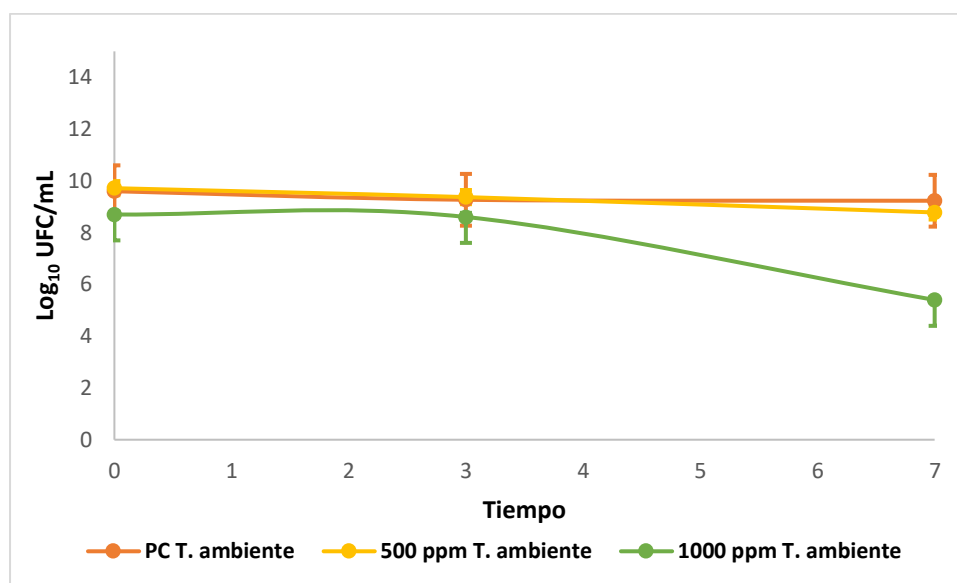
Sin embargo, la aplicación directa de aceites esenciales en alimentos podría ocasionar un impacto sensorial negativo, provocado por la alteración de los umbrales aceptables de sabor y/u olor que característicamente tienen por naturaleza los alimentos. Velázquez, et al (2013) señala que, para reducir este impacto sensorial de los aceites esenciales, se puede optar por el uso de ellos en fase de vapor. (Velázquez, et al 2013).

3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente al tiempo del aceite esencial de *S. officinalis* frente a *E. coli* en fase de vapor a temperatura ambiente.

En la Figura 17 se muestran los valores representados de los recuentos bacterianos obtenidos por duplicado para las concentraciones de 0, 500 y 1000 ppm aplicadas en fase de vapor a temperatura ambiente (20-24°C).

El tratamiento observado durante la prueba control (0 ppm) a temperatura ambiente obtuvo los siguientes recuentos: al día 0 la lectura fue de 9.597 Log₁₀ UFC/mL, posteriormente el recuento al día 3 fue de 9.267 Log₁₀ UFC/mL lo que muestra que la reducción del día 0 al día 3 fue de 0.329 ciclos UFC/mL, este comportamiento indica una lenta tendencia sobre la disminución de las células bacterianas y muestra que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$), durante el tiempo transcurrido a pesar de que todavía no es sometido al desinfectante. Asimismo, el recuento al día 7 fue de 9.230 Log₁₀ UFC/mL de manera que la reducción entre el recuento del día 3 al día 7 fue de 0.037 ciclos UFC/mL esto indica que no hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Los ciclos reducidos entre el día 0 y el día 7 es de 0.366 UFC/mL, lo que indica que hay una mayor reducción de ciclos y por tanto si presenta diferencia significativa.

Figura 17. Recuentos bacterianos de las 3 concentraciones a temperatura ambiente en Log₁₀ UFC/mL



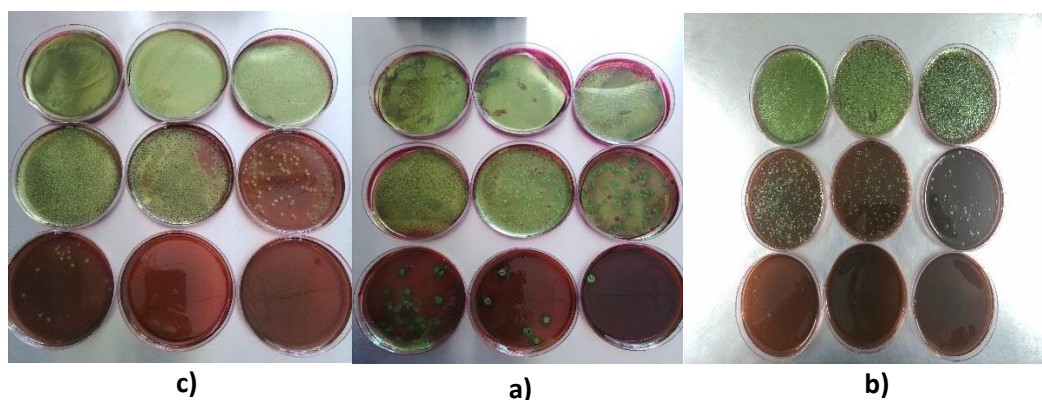
*PC (Prueba control), 500 y 1000 ppm (partes por millón) pruebas a temperatura ambiente (20-24°C)

El tratamiento con 500 ppm de aceite esencial de salvia (*S. officinalis*) se comportó de la siguiente manera: el recuento al día 0 fue de 9.716 Log₁₀ UFC/mL, al día 3 fue de 9.371 Log₁₀ UFC/mL de forma que la reducción entre el día 0 al día 3 fue de 0.345 ciclos UFC/mL lo que indica que no hay diferencia significativa. En este sentido, el recuento para el día 7 fue de 8.778 Log₁₀ UFC/mL donde de igual forma no hay diferencia significativa entre el día 3 al día 7 lo que indica que la concentración de 500 ppm a temperatura ambiente no redujo de manera importante el crecimiento de *Escherichia coli* en espinaca. En este sentido, si se analiza el comportamiento de la inhibición bacteriana entre el día 0 al día 7 podemos notar que la reducción es de 0.938 ciclos UFC/mL donde notablemente si hay diferencia significativa entre recuentos.

Por otro lado, los resultados de los recuentos observados para la concentración de 1000 ppm con aceite esencial de salvia (*S. officinalis*) muestran que para el recuento fue de 8.699 Log₁₀ UFC/mL en el día 0. Al día 3 fue de 8.602 Log₁₀ UFC/mL de modo que los ciclos reducidos entre el día 0 y el día 3 fueron de 0.097 UFC/mL por tanto no hay diferencia significativa durante el tiempo de exposición con el extracto a esta concentración. Asimismo, el recuento al día 7 fue de 5.398 Log₁₀ UFC/mL, y los ciclos

reducidos entre el día 3 y el día 7 fueron de 3.204 UFC/mL y a pesar de notar una reducción considerable no hay diferencia significativa entre los días a los que estuvo expuesto el tratamiento a temperatura ambiente. Sin embargo, si se compara la reducción entre el día 0 y el día 7 es de 3.301 ciclos UFC/mL lo que indica que si hay diferencia significativa.

Figura 18. Recuento bacteriano del día 3 en temperatura ambiente. a) PC, b) 500 ppm, c) 1000 ppm



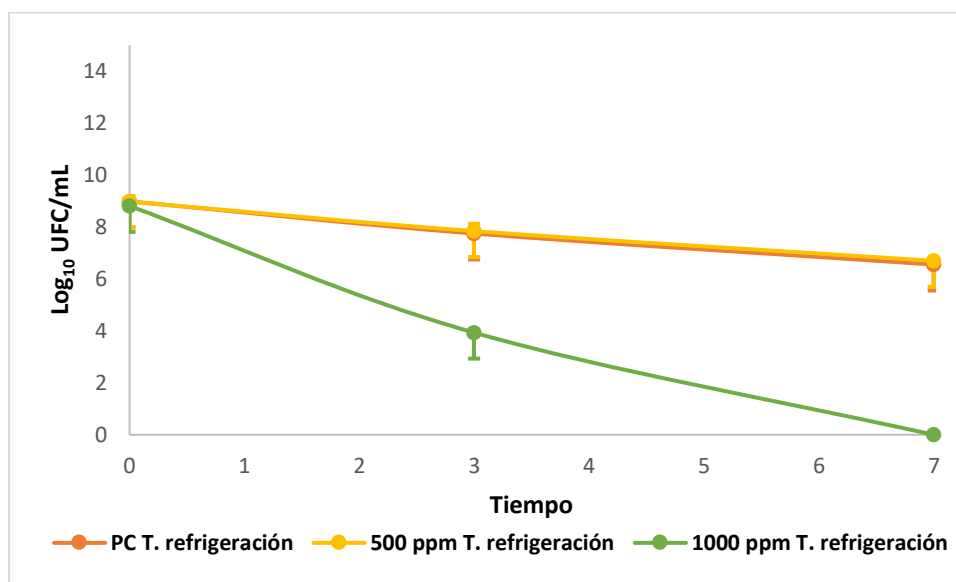
3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente al tiempo del aceite esencial de *S. officinalis* frente a *E. coli* en fase de vapor a temperatura de refrigeración.

En la Figura 19 se observan los recuentos bacterianos realizados por duplicado para las concentraciones de 0, 500 y 1000 ppm aplicadas en fase de vapor a temperatura de refrigeración (4-6°C).

Los tratamientos a temperatura de refrigeración (4-6°C) presentaron una mayor inhibición del crecimiento microbiano. Si bien, la refrigeración es uno de los principales métodos de conservación en alimentos, Par Gramajo, (2017) refiere que este método mantiene al alimento a bajas temperaturas (entre 2 y 8°C) sin alcanzar la congelación, y su propósito es retardar el deterioro por microorganismos ralentizando su crecimiento. Se muestra que tras un tratamiento de conservación de alimentos como lo es la refrigeración ayuda a conservar la estructura del vegetal retardando los procesos oxidativos, de deshidratación y deterioro, esto sugiere que se conservan de mejor

manera las hojas de espinaca permitiendo preservar su estructura y retardando el crecimiento del microorganismo (*E. coli*).

Figura 19. Recuentos bacterianos de las 3 concentraciones a temperatura de refrigeración en Log₁₀ UFC/mL



*PC (Prueba control), 500 y 1000 ppm (partes por millón) pruebas a temperatura de refrigeración (4-6°C)

De este modo, los resultados de los recuentos se presentan en la figura 19: la prueba control tuvo un recuento de 8.989 Log₁₀ UFC/mL al día 0, mientras que el recuento al día 3 fue de 7.752 Log₁₀ UFC/mL de manera que la reducción del día 0 al día 3 es de 1.237 ciclos UFC/mL lo que indica que hay diferencia significativa durante su permanencia en refrigeración. Al día 7 obtuvo un recuento de 6.556 Log₁₀ UFC/mL por tanto la reducción logarítmica entre el día 3 y el día 7 fue de 1.196 UFC/mL presentando diferencia significativa. Así la reducción del día 0 al día 7 es de 2.283 ciclos UFC/mL de forma que si hay diferencia significativa.

El tratamiento de 500 ppm se comportó de la siguiente manera: al día 0 se obtuvo un recuento de 8.982 Log₁₀ UFC/mL, por otra parte, el recuento al día 3 fue de 7.845 Log₁₀ UFC/mL, de modo que la reducción logarítmica entre el día 0 y el día 3 fue de 1.137 ciclos UFC/mL presentando diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Asimismo, al día 7 se obtuvo un recuento de 6.699 Log₁₀ UFC/mL, presentando diferencia significativa del día

3 al día 7 con una reducción de 1.146 ciclos UFC/mL. De manera que, existe diferencia significativa entre el día 0 y el día 7 con una reducción de 2.283 UFC/mL.

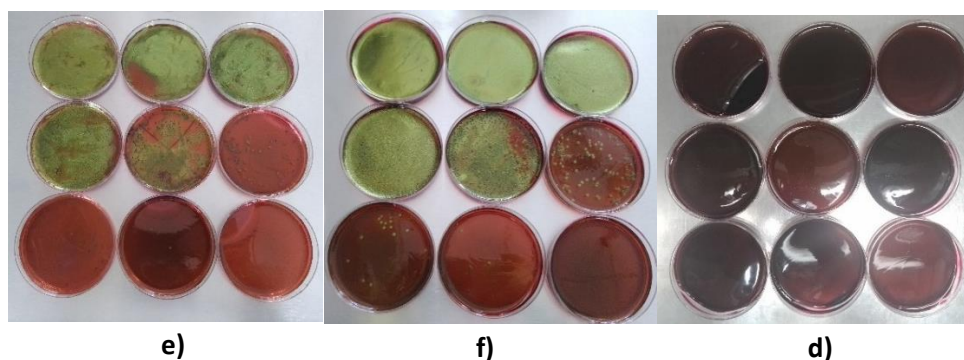
Los recuentos en la etapa de impregnación de 1000 ppm con el aceite esencial de *Salvia officinalis* fueron: al día 0 con 8.813 Log₁₀ UFC/mL, al día 3 fue de 3.934 Log₁₀ UFC/mL, de modo que la reducción logarítmica entre el día 0 al día 3 fue de 4.878 UFC/mL lo que indica una reducción significativa. Al día 7, el recuento fue de 0 Log₁₀ UFC/mL, donde se observa una reducción importante y significativa ($p \leq 0.05$). Lo anterior, demuestra el efecto inhibitorio de la salvia sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, en una matriz alimentaria. De acuerdo con Ovidi, et al. (2021) y López-De Ávila et al. (2013) el efecto antimicrobiano que ejerce el aceite esencial de *Salvia officinalis* en contra de la bacteria *E. coli* se logra con concentraciones mínimas inhibitorias y en concentraciones de entre 1-4 mg/mL respectivamente. De este modo, la reducción entre el día 0 al día 7 fue de 8.813 UFC/mL.

Por otro lado, un mayor efecto en la reducción de las poblaciones de *E. coli* a temperaturas más bajas se debe probablemente a una reducción del metabolismo de la bacteria. Nair et al. (2005), explican que se puede relacionar con cambios en la fluidez de la membrana de las células bacterianas cuando éstas son expuestas a temperaturas de refrigeración. Además, los microorganismos son fisiológicamente más activos a temperatura ambiente que a temperatura de refrigeración; por tanto, el efecto antimicrobiano del aceite esencial de salvia (*S. officinalis*) pudo ejercer su efecto con mayor facilidad y demostrar los efectos de inhibición microbiana (Strawn y Danyluk, 2009, Nair et al. 2005 y Jiménez 2016). Asimismo, las condiciones de refrigeración retardan la deshidratación del vegetal, aumentando la eficacia del tratamiento. Caso contrario ocurre con los tratamientos evaluados a temperatura ambiente, en los cuales se demuestra un menor efecto del aceite esencial aplicado en fase de vapor. Lo anterior, puede deberse a que una mayor temperatura favorece la supervivencia de la bacteria y provoca que el vegetal sea más susceptible al daño favoreciendo su crecimiento. Con estos resultados se puede considerar que la aplicación de aceite esencial puede funcionar para tratamientos con un menor tiempo de exposición, pero con concentraciones mayores. Por otro lado, López et al., (2011) reportan, que las

espinacas envasadas al someterse a condiciones de refrigeración se disminuye la riqueza, diversidad y uniformidad de la microbiota bacteriana, condiciones que pudieron beneficiar la reducción del crecimiento de *E. coli*.

Uno de los factores más importantes a considerar para lograr el efecto antibacteriano mediante el uso de aceites esenciales es su conservación. Una característica que el aceite esencial de salvia que se usó fue que presento resinificación, esto se logró notar mientras estuvo expuesto a temperatura ambiente (20-24°C) y durante los 7 días de contacto, por el contrario, durante el tratamiento a temperatura de refrigeración (4-6°C) de igual manera se empezó a resinificar, pero no se logró completamente y solo se quedó pegajoso. En Merino, (2011) refiere que los aceites esenciales son volátiles y si se dejan en contacto con el aire, se oxidan, solidifican y resinifican, perdiendo su olor característico, al igual que se alteran fácilmente bajo la acción de la luz, volviéndose amarillos y oscuros. El efecto de la fase de vapor sobre la pérdida de los compuestos antimicrobianos del aceite esencial (*S. officinalis*) limito la presencia de oxígeno en el entorno por lo que la resinificación se debe a la temperatura, en este sentido, la temperatura constante de refrigeración ayuda a conservar el aceite retardando el proceso de oxidación y pérdida de compuestos del propio aceite. (Ríos, 2010; Ceballos & Londoño, 2017)

Figura 20. Recuento bacteriano del día 3 en temperatura de refrigeración. d) PC, e) 500 ppm, f) 1000 ppm



3.4 Comparación de los tres tratamientos en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *S. officinalis* frente a *E. coli* en fase de vapor a temperatura ambiente.

En la tabla 5 se muestran las reducciones logarítmicas a temperatura ambiente donde su comportamiento frente a cada tratamiento fue el siguiente: para el tiempo 0 no hay diferencia significativa entre tratamientos ya que todavía no hay una reducción de la población bacteriana. Asimismo, a los 3 días tampoco hay diferencia significativa para ninguno de los tratamientos en comparativa lo que muestra que se mantiene la misma población. A los 7 días si hay diferencia significativa entre la prueba control y 500 ppm, al igual que entre los tratamientos de 500 ppm y 1000 ppm. Al presentarse el efecto significativo entre tratamientos al día 7 se muestra que a temperatura ambiente se logra una reducción logarítmica para prueba control, 500 ppm y 1000 ppm de aproximadamente de 0.04, 0.55 y 8.58 UFC/mL respectivamente.

De este modo, se resalta que el tratamiento que logro la mayor reducción fue el de la concentración de 1000 ppm al día 7 con temperatura ambiente. Y a pesar de no reducir en su totalidad la población bacteriana se demuestra el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* frente a la bacteria *E. coli*.

Tabla 5. Recuentos y reducciones logarítmicas de las tres concentraciones a temperatura ambiente

Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Concentración (ppm)	Recuentos (Log10 UFC/mL)	Logaritmos reducidos
25	0	PC	9.59±0.09 ^a	0.0±0.0 ^a
		0	9.71±0.25 ^a	0.0±0.0 ^a
		0	8.69±0.12 ^b	0.0±0.0 ^a
	3	PC	9.26±0.08 ^c	0.33±0.00 ^b
		500	9.37±0.33 ^c	0.40±0.55 ^b
		1000	8.59±0.16 ^d	0.15±0.21 ^b
	7	PC	9.23±0.11 ^e	0.04±0.02 ^c
		500	8.78±0.21 ^f	0.55±0.11 ^d
		1000	5.39±0.12 ^g	8.58±0.16 ^e

Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores promedios $\pm$ las desviaciones estándar cuando son comparados entre días.

3.5 Comparación de los tres tratamientos en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *S. officinalis* frente a *E. coli* en fase de vapor a temperatura de refrigeración.

Asimismo, en la tabla 6 se muestran las reducciones logarítmicas a temperatura de refrigeración donde su comportamiento frente a cada tratamiento fue el siguiente: para el tiempo 0 no hay diferencia significativa entre tratamientos ya que todavía no hay una reducción de la población bacteriana. Al día 3, no hay diferencia significativa entre el tratamiento control y 500 ppm, sin embargo, si existe diferencia significativa si se compara la prueba control y 500 ppm contra 1000 ppm de modo que tuvo un mayor efecto en esta última reduciéndose significativamente con 4.87 ciclos UFC/mL. Al día 7 no se presentó diferencia significativa entre la prueba control, 500 ppm y 1000 ppm en los logaritmos reducidos y a pesar de que en los recuentos si se demuestra que hay diferencia significativa para 500 ppm y 1000 ppm, la mayor reducción logarítmica se presentó al día 3, a pesar de que en el día 7 se permite notar una mayor reducción con resultados nulos del recuento de la bacteria. Este comportamiento demuestra que los tratamientos tuvieron mejor respuesta a la inhibición bacteriana en temperatura de refrigeración y se puede considerar el uso del aceite esencial de *Salvia officinalis* a mayores concentraciones en menor tiempo de exposición.

Por ende, se resalta que el tratamiento que logro la mayor reducción fue el de la concentración de 1000 ppm al día 3 con temperatura de refrigeración por la cantidad de logaritmos reducidos, aunque, el mejor tratamiento de recuentos nulos de la presencia de la bacteria se dio al día 7 con la misma concentración. Por ello, si se emplearan mayores concentraciones del aceite esencial en menor tiempo de exposición se favorecería el daño al aceite y al vegetal.

Tabla 6. Recuentos y reducciones logarítmicas de las 3 diferentes concentraciones a temperatura de refrigeración

Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Concentración (ppm)	Recuentos (Log10 UFC/mL)	Logaritmos reducidos
4	0	PC	8.99±0.07 ^a	0.0±0.0 ^a
		0	8.98±0.21 ^a	0.0±0.0 ^a

3	0	8.81±0.14 ^a	0.0±0.0 ^a
	PC	7.75±0.05 ^b	1.24±0.12 ^b
	500	7.84±0.28 ^b	1.15±0.07 ^b
	1000	4.39±0.12 ^c	4.87±0.21 ^c
7	PC	6.56±0.03 ^d	1.20±0.08 ^d
	500	6.69±0.00 ^d	1.10±0.14 ^d
	1000	0.00±0.00 ^e	3.93±0.07 ^e

Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores promedios $\pm$ las desviaciones estándar de los tratamientos cuando son comparados entre días.

3.6 Compuestos bioactivos del aceite esencial de *S. officinalis* y su acción bactericida

El efecto de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Salvia officinalis* generalmente se le atribuye su interacción de sus compuestos bioactivos que están presentes en él. El mecanismo de ataque de los antimicrobianos dentro de una célula se lleva a cabo en partes y/o funciones importantes para la sobrevivencia de la célula. Puede llevarse a cabo en la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteína, en su genética y en la síntesis de su genética. Esto puede causar daños irreparables a una célula. Por lo general, los compuestos presentes en especias y hierbas que tienen actividad antimicrobiana son derivados simples y complejos del fenol, los cuales son volátiles a temperatura ambiente (Davidson y Brannen, 2001).

La *Salvia officinalis* contiene más de 300 componentes, entre los más importantes se encuentra la presencia de altas concentraciones de 1,8-cineol, α -tuyona, alcanfor y salviol. Algunos de los terpenos poseen actividad inhibitoria en el crecimiento de las bacterias. De manera convencional, los aceites esenciales son compuestos olorosos y que dentro de su actividad antimicrobiana actúan contra un amplio rango de bacterias y hongos. Actualmente, no se conocen específicamente el mecanismo de acción de gran parte de antimicrobianos de origen natural, normalmente en diversas investigaciones se busca estudiar las concentraciones críticas de los aceites esenciales

donde tengan efecto en su acción bactericida, este balance se mantiene por medio de la interacción de una serie de mecanismos químicos, causando su alteración y la destrucción de las células microbianas, donde en diversas ocasiones tienen efecto en la membrana celular, esta hace que colapse, haciéndole un daño a la célula de la bacteria. En la salvia se ha encontrado que actúa sobre la membrana celular donde Raibaudi, et al. 2006 reportan el efecto de los compuestos fenólicos ya que sensibilizan la membrana celular, y al saturarse los sitios de acción, la célula sufre un daño grave, provocando que se colapse la membrana (Rodriguez, 2011, Chouhan et al., 2017; Fournomiti et al., 2015 y Ghorbani et al., 2017, Gasca 2021, Raibaudi, et al. 2006).

De acuerdo con Merino (2011), los principales componentes en salvia identificados por cromatografía de gases acoplada a masas son cetonas monoterpenicas biológicas, las α y β tuyonas (35-60%, predominando claramente la α -tuyona, salvo en raras excepciones). El aceite esencial contiene, además, como componentes mayoritarios, alcanfor (10-40%), cineol, bomeol (libre y esterificado), entre otros. Las proporciones de estos componentes pueden variar de forma importante en función de numerosos criterios: origen geográfico, época del año, y frecuencia de recolección (Merino, 2011, Petrone, 2002).

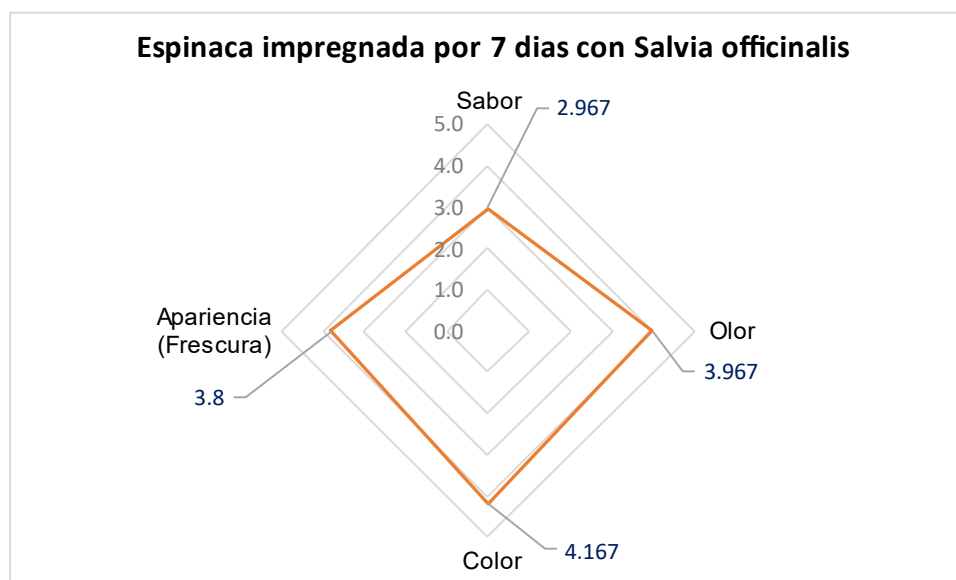
Asimismo, de acuerdo con Mikulášová et al., (2009) *E. coli* es una de las bacterias Gram negativas con mayor susceptibilidad a los extractos de *S. officinalis* de las hojas y tallos, y mediante sus extractos obtenidos por destilación por arrastre de vapor presentan un mayor efecto de inhibición. El mecanismo de acción del extracto sobre la bacteria que explica la efectividad de los tratamientos realizados en esta investigación en ambas temperaturas pese a la rapidez de la eficacia que pudieron tener se debe a los compuestos bioactivos de los principales componentes mayoritarios en *Salvia officinalis* provenientes de los grupos funcionales como: las cetonas (alcanfor y α tuyonas) así como el cineol proveniente del eter que al predominar en el extracto pueden dar lugar a la muerte bacteriana sobre la membrana celular.

4. Evaluación sensorial

Durante la etapa experimental y tras la obtención de los resultados de la evaluación antimicrobiana del aceite esencial aplicado en fase de vapor, se determinó realizar una evaluación sensorial con el tratamiento que mayor eficacia y conocer el efecto del tratamiento sobre los criterios de aceptabilidad del producto final y el nivel de impacto sobre los umbrales aceptables de sabor, olor, color y apariencia (frescura).

Como bien se describe en la etapa anterior, el tratamiento que presentó la mayor reducción microbiana fue el de la concentración de 1000 ppm al día 7 en temperatura de refrigeración. Las muestras de espinaca se prepararon sin inóculo y únicamente con la aplicación del aceite esencial de *S. officinalis* en fase de vapor. En la Figura 21 se muestran los promedios de la escala hedónica de 5 puntos (Anexo 1), aplicada a un total de 30 panelistas de jueces no entrenados (consumidores) en un rango de edades de entre 20 a 53 años. Es así como se presentan los siguientes valores a los atributos sensoriales del vegetal en estudio (espinaca baby).

Figura 21. Prueba hedónica de 5 puntos para un total de 30 panelistas

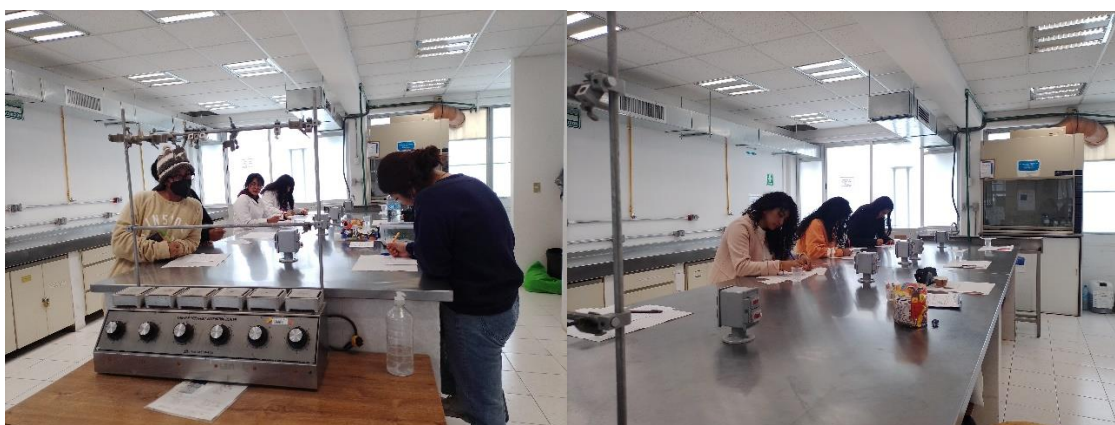


Como se puede observar en la Figura 21; el sabor obtuvo un puntaje de 2.967, lo cual indica que tuvo buen resultado por encima del promedio de la escala de 5 puntos, ahora bien, en comparativa a los demás umbrales el sabor fue el puntaje más bajo de

aceptación y conforme a las observaciones generales cerca del 76% de los panelistas concuerdan que fue percibido con un sabor predominante al del aceite esencial. Por lo que, en Beuchat y Golden, 1989 refieren que algunos antimicrobianos naturales lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad (Beuchat y Golden, 1989). Así como se demuestra que hubo alteración en el sabor indicando un resabio amargo tornándose a un sabor mentolado en boca debido a la presencia de la tuyona en salvia.

Por otro lado, el atributo de apariencia (frescura) obtuvo un puntaje de 3.8 lo cual indico que al mantener la cadena de frio durante el experimento las hojas de espinacas se mantuvieron intactas, sin embargo, el periodo de aplicación de la evaluación sensorial perdió frescura al interrumpir la cadena frio cuanto más tiempo pasaba. Al 84% de los panelistas les pareció fresca la espinaca.

Figura 22. Panelistas durante la evaluación sensorial



En cuanto al atributo de olor este presentó un puntaje de 3.967 por arriba del promedio de la escala de 5 puntos lo cual indica que al 63% les gusto moderadamente el olor de la espinaca. Asimismo, el color presento un puntaje de 4.167, siendo este el más alto y cercano al puntaje de 5 puntos lo que indica que a pesar de que los demás atributos presentaron valores menores, el color se mantuvo intacto al característico de la espinaca fresca.

El uso de los aceites esenciales puede afectar las características sensoriales de los alimentos en su estado natural. Sin embargo, como se puede observar de manera

general la utilización de métodos de desinfección por impregnación en fase de vapor utilizando aceites esenciales puede favorecer la oferta de alimentos, dándoles un valor agregado, ya que puede contribuir a conservar la vida útil, calidad e inocuidad del producto. De acuerdo con Castañeda, (2013) un producto evaluado en una escala hedónica puede considerarse como sensorialmente aceptable, cuando el promedio de sus evaluaciones se encuentra por encima de la media, dicha condición se cumplió en todos los atributos evaluados en la presente investigación. Finalmente, algunas observaciones generales por parte de los panelistas fueron: el interés por el producto ya que es una idea innovadora al pensar que estos alimentos podrían funcionar para ensaladas, incluidas en mix con otros vegetales frescos e idealmente listas para su consumo.

VII. Conclusiones

En la actualidad la población ha concientizado sobre la importancia del consumo de hortalizas y en especial aquellas que son de hojas verdes, la demanda de estas ha aumentado, además, de que previenen enfermedades cardiovasculares, por lo que su ingesta es fundamental para una salud óptima. Aquellos alimentos que son listos para el consumo son una muy buena alternativa en el mercado y que mejor si estos también son desinfectados por métodos naturales. Por lo que las conclusiones sobre esta investigación son las siguientes:

- Los rendimientos obtenidos en el secado de la planta y la destilación del aceite esencial de *S. officinalis* fueron satisfactorios y los datos concuerdan con los reportados por otras investigaciones.
- La efectividad de la desinfección va a depender del tipo de desinfectante (antimicrobiano), su concentración, la temperatura de aplicación, el tiempo de exposición y la resistencia de la bacteria.
- Los tratamientos evaluados a temperatura ambiente: prueba control y las concentraciones de 500 ppm y 1000 ppm obtuvieron reducciones significativas del día 0 al día 7 con reducciones de 0.366 UFC/mL, 0.938 UFC/mL y 3.301 UFC/mL respectivamente para cada concentración. Esto indica que el factor de la temperatura influyo significativamente al efecto antimicrobiano del aceite esencial en cualquiera de las concentraciones puesto que las reducciones fueron menores a las presentadas en temperatura de refrigeración.
- De la misma forma para la temperatura de refrigeración las bacterias fuera de su rango de temperatura ralentizan su crecimiento lo que da lugar a los principios de conservación por refrigeración. Asimismo, durante la prueba control y la concentración de 500 ppm la reproducción bacteriana tuvo diferencias significativas del día 0 al día 3 con reducciones de 1.237 UFC/mL y 1.137 UFC/mL respectivamente. En comparativa, con la concentración de 1000 ppm demostró diferencia significativa del antimicrobiano presentando resultados de 0 recuentos bacterianos al día 7 reduciendo 8.813 UFC/mL.

- Los antimicrobianos naturales como el aceite esencial de *S. officinalis* promete ser una alternativa eficaz en contra de bacterias patógenas ya que dependiendo de la concentración a usar puede llegar a reducir o eliminar el crecimiento de *E. coli*.
- Los valores representados en la evaluación sensorial fueron satisfactorios, ya que los 4 atributos estudiados presentaron valores por encima de la media a la escala hedónica de 5 puntos utilizada. Se resalta que el puntaje más alto lo obtuvo el atributo de color de la espinaca.
- Aunque, las características iniciales de la espinaca se vieron afectadas, las observaciones generales demostraron un interés hacia el producto como alternativa de darle un valor agregado. El futuro de los antimicrobianos de origen natural se encuentra determinado por la aceptación del consumidor.

VIII. Recomendaciones

- Es importante estandarizar y controlar el proceso de destilación ya que la hidrodestilación es un método óptimo en la obtención de aceites esenciales para uso en alimentos, debido a que, no se corre el riesgo de contaminación o de trazas de compuestos que afecten la calidad del aceite. Si se controlan los factores de vapor saturado y temperatura se pueden obtener buenos rendimientos.
- La aplicación de los antimicrobianos naturales se determinan bajo estudio de pruebas “in vitro”. Para el éxito de estas pruebas, se requiere que el microorganismo y el tiempo de exposición estén controlados para establecer resultados significativos. El efecto de la temperatura es muy importante durante la incubación y la exposición.
- La fase de vapor promete ser una técnica eficaz para reducir el impacto sensorial de la aromaticidad que provocan los aceites esenciales.
- Se recomienda el uso del extracto de Salvia a mayores concentraciones, con otros tiempos de contacto posiblemente menores a los estudiados y el uso de otros vegetales frescos que sean susceptibles a la contaminación de bacterias patógenas

IX. Referencias Bibliográficas

- Albarracín y Gallo. (2003). Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Universidad nacional de colombia. Trabajo de grado.
- Aruscavage, D., Lee, K., Miller, S., & LeJeune, J. T. (2006). Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *Journal of food science*, 71(8), R89-R99.
- Anders, V. (2022). Diccionario de origen de las palabras. De Chile. Recuperado de: <http://etimologias.dechile.net/?espinaca>
- Armijo, J. C., Vicuña, G., Romero y Otiniano, P., Condorhuamán, C. y Hilario R. (2012). Modelamiento y Simulación del Proceso de Extracción de Aceites Esenciales Mediante la Destilación por Arrastre de Vapor. *Per. Quím. Ing. Quím.* 15 (2), 19-27.
- Atlas Big. (2018-2020). Países productores de espinacas líderes en el mundo. E.U.: Atlas Big. Recuperado de: <https://www.atlasbig.com/es-mx/paises-por-produccion-de-espinacas>
- Ávila-Sosa, R., Palou, E., Jiménez-Munguía, M. T., Nevárez-Moorillón, G. V., Navarro Cruz, A. R., & López-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 66e72.
- Axayacatl O. (2022). Estados productores de espinaca en México. Ciudad de México. Blog Agricultura. Recuperado de: <https://blogagricultura.com/estados-produccion-espinaca/#:~:text=En%202020%20el%20estado%20de,70.7%25%20de%20la%20producci%C3%B3n%20nacional>.
- Azimirad, M., Nadalian, B., Alavifard, H., Panirani, S. N., Bonab, S. M. V., Azimirad, F., ... & Zali, M.R. (2021). Microbiological survey and occurrence of bacterial foodborne pathogens in raw and ready-to-eat green leafy vegetables marketed in Tehran, Iran. *International journal of hygiene and environmental health*, 237, 113824.
- Beuchat, L.R. y Golden, D.A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 43(1): 134-142.
- Blanchard, J. (2000). Los antimicrobianos naturales refuerzan la seguridad en los alimentos. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>
- Caballero Roque A. (2013). Hojas verdes: Alimentos saludables Opciones prácticas para su consumo. Chiapas, México: Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

- Castañeda Bustillo C. D. (2013). Comparación de la escala hedónica de nueve puntos con la escala hedónica general de magnitud (gLMS) utilizada por personas de dos regiones de América Latina. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. Recuperado de: <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/0e036a32-7809-4aa8-8746-6d5855a7b1b6/content>
- Castrillon Cardona, W. F., Matulevich Pelaez, J. A., Rodríguez Martínez, J. A., & Silva Carrero, D. A. (2020). Composición química del aceite esencial de flores De *Salvia leucantha* Cav. (Lamiaceae). Revista Facultad De Ciencias Básicas, 15(1), 41–47. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3615>
- Ceballos Toro V., Londoño Giraldo L. M. (2017). Aceites esenciales en la conservación de alimentos. Universidad Libre de Colombia. 6, 38-49.
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). (2022). Lechuga, otras verduras de hoja verde y seguridad de los alimentos. USA. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/leafy-greens.html>
- Centers of Disease Control and Prevention (CDC). (2022). Summary of Possible Multistate Enteric (Intestinal) Disease Outbreaks. USA. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/lists/annual-summaries.html>
- Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). (1998). Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables, de FDA. Recuperado de: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidanceindustry-guide-minimize-microbial-food-safety-hazards-fresh-fruits-andvegetables?fbclid=IwAR2rG7ojrgtsLf6Bmxu4aTmXdmM_Eeb7D6yVAVmHsnLml2IKTpS2sZH3ZY
- Chemix. (2021). An online app for drawing science diagrams in chemistry. UK. Recuperado de: <https://chemix.org/>
- Choi, S., Bang, J., Kim, H., Beuchat, L. R., & Ryu, J. H. (2011). Survival and colonization of *Escherichia coli* O157: H7 on spinach leaves as affected by inoculum level and carrier, temperature, and relative humidity. Journal of applied microbiology, 111(6), 1465-1472.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. Medicines, 4(3), 58.
- Cortés Higareda M., Bautista Baños S., Ventura Aguilar S. I., Landa Salgado P. & Hernández López M. (2021). Bacterias patógenas de los alimentos agrícolas frescos y mínimamente procesados. Estado actual en el control del género

salmonella. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, vol. 22, núm. 1

- De Giusti, M., Solimini, A.G., Cottarelli, A., De Vito, C., Aurigemma, C., Tufi, D. & Marinelli, L. (2014). Temporal pattern of microbial indicators of ready-to-eat rocket salads during shelf life. *Ann. Ist. Super. Sanita* 50 (1), 90–95. DOI: [10.4415/ANN_14_01_13](https://doi.org/10.4415/ANN_14_01_13)
- Del Valle, E. M., (2003). Preservación de frutas y hortalizas, mediante métodos artesanales. Disponible en: <http://www.ocetif.org/buenaspracticas.html> [Consulta 03 /Nov. /2007]
- Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). (2008). Guía de Inocuidad Alimentaria para Voluntarios. USA. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Recuperado de: https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-02/Cooking_for_Groups_SP.pdf
- Dorman H, Deans S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
- Essawi T, Srour M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70: 343-349.
- Elhariry, H. M. (2011). Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on greenleafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food Microbiology*, 28(7), 1266-1274.
- Elviss, N. C., Little, C. L., Hucklesby, L., Sagoo, S., Surman-Lee, S., De Pinna, E., & Threlfall, E. J. (2009). Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *International journal of food microbiology*, 134(1-2), 83-88.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2023). Alimentos que se venden en la vía pública. De FAO. Recuperado de: <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/street-foods0/es/#:~:text=Como%20sector%20%C2%ABinformal%C2%BB%20de%20la,deterioro%20de%20la%20higiene%20ambiental>.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2021). Bueno para ti, Beneficios para la salud y la nutrición. De FAO. Recuperado de: <https://www.fao.org/3/cb2395es/online/src/html/bueno-para-ti.html>
- Gasca Corona J. (2021). “Comportamiento de *Escherichia coli* inoculada sobre espinaca (*Spinacia oleracea* L.) “baby” sometida a diferentes etapas postcosecha” (Tesis de grado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

- Ghorbani, A., & Esmaeilzadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(4), 433-440.
- Gil, M. I., Selma, M. V., Suslow, T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., & Allende, A. (2015). Pre-and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(4), 453-468.
- Gómez-López, V. M., Marín, A., Allende, A., Beuchat, L. R., & Gil, M. I. (2013). Postharvest handling conditions affect internalization of *Salmonella* in baby spinach during washing. *Journal of Food protection*, 76(7), 1145-1151.
- Hayouni EK, Chraief I, Abedrabba M, Bouix M, Leveau JY, Mohammed H, Hamdi M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 242-251.
- Hernández Agero T. O., Carretero Accame M. E. y Villar del Fresno A. M. (2002). *Salvia* Fitoquímica, Farmacología y terapéutica. ELSERVIER. 16 (7), 59-64.
- Hernández U. O. (2019). Obtención de aceite esencial de *Salvia* (*Buddleja perfoliata*) mediante el proceso de extracción por arrastre de vapor y evaluación de su actividad antioxidante. (Trabajo de grado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Hornok L. (1992). Cultivation and processing of medicinal plants. Ed. L. Hornok & University of Horticultural Sciences, Budapest.
- Hussain, M. A., & Dawson, C. O. (2013). Economic impact of food safety outbreaks on food businesses. *Foods*, 2(4), 585-589.
- Iwu, C. D., & Okoh, A. I. (2019). Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: a review. *International journal of environmental research and public health*, 16(22), 4407.
- Jiménez García A. (2016). Supervivencia y parámetros cinéticos de *Escherichia coli* en zumos de frutas naturales. Trabajo de grado. Universidad de Valladolid. Valladolid, España.
- Jiménez, J., Gil, R., Fuentes, L. S., Niño, N., Espinosa, L., Arias, L. A., Rodríguez, M. y Garzón, C. (2010). El cultivo de la espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y su manejo fitosanitario en Colombia. Colombia: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Khalil R, Li Z. (2011). Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. *African Journal of Biotechnology*, 10 (42), 8397-8402.

- Kilickan, A., Üçer, N., & Yalçın, I. (2010). Some physical properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) seed. *African Journal of Biotechnology*, 9(5).
- Klonsky, K. (2006). E. coli in spinach, foodborne illnesses, and expectations about food safety. *Agricultural and Resources Economics Update*. Gianni Foundation of Agricultural Economics, University of California, 10(2), 1-4.
- Lewin J. (2014). ¿Cuáles son las bondades de la espinaca? De BBC. Recuperado de: https://www.bbc.com/mundo/noticias/2014/10/141024_salud_bondades_espinaca_finde_yv
- Lisiewska Z., Kmiecik W., Gebczynski P. y Sobczynska L. (2011). Amino acid profile of raw and as-eaten products of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *ELSEVIER*, 126, 460-465. doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.015
- Liu, C., Hofstra, N., & Franz, E. (2013). Impacts of climate change on the microbial safety of preharvest leafy green vegetables as indicated by *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 119-128.
- López-De Ávila L. M., Castaño Peláez H. I. & Mejía Gómez C. E., (2013). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. *Actual Biol* 35 (98): 77-83
- Lopez-Velasco, G., Welbaum, G. E., Boyer, R. R., Mane, S. P., & Ponder, M. A. (2011). Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1203-1214.
- Luna-Guevara, J. J., Arenas-Hernandez, M. M., Martínez de la Peña, C., Silva, J. L., & Luna-Guevara, M. L. (2019). The role of pathogenic *E. coli* in fresh vegetables: Behavior, contamination factors, and preventive measures. *International journal of microbiology*, 2019.
- Marhuenda, J., García, J. (2015). 12. Cultivos agrícolas al aire libre. *CAJAMAR CAJA RURAL* (289- 301). España: Serie Agricultura.
- Mayton, H. M., Marcus, I. M., & Walker, S. L. (2019). *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium adhesion to spinach leaf surfaces: Sensitivity to water chemistry and nutrient availability. *Food microbiology*, 78, 134-142.
- Merino Torres J. (2011). Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad alba extraído por el método mixto en *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú.

- Michanie, 2003. *S. Escherichia coli* O157:H7. La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. *Ganados & Carnes*. Vol. 4 (17):40-42.
- Mikulášová, M. Á. R. I. A., & Vaverková, Š. T. E. F. Á. N. I. A. (2009). Antimicrobial effects of essential oils from *Tanacetum vulgare* L. and *Salvia officinalis* L., growing in Slovakia. *Nova Biotechnological*, 9(2), 161-166.
- Molina, JA. (2009). Obtención de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor (equipo Clavenger). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10251/5707>
- Muñoz F. (1996) *Plantas Medicinales y Aromáticas; estudio, cultivo y procesado*. 2da Reimpresión. Editorial Mundi Prensa S.A, Madrid España. pp 15, 247, 267, 311, 312, 316, 320
- Nair, M.K., Abouelezz, M.H., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. (2005). Antibacterial effect of monocaprylin on *E. coli* O157:H7 in apple juice. *J Food Prot.* 68: 1895-1899.
- Neal, J. A., Marquez-Gonzalez, M., Cabrera-Diaz, E., Lucia, L. M., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., & Castillo, A. (2012). Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Food Research International*, 45(2), 1123-1128.
- Nychas, G.J.E. (1995). Natural Antimicrobials from plants. *New Methods of food preservation*. G.W. Gould (Ed.). Blakie Academia & Professional. Glasgow. p. 1-21.
- OMS. (2019). Aumentar el consumo de frutas y verduras para reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles. Biblioteca electrónica de documentación científica sobre medidas nutricionales. Recuperado de: https://www.who.int/elena/titles/commentary/fruit_vegetables_ncds/es/
- OMS. (2015). OMS estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Organización Mundial de la Salud, Ginebra. Recuperado de: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf
- OMS. (2020). Inocuidad de los alimentos. Organización Mundial de la Salud. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Ovidi, E.; Laghezza Masci, V.; Zambelli, M.; Tiezzi, A.; Vitalini, S.; Garzoli, S. (2021). *Laurus nobilis*, *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis* Essential Oils and Hydrolates: Evaluation of Liquid and Vapor Phase Chemical Composition and Biological Activities. *Plants* 2021, 10, 707. <https://doi.org/10.3390/plants10040707>

- Patel, J., Millner, P., Nou, X., & Sharma, M. (2010). Persistence of enterohaemorrhagic and nonpathogenic *E. coli* on spinach leaves and in rhizosphere soil. *Journal of applied microbiology*, 108(5), 1789-1796.
- Patel, J., Sharma, M., Millner, P., Calaway, T., & Singh, M. (2011). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 attached to spinach harvester blade using bacteriophage. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(4), 541-546
- Par Gramajo M. G. (2017). Aplicación de los métodos de conservación de alimentos. *Revista Ingeniería y Ciencia*. 1.
- Perez-Marin, D., Torres, I., Entrenas, J. A., Vega, M., & Sánchez, M. T. (2019). Pre-harvest screening on-vine of spinach quality and safety using NIRS technology. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 207, 242-250.
- Petrone, P.V., (2002). La principal causa de deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos. Recuperado de: <http://es.geocities.com/picodelobo/conservantes.html>
- Piccaglia R. 1998. Aromatic plants: a world of flavouring compounds. *Agro Food Industry Hi Tech*, 9 (3): 12-15.
- Produce Safety Rule (2017). Módulo 3. Curso de capacitación para productores. USA: Produce Safety Alliance.
- Raibaudi, R.M., Fortuna, R.S., Belloso, O.M. (2006). Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. Universidad de Leida. Recuperado de: http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf.
- Ramaiyan, B. et al. (2020). Spinach (*Spinacia oleracea* L.). In *Antioxidants in Vegetables and Nuts Properties and Health Benefits*, Singapore: Springer Nature, 8, 159-173.
- Ramírez Navas J. S. (2012). Análisis Sensorial: Pruebas Orientadas al Consumidor. Cali, Colombia: Universidad del Valle.
- Revista Del Consumidor. (2001). Productos para desinfectar agua y alimentos. No. 295. Recuperado de: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/emergencias/descargas/pdf/desinf_agua_alim.pdf
- Ríos Vásquez E. (2010). Evaluación del aceite esencial y estudio de conservación en frío del *Cymbopogon Citratus* cultivado en la región del Quindío. Universidad del Quindío, Colombia, (20), 24-28.
- Roberts, J. L., & Moreau, R. (2016). Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food & function*, 7(8), 3337-3353.

- Roca Ruiz, A. M. (2020). Verduras u hortalizas. Granada. Recuperado de: <https://www.lechepuleva.es/aprende-a-cuidarte/tu-alimentacion-de-la-a-z/v/verduras-u-hortalizas#:~:text=Las%20verduras%20son%20ricas%20en,acelgas%20son%20ricas%20en%20hierro.>
- Rodríguez Álvarez M., Alcaraz Meléndez L., Real Cosío S. M. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas. Proyecto Sagarpa-CONACYT 126183. La Paz, B. C. S. México. p. 8-13.
- Rodríguez Saucedo, E. N. (2011). Uso de Agentes Antimicrobianos Naturales en la Conservación de Frutas y Hortalizas. *Ra Ximhai*, 7 (1), 153-170.
- Rodríguez, M., Zapata, M. E., Solano, M. A., Lozano, D., Torrico, F., & Torrico, M. C. (2015). Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (*Lactuca sativa*) en la cadena alimentaria, provincia de Quillacollo, Cochabamba, Bolivia 2015. *Gaceta Médica Boliviana*, 38(2), 31-36.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2016). Mitos y realidades de la espinaca. Gobierno de México. Recuperado de: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/mitos-y-realidades-de-la-espinaca>.
- Serrano, Z. (1977). Cultivo de la espinaca. Publicaciones de Extensión Agraria. Ministerio de Agricultura. Madrid. España. p. 65.
- Sinha, N. K., Hui, Y. H., Evranuz, E. Ö., Siddiq, M., & Ahmed, J. (2010). Handbook of vegetables and vegetable processing. John Wiley & Sons.
- Steele, M., & Odumeru, J. (2004). Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Journal of food protection*, 67(12), 2839-2849.
- Strawn y Danyluk. (2009). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. On fresh and frozen cut mangoes and papayas. *Int. J Food Microbiol.* 138: 78-84.
- Taban, B. M., & Halkman, A. K. (2011). Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE]salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 17(6), 286-287.
- Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, 22, 1707e1714.
- Uhlig E., Kjellstrom A., Oscarsson E., Nurminen N., Nabila Y., Paulsson J., Lupan T., Velpuri N., Molin G. & Håkansson Å. (2022). The live bacterial load and microbiota composition of prepacked “ready-to-eat” leafy greens during household conditions, with special reference to *E. coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 377, 109-786. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109786

- Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). (2006). Directrices para la Ejecución del Examen de la Distinción, la Homogeneidad y la Estabilidad. Ginebra, España. Recuperado de: http://www.upov.org/es/publications/tg-rom/tg055/tg_55_7.pdf
- Vegeta Listos. (2018). Hojas espinaca baby. Leonali, Puebla. Recuperado de: <https://vegetalistas.com/hojas/>
- Velázquez-Nuñez, M. J., Avila-Sosa, R., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31(1), 1–4. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.029
- Vidaver, A.K. and P.A. Lambrecht 2004. Las Bacterias como Patógenos Vegetales. Trans. Ana María Romero. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0601-01

X. ANEXOS

Anexo 1. Evaluación sensorial

Nombre: _____

Fecha: _____

INSTRUCCIONES

Frente a usted se presenta una muestra de hoja de espinaca. Por favor observe a detalle e indique el grado con el que le gusta o le disgusta cada atributo de la muestra, marque con una x la característica correspondiente a cada atributo.

Característica	Atributos			
	Sabor	Olor	Color	Apariencia (Frescura)
Me gusta extremadamente				
Me gusta moderadamente				
No me gusta ni me disgusta				
Me disgusta moderadamente				
Me disgusta extremadamente				

Observaciones: _____

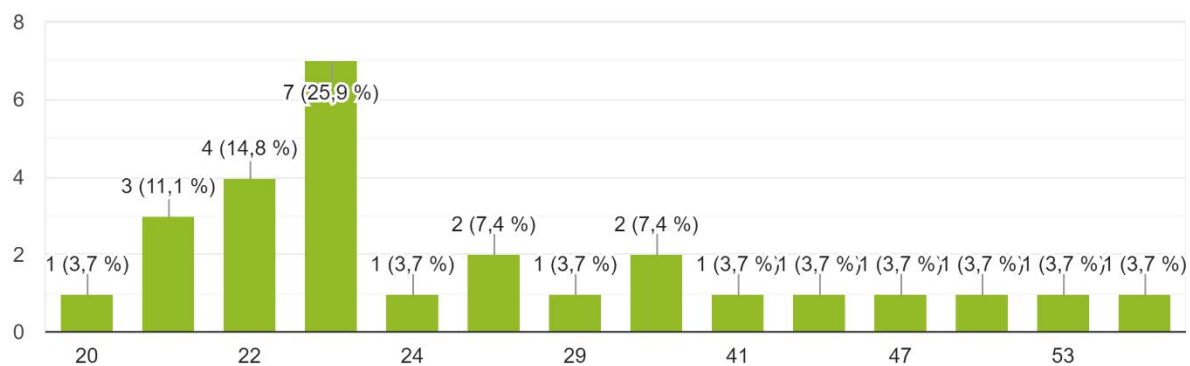
¡Gracias!

Anexo 2. Encuesta de la población a estudiar para la evaluación sensorial

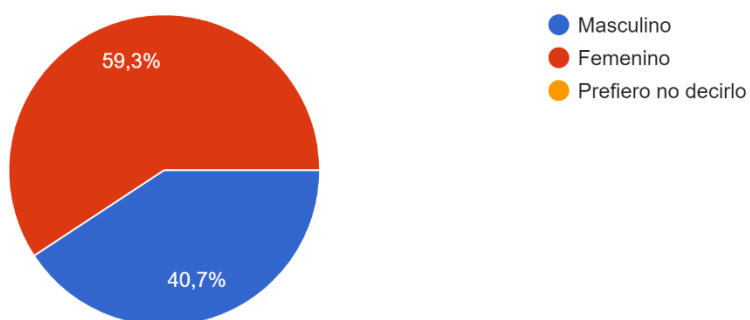
1. Nombre completo

- Respuestas de 30 participantes

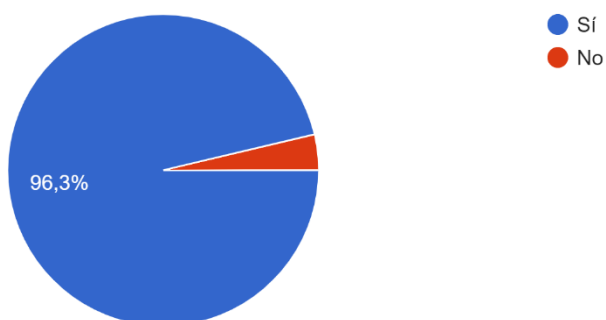
2. Edad



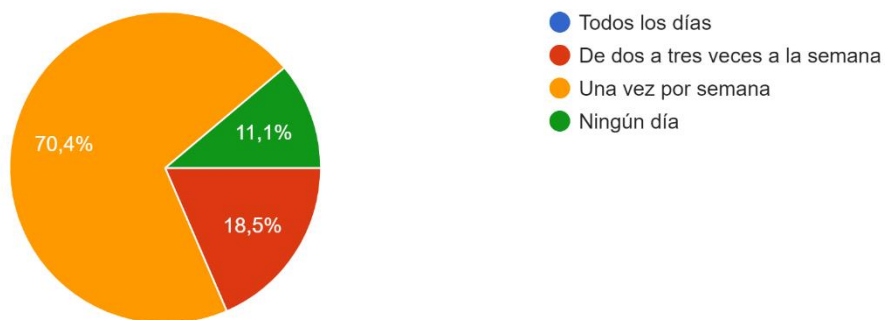
3. Genero



4. ¿Es de su agrado "Las espinacas" como vegetal?



5. ¿Con qué frecuencia consume Espinacas?



6. Generalmente compra espinacas en...

