



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo
Departamento de Bioquímica-Alimentos



Tesis:

Efecto de la irradiación y la limpieza ultrasónica sobre la actividad antimicrobiana del ácido gálico contra enterobacterias en acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*)

Para obtener el grado de licenciada en:
Químico Farmacobiólogo

Presenta:

pQFB. Naomi Ximena Morales Martínez

Director de Tesis:

Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco

Co-director de Tesis:

Dra. Paola Hernández Carranza

Marzo 2026



OFICIO C.Q./CT 020P/2024

C. Naomi Ximena Morales Martínez
PRESENTE

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

"Efecto de la irradiación y la limpieza ultrasónica sobre la actividad antimicrobiana del ácido gálico contra enterobacterias en acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*)"

ha sido autorizado, siendo:

Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco, Director de Tesis

Dra. Paola Hernández Carranza, Co-Directora de Tesis

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

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 9 de abril de 2024

Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez

Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena digital: 1Aa*Sa/Ao%Sh+Pp.Ek"Xh/Wk\$Qt%Lq%Ik*Uk\$Ee/Ow,Tt/Pm*DI*Ru-

Jo,Sf)Pm*Dt#Fm.Fl'Mj/Kz.Mp"Di*Ne&Ta.WI"Sx,Dg#Sq!Mz-Mw.Zg*Oy-

Oi+Sf#Nn%Ca&Qv'Io/Xr(Co,Fh%Od.Sy#Bb(Sv.Wh(Sp,Zu*Bg*Am'Eg+Kw%Jr.Qa.Qv"Jc)Qe(ql)Ma'Gi%Ah,Sd+Gg)Sn#Wt+Rg/Cy

"Zf&NI#Ub(Oo)No(Of#Vh)Ao)Xx'Wa,Qz%Fw*Ln(Sz(Po%Be\$Xh/Hg'Gp'



BUAP

OFICIO C.Q./CT 024C/2024

Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez

Dra. Silvia del Carmen Beristain Bauza

I. A. Madai Gizeh Sánchez Arzubide

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

Naomi Ximena Morales Martínez

cuyo título es:

“Efecto de la irradiación y la limpieza ultrasónica sobre la actividad antimicrobiana del ácido gálico contra enterobacterias en acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*)”

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

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., 16 de abril de 2024

Dr. Jorge Raúl Gerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena Digital: 6Qz-

Kx(Xl'Uq/Oq#Pb)Fr+Is%Gr\$ih'Fh.Nz/Br*Yr#Dy#Rv)Mn'Lo%Oj#Yj"Ga#Yz/Ia%Al)Wm\$Uy.Yw\$Yh)Eh+Qu!Ug.SfHz#Xz#Ly\$Fd'Pb
(Tr'Ab-ii#Wo'Wk&Ny&Fa#Ml!e/Iz&ly#Xx\$Us,He(Px"Qz)Mc,Ke/Vr"Cu(Sq/Qq%Nm%Jg.Qa"Dz\$Ds-
Zb/Dj+Hq%lu"Fj(la"Cc&Xp.Pj!Sr)Eb)Oo(Jf+No.Xz#Pq!In"Ku&Oz+Hs,Yf,Pc*Fm,Ga'Qb)Wn&Of"BF%



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



OFICIO C.Q./CT 014 A/2026

Dr. Henoc Flores Segura

Director Facultad de Ciencias Químicas

Presente.

OFICIO DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS

Título de la Tesis:

" Efecto de la irradiación y la limpieza ultrasónica sobre la actividad antimicrobiana del ácido gálico contra enterobacterias en acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*)"

Comisión Revisora:

Presidente: Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez

Firma: _____

Secretario: Dra. Silvia del Carmen Beristain Bauza

Firma: _____

Vocal: M. E. S. Madai Gizeh Sánchez Arzubide

Firma: _____

Los integrantes de la Comisión Revisora comunicamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de licenciatura de **Químico Farmacobiólogo** que presenta la estudiante **Naomi Ximena Morales Martínez**, bajo la dirección del **Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco** y codirección de la **Dra. Paola Hernández Carranza** por lo que estamos de acuerdo en que se proceda con la impresión definitiva de la tesis y que el estudiante presente su defensa y examen, con número de matrícula **201847990**.

Atentamente

Comisión revisora

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 25 de febrero de 2026



c.c.p. Archivo

Facultad de Ciencias Químicas
Av. San Claudio No. 1 Edificio FCQ 9
Ciudad Universitaria Col. San
Manuel (222)2295500 ext. 7390

Índice general

Resumen.....	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	3
2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).....	3
2.1.1 Tipos de ETAs por la Organización Panamericana de la Salud (PAHO)....	3
2.1.1.1 Infección transmitida por alimentos.....	3
2.1.1.2 Intoxicación causada por alimentos.....	4
2.1.1.3 Toxiinfección alimentaria.....	4
2.2 Enterobacterias.....	5
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.2 <i>Salmonella</i> spp.....	8
2.3 Crecimiento bacteriano.....	12
2.3.1 Ciclos y reducciones logarítmicas.....	13
2.3.1 Modelo de Monod.....	14
2.4 Acelga (<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>).....	14
2.5 Compuestos fenólicos.....	16
2.6 Irradiación.....	19
2.7 Limpieza ultrasónica.....	20
2.8 Antimicrobianos y agentes desinfectantes.....	22
3. Justificación	24
4. Objetivos	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos particulares.....	25
5. Diagrama de trabajo	26
6. Material y métodos	27
7. Metodología	28

7.1 Reactivación de microorganismos.....	28
7.2 Obtención, desinfección e inoculación de la acelga.....	28
7.3 Preparación y activación del ácido gálico por luz ultravioleta (UV-C)...	28
7.4 Inactivación de enterobacterias inoculadas en hojas de acelga mediante ácido gálico irradiado y sin irradiar a diferentes concentraciones	29
7.5 Limpieza ultrasónica como agente coadyuvante en la inactivación de enterobacterias inoculadas en hojas de acelga mediante ácido gálico irradiado y sin irradiar a diferentes concentraciones.....	29
7.6 Caracterización de microorganismos después del tratamiento.....	29
7.7 Descripción de la inactivación microbiana mediante modelos matemáticos.....	30
7.8 Análisis estadístico.....	30
8. Resultados y discusión.....	31
9. Conclusiones.....	39
10. Recomendaciones.....	40
11. Referencias.....	41

Índice de Figuras

Figura 1. Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> . Tomada de Basic biology of oral microbes, 2015.....	13
Figura 2. Acelga (<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>). Tomada de SADER, 2020.....	15
Figura 3. Variedades de acelga. Tomada de SADER, 2020.....	15
Figura 4. Grupo fenol. Tomada de Bowsher, 2008.....	17
Figura 5. Estructura del ácido gálico. Tomada de Govea Salas, 2013.....	18
Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células vegetativas antes y después de la cavitación. Tomada de Almaki, 2023.....	22
Figura 7. Diagrama de trabajo para la evaluación del efecto de la irradiación sobre la actividad antimicrobiana del ácido gálico contra enterobacterias en acelga (<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>).....	26
Figura 8. Efecto del tiempo de contacto con ácido gálico irradiado (0.015 M, 30 min irradiación) en la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>S. Typhimurium</i>	31
Figura 9. Efecto de la concentración y el tiempo de contacto con ácido gálico en la inactivación de <i>E. coli</i>	33
Figura 10. Efecto de la concentración y el tiempo de contacto con ácido gálico en la inactivación de <i>S. Typhimurium</i>	34
Figura 11. Efecto de la concentración de ácido gálico y sonicación sobre la inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en acelga.....	35
Figura 12. Efecto de la concentración de ácido gálico y sonicación sobre la inactivación de <i>S. Typhimurium</i> inoculada en acelga.....	36

Índice de Tablas

Tabla 1. Factores de virulencia especializados asociado a <i>E. coli</i>	6
Tabla 2. Especies y serovares de <i>Salmonella</i>	8
Tabla 3. Manifestaciones de <i>Salmonella tifoidea</i> y <i>Salmonella</i> no tifoidea.....	10
Tabla 4. Reducciones logarítmicas.....	14
Tabla 5. Ventajas y desventajas del uso de luz UV-C.....	19
Tabla 6. Reducciones logarítmicas de agentes desinfectantes.....	23
Tabla 7. Equipos empleados en la metodología.....	27
Tabla 8. Métodos y referencias que se utilizaron.....	27
Tabla 9. Parámetros del Modelo de Monod para la inactivación microbiana con ácido gálico de <i>E. coli</i>	35
Tabla 10. Parámetros del Modelo de Monod para la inactivación microbiana con ácido gálico de <i>S. Typhimurium</i>	36

Agradecimientos

La culminación de esta etapa es gracias a aquellas personas que me acompañaron en este camino que parecía interminable pero que afortunadamente tuvo fin.

Me gustaría agradecer primeramente a mi director y co-directora de tesis, el Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco y la Dra. Paola Hernández Carranza; que además de brindarme un espacio en el laboratorio de Bromatología, no solo me enseñaron a investigar, sino a pensar, dudar y volver a intentar. Gracias por cultivar en mí no solo el amor por la ciencia, sino el deseo de transmitirlo a las futuras generaciones.

A mis padres y hermanos, por su amor incondicional, su esfuerzo silencioso y su fe constante en mí.

A quienes ya no están, su recuerdo me sostuvo en los días difíciles y su amor sigue siendo mi guía.

Finalmente, gracias a los que estuvieron, a los que se fueron y a los que llegaron cuando más los necesitaba.

Resumen

La desinfección de hortalizas es una medida de bioseguridad alimentaria necesaria para mitigar riesgos biológicos eliminando agentes patógenos, sin embargo, una desinfección inadecuada causa Enfermedades transmitidas por alimentos que es un problema de salud común en la mayoría de la población.

La presente tesis investiga el efecto de la irradiación sobre la actividad antimicrobiana del ácido gálico contra las enterobacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium en acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*) con el fin de lograr la desinfección y reducir el crecimiento bacteriano utilizando luz UV-C y ultrasonido. Se prepararon cuatro concentraciones de ácido gálico 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 M que fueron irradiadas con luz UV-C, para posteriormente ser utilizadas para la desinfección de la acelga inoculada con las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium. El efecto del ácido gálico irradiado y de la limpieza ultrasónica se evaluó mediante pruebas microbiológicas, utilizando el método de vertido en placa en el agar EMB y Salmonella-Shigella, respectivamente para después realizar su conteo.

Los resultados obtenidos indican que muestras tratadas con ácido gálico irradiado más la limpieza ultrasónica como agente coadyuvante a la desinfección, tuvieron reducciones de ciclos logarítmicos mayores a las que no han sido tratadas con ultrasonido, tanto en hisopo como en hoja *E. coli* y *Salmonella* Typhimurium muestran que, a bajas concentraciones de ácido gálico, se logran mayores inactivaciones microbianas y a mayores concentraciones se presenta una resistencia al tratamiento.

Se concluye que la aplicación de ácido gálico irradiado con luz UV-C y con limpieza ultrasónica en acelga reduce el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella* Typhimurium contribuyendo a su desinfección.

1. Introducción

Hoy en día, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) constituyen el problema de salud pública más extendido en el mundo debido al consumo de alimentos que no han sido lavados y/o correctamente desinfectados, como lo son las hortalizas. Las ETAs son aquellas infecciones, intoxicaciones o toxiinfecciones causadas por bacterias, virus, parásitos, etc. o sus toxinas, donde el grupo de las enterobacterias, principalmente *Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium, son los principales patógenos que causan infecciones masivas y muertes. Por lo que, toma importancia el desinfectar correctamente alimentos que no tienen un proceso de cocción posterior, como lo es la acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*); una hortaliza con una producción de más de 12 mil toneladas y consumida todo el año en México.

Sin embargo, actualmente la actividad antimicrobiana de los desinfectantes de uso doméstico que contienen cloro y/o plata coloidal para la desinfección de agua y alimentos se ha visto inhibida debido al desarrollo de mecanismos de resistencia de las enterobacterias, por lo que se busca crear antimicrobianos naturales a partir de compuestos fenólicos, por ejemplo el ácido gálico, que han demostrado tener diversos efectos biológicos desde actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibiótica, hasta la protección cardiovascular y anticancerígena.

El uso del ácido gálico junto con la combinación de nuevas tecnologías como la irradiación UV-C; técnica analítica no destructiva en donde las moléculas de una muestra son irradiadas con luz ultravioleta de onda corta (UV-C) para inducir en ellas transiciones electrónicas, es decir, mover a los electrones a niveles de mayor contenido energético; y la limpieza ultrasónica; a través de ondas sonoras de alta frecuencia que son transmitidas a través de un líquido, lo agitan y provocan la cavitación de las moléculas desprendiendo contaminantes adheridos a la superficie; busca desinfectar a la acelga de las enterobacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium.

Por lo anterior expuesto, se busca evaluar el efecto de la irradiación y la limpieza ultrasónica sobre la actividad antimicrobiana del ácido gálico contra enterobacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium en acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*).

2. Antecedentes

2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las ETAs como enfermedades causadas por la contaminación de los alimentos, que se produce en cualquier etapa de la cadena de producción, suministro y consumo de estos. Los alimentos pueden estar infectados con microorganismos y agentes contaminantes, químicos, físicos y biológicos en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor (Zúñiga Carrasco & Caro Lozano, 2017).

Los patógenos transmitidos por los alimentos son la principal causa de infección masiva y muerte. Las bacterias transmitidas por los alimentos más representativas son *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella enterica* (*S. enterica*), *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) y *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) (Cheng et al., 2020).

La contaminación cruzada es una de las principales causas que pueden provocar brotes de ETAs, por lo que uno de los objetivos clave en los procesos de saneamiento es limitar la contaminación cruzada entre materiales alimentarios y equipos contaminados o viceversa (Cossu et al., 2016).

2.1.1 Tipos de ETAs por la Organización Panamericana de la Salud (PAHO)

2.1.1.1 Infección transmitida por alimentos

Resulta de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos patógenos vivos. Los síntomas son generalmente de tipo gastrointestinales; diarrea, cólicos, náuseas, vómitos acompañados de escalofríos, fiebre, ojos hinchados, visión doble, dificultades renales, etc. La cantidad de microorganismo ingerido puede ocasionar alteraciones más graves en otros órganos e incluso la muerte; algunos ejemplos de patógenos que provocan infecciones son *Salmonella*, *Shigella*, *Trichinella spirallis*, entre otros (Zúñiga Carrasco & Caro Lozano, 2017).

2.1.1.2 Intoxicación causada por alimentos

Resulta de la ingestión de toxinas que están presentes en el alimento ingerido, producidas por hongos o bacterias, aunque estos microorganismos ya no estén presentes en el alimento. Los síntomas comprenden náuseas, vómitos o diarrea, la intoxicación en la mayoría de los casos es leve y desaparece sin tratamiento; la toxina botulínica producida por *Clostridium botulinum* o la enterotoxina de *Staphylococcus aureus*, son algunos ejemplos (Zúñiga Carrasco & Caro Lozano, 2017).

2.1.1.3 Toxiinfección alimentaria

Es el resultado de las infecciones e intoxicaciones juntas. Son enfermedades causadas por microorganismos patógenos que se producen poco después ya sean horas o días, de haber consumido un alimento o bebida no aptos para el consumo. Estos tipos de ETAs afectan a toda la población, sin embargo, los grupos vulnerables son niños y personas ancianas, mujeres embarazadas, personas inmunodeprimidas, personas con cáncer, personas con órganos trasplantados (Zúñiga Carrasco & Caro Lozano, 2017).

Sin embargo, la sola presencia del patógeno no significa que la enfermedad ocurrirá y en la mayoría de los casos (Reyes Solórzano, 2017):

- I. El patógeno debe estar presente en cantidad suficiente como para causar una infección o para producir toxinas.
- II. El alimento debe ser capaz de sustentar el crecimiento de los patógenos, o sea, debe presentar características intrínsecas que favorezcan el desarrollo del agente.
- III. El alimento debe permanecer en la zona de peligro de temperatura durante tiempo suficiente como para que el organismo patógeno se multiplique y/o produzca toxina. Otras condiciones extrínsecas deben prevalecer para que esta multiplicación y/o producción de toxina sea favorecida.
- IV. Debe ingerirse una cantidad (porción) suficiente del alimento conteniendo el agente, para que la barrera de susceptibilidad del individuo sea sobrepasada.

2.2 Enterobacterias

2.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo, no formadora de esporas y flagelada, predominante de la flora colónica humana (Drasar & Hill, 1974).

El organismo normalmente coloniza el tracto gastrointestinal del bebé a las pocas horas de vida y, posteriormente, *E. coli* y el huésped obtienen beneficios mutuos (Drasar & Hill, 1974).

E. coli representa la causa más común de diarrea pediátrica en todo el mundo. Algunas cepas de *E. coli* han desarrollado la capacidad de causar enfermedades del sistema gastrointestinal, urinario o nervioso central incluso en los huéspedes humanos más robustos. Las cepas diarreógenas de *E. coli* se pueden dividir en al menos seis categorías diferentes con sus correspondientes esquemas patogénicos distintos (Nataro & Kaper, 1998).

Las cepas patógenas causan enfermedades intestinales en los humanos cuando se ingieren; *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) o *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) y *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC). En cuanto al mecanismo de daño, *E. coli* codifica diversos factores de virulencia (tabla 1), contenidos en sus plásmidos, bacteriófagos y transposones. Esta bacteria provoca toxiinfecciones (Mueller & Tainter, 2023).

Tabla 1. Factores de virulencia especializados asociado a *E. coli*

Patotipo	Adhesinas	Exotoxinas
ETEC	Antígenos del factor de colonización (CFA/I, CFA/II, CFA/III)	Toxina termolábil (LT-1); toxina termoestable (STa)
EPEC	Pili formadores de haces (Bfp): intimina	
EAEC	Fimbrias adherentes agregantes (AAF/I, AAF/II, AAF/III)	Toxina termoestable enteroagregante (EAST); toxina codificada por plásmidos (Pet)
EHEC	Bfp; intimina	Toxinas de Shiga (Stx-1, Stx-2)
EIEC	Antígeno del plásmido invasivo (Ipa)	Hemolisina (HlyA)
DAEC	Pili P; fimbrias Dr	

Fuente: Mueller & Tainter, 2023

ECEH/STEC al producir la toxina Shiga que incluye los serotipos O157:H7, ha sido responsable de grandes brotes de diarrea después de ingerir productos contaminados como espinacas, coles, lechuga, fruta, cuando los cultivos son fertilizados con estiércol, además de la carne de res poco cocida (común en carne molida) y el consumo de productos lácteos crudos. Inóculos relativamente bajos (102 UFC) provocan enfermedades, lo que facilita la transmisión del medio ambiente a los humanos y de humanos a humanos (Mueller & Tainter, 2023).

La Organización Mundial de la Salud informa que hay aproximadamente 2,8 millones de casos de infecciones por ECEH/STEC en todo el mundo a partir de 2014 (Mueller & Tainter, 2023).

Las recomendaciones dadas por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) para prevenir toxiinfecciones por *E. coli* son (Shane et al., 2017):

- Lavado de manos con agua y jabón.
- Seguir los cuatro pasos para la seguridad de los alimentos: limpiar, separar, cocinar y refrigerar para prevenir la contaminación cruzada.
- Hacer la cocción de la carne alcanzando la temperatura mínima segura de cocción (62.6°C – 70°C).
- No beber agua sin tratar.
- No comer masas, mezclas, alimentos crudos.
- Consumir leche y jugos pasteurizados.

En México, la NOM-113-SSA1-1994. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa establece al grupo de los coliformes como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas evaluando la calidad microbiológica de un producto alimenticio por medio de la técnica de cuenta en placa (SSA, 1994).

En la NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme reduciendo el número de microorganismos por unidad de volumen, para permitir, después de la incubación, la cuenta de colonias en placas (SSA, 1994).

El agar Eosina y Azul de Metileno (EMB) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. El uso de eosina Y y azul de metileno permite la diferenciación entre organismos fermentadores de lactosa y no fermentadores (Rodríguez Martínez & Zhurbenko, 2018).

La peptona proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. La sacarosa se agrega a la lactosa como un carbohidrato fermentable para detectar coliformes que fermentan la sacarosa más fácilmente que la lactosa. Los colorantes eosina Y y el azul de metileno son inhibidores parciales de bacterias Gram-positivas e indicadores de pH. Los coliformes que usan lactosa

y/o sacarosa producen colonias azul oscuro con centros oscuros y un brillo metálico verdoso (Rodríguez Martínez & Zhurbenko, 2018).

2.2.2 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. es parte de la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo acapsular, anaerobio facultativo, son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos, a excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum* (Herrera & Jabib, 2015).

El género se divide en dos especies, *Salmonella enterica* (*S. enterica*) y *Salmonella bongori*. *S. enterica* se divide en seis subespecies cada uno con varias serovariedades o serotipos presentados en la tabla 2 (Herrera & Jabib, 2015).

Tabla 2. Especies y serovares de *Salmonella*

Especie	<i>Salmonella enterica</i>					<i>Salmonella bongori</i>	
Subespecie	enterica	salamea	arizonae	diarizonae	houtenae	indica	
Número de serovares	1490	500	94	329	72	12	22

Fuente: Herrera & Jabib, 2015

Hasta la fecha se han identificado más de 2500 serotipos de *Salmonella* y más de la mitad de ellos pertenecen a *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, que representa la mayoría de las infecciones por *Salmonella* en humanos (Eng et al., 2015).

Casi todas las cepas de *Salmonella* son patógenas ya que tienen la capacidad de invadir, replicarse y sobrevivir en las células huésped humanas, lo que provoca una enfermedad potencialmente mortal, induciendo su propia fagocitosis para poder acceder a la célula huésped; gracias a las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI) (Eng et al., 2015).

Cuando las bacterias ingresan al tracto digestivo tienden a penetrar las células epiteliales que recubren la pared intestinal. Los SPI codifican sistemas de secreción de tipo III, proteínas multicanal que permiten a *Salmonella* inyectar sus efectores a través de la membrana de las células epiteliales intestinales hacia el citoplasma. Luego, los efectores bacterianos activan la vía de transducción de señales y

desencadenan la reconstrucción del citoesqueleto de actina de la célula huésped, lo que resulta en la extensión o pliegue hacia afuera de la membrana de la célula epitelial para engullir a las bacterias (Takaya et al., 2003).

La bacteria queda encerrada en una vacuola, compuesta por la membrana de la célula huésped. En circunstancias normales, la presencia del cuerpo extraño bacteriano activaría la respuesta inmune de la célula huésped, sin embargo, *Salmonella* utiliza el sistema de secreción tipo III para inyectar otras proteínas efectoras en la vacuola, provocando la alteración de la estructura compartimental. La vacuola remodelada bloquea la fusión de los lisosomas y esto permite la supervivencia intracelular y la replicación de las bacterias dentro de las células huésped (Eng et al., 2015).

La transmisión de *Salmonella* es a través de la ingestión de carne de las aves, huevos y productos derivados contaminados por las heces de un animal o de una persona infectada que, muy frecuentemente, ocasiona brotes de ETAs. *Salmonella*, no es parte de la flora intestinal normal de las aves, sino que lo adquieren en el ambiente en que viven. Otras fuentes de alimentos incluyen frutas y verduras frescas, y en general, animales como los cerdos, las aves de corral y el ganado vacuno, son las principales fuentes de infecciones por *Salmonella* cuando son consumidos crudos. El proceso de sacrificio de animales destinados al consumo en los mataderos se considera una de las fuentes importantes de contaminación de órganos y canales con *Salmonella* (Herrera & Jabib, 2015). La cantidad media de inóculo para producir una infección sintomática es de 10^6 - 10^9 microorganismos (Frías Salcedo, 2009).

Las cepas de *Salmonella* se agrupan en *Salmonella tifoidea* y *Salmonella* no tifoidea (NTS). En los humanos se presentan cuatro manifestaciones clínicas, fiebre entérica, gastroenteritis, bacteriemia y complicaciones extraintestinales, y un estado portador crónico (Tabla 3). Las infecciones por NTS, que causan una enfermedad autolimitada, son las infecciones por *Salmonella* más comunes y ocurren en todo el mundo. Por el contrario, la fiebre entérica, causada por *Salmonella tifoidea*, se

asocia con una alta tasa de morbilidad y mortalidad y ocurre predominantemente en países subdesarrollados (Eng et al., 2015).

Tabla 3. Manifestaciones de *Salmonella tifoidea* y *Salmonella* no tifoidea

Enfermedad	Agente etiológico	Transmisión	Síntomas
Fiebre entérica	<i>Salmonella tifoidea</i> : <i>Salmonella typhi</i> en fiebre tifoidea y <i>Salmonella paratyphi</i> A, B y C en fiebre paratifoidea.	Ingestión de alimentos o agua contaminados con desechos de personas infectadas.	Dolor de cabeza, dolor abdominal y diarrea (o estreñimiento), seguidos por la aparición de fiebre (patrón febril específico con una fiebre baja inicial que evoluciona lentamente a fiebre alta. También pueden desarrollar mialgia, bradicardia, hepatomegalia, esplenomegalia y manchas rosadas en el pecho y el abdomen.
Gastroenteritis	NTS	Por reservorios animales.	Diarrea no sanguinolenta, vómitos, náuseas, dolor de cabeza, calambres abdominales y mialgias. Las complicaciones incluyen colecistitis, pancreatitis y apendicitis.
Bacteriemia y complicaciones extraintestinales	Mayor frecuencia por NTS que por <i>Salmonella tifoidea</i>	Ingestión de alimentos o agua contaminados con desechos de personas infectadas.	La fiebre alta es el síntoma característico y puede provocar un shock séptico.
Estado portador crónico	<i>Salmonella tifoidea</i>	Ingestión de agua o alimentos contaminados con heces de portadores crónicos de <i>S. typhi</i> y <i>S. paratyphi</i> .	Asintomático pero hay eliminación de bacterias en las heces durante más de un año después de la fase aguda de la infección.

Fuente: Eng, 2015

Las recomendaciones dadas por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) para prevenir infecciones por *Salmonella* son limpiar, separar, cocinar y refrigerar los alimentos (Shane et al., 2017):

Limpiar

- Lavarse las manos antes y después de la manipulación de alimentos como huevo, carnes rojas y de ave o pescados y mariscos crudos y sus jugos.
- Lavar utensilios o trastes después de que hayan tenido contacto con alimentos crudos.
- No lavar los alimentos crudos, ya que pueden propagar los microorganismos.

Separar

- Separar las carnes, la carne de ave, los pescados y mariscos y los huevos crudos de los demás alimentos al comprarlos y guardarlos en el refrigerador.
- Mantener las carnes, la carne de ave, los pescados y mariscos crudos separados de los alimentos ya cocinados.
- Usar tablas de cortar y platos diferentes para las frutas y verduras, carnes, la carne de ave, los pescados y mariscos y los huevos.

Cocinar

- Hasta alcanzar una temperatura interna segura
- Los alimentos en el microondas hasta que estén bien cocidos.
- Cocinar huevos hasta que la yema y la clara estén firmes.

Refrigerar

- Mantener la temperatura del refrigerador en 4°C o menos.

En México, la NOM-114-SSA1-1994. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos; describe un esquema para la detección de *Salmonella* en 5 pasos básicos (SSA, 1994):

- Preenriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.
- Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

- Selección en medios sólidos, se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.
- Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.
- Serotipificación, técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

El agar Salmonella Shigella (SS) es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de estas especies. El extracto de carne y la mezcla de peptona proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. La lactosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía. La mezcla de sales biliares, el citrato de sodio y el verde brillante inhiben las bacterias Gram-positivas, la mayoría de las bacterias coliformes y *Proteus* spp., el rojo neutro es el indicador de pH (Rodríguez Martínez & Zhurbenko, 2018).

El tiosulfato de sodio y el citrato férrico permiten la detección de las bacterias productoras de H₂S. Las colonias de algunas cepas de *Salmonella* presentarán centros negros y un halo claro (Rodríguez Martínez & Zhurbenko, 2018).

2.3 Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano es el aumento del número de células en una población, ocurriendo principalmente a través de la fisión binaria, donde una célula madre se divide en dos hijas idénticas (Barer, 2012). Implica inocular un número determinado de bacterias en un medio líquido adecuado y verificar el número de células viables en diferentes intervalos de tiempo, las curvas de crecimiento se pueden dividir generalmente en cuatro secciones principales (Basic biology of oral microbes, 2015) (Fig.1):

1. Fase de latencia: Durante este proceso, las bacterias se adaptan a su nuevo entorno. El volumen de las células bacterianas aumenta y su metabolismo es activo, pero la división celular es lenta y la reproducción mínima.

2. Fase logarítmica: En este período, las bacterias crecen rápidamente y se dividen y reproducen a una velocidad constante. El número de bacterias aumenta exponencialmente y el número de células viables aumenta logarítmicamente.

3. Fase estacionaria: La tasa de crecimiento bacteriano disminuye gradualmente y el número de bacterias muertas aumenta. El número de bacterias recién producidas es aproximadamente igual al de bacterias moribundas, y el número de células viables se mantiene relativamente estable.

4. Fase de declive: El crecimiento bacteriano se ralentiza y se detiene, y el número de bacterias muertas supera al de células viables. Las células se vuelven polimórficas, presentando morfologías como deformación celular, hinchazón o autólisis.

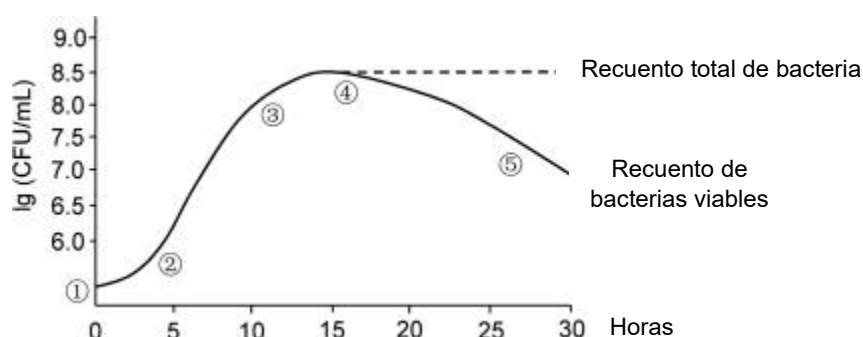


Figura 1. Curva de crecimiento de *Escherichia coli*. Tomada de Basic biology of oral microbes, 2015

2.3.1 Ciclos y reducciones logarítmicas

Un ciclo logarítmico (o unidad logarítmica) es una forma de medir cambios en una población bacteriana basándose en potencias de 10. El crecimiento de las bacterias es exponencial, se completa un ciclo logarítmico cuando la población pasa de 10^3 a 10^4 células, por ejemplo (El-Shorbagy, 2022).

Se habla de reducciones logarítmicas para medir que tan efectivo es un desinfectante o un proceso térmico. Una reducción de 1 log elimina el 90% de las bacterias, mientras que una reducción de 5 logs elimina el 99.999% siendo el estándar de oro (Goode, 2018).

Tabla 4. Reducciones logarítmicas

Reducción Logarítmica	Porcentaje de Reducción	Población restante (de 1,000,000)
1 Log	90%	100,000
2 Logs	99%	10,000
3 Logs	99.9%	1,000
4 Logs	99.99%	100
6 Logs	99.9999%	1

Fuente: Goode, 2018

2.3.2 Modelo de Monod

El modelo Monod fue propuesto por el Premio Nobel F. Monod en 1942. Se considera el modelo más utilizado en microbiología y su objetivo principal es describir el crecimiento microbiano y evaluar la cinética de biodegradación de la materia orgánica. Tres parámetros que caracterizan este modelo y permiten describir el crecimiento bacteriano son la tasa máxima de crecimiento específico, la constante de saturación y el coeficiente de rendimiento (El Bari, 2021).

Componentes clave del Modelo de Monod (Liu, 2017):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Ecuación 1}$$

μ : Velocidad específica de crecimiento.

$\mu_{m\acute{a}x}$: Velocidad específica de crecimiento máxima.

S: Concentración de sustrato limitante.

K_S : Constante de semisaturación (concentración de sustrato cuando $\mu = \mu_{m\acute{a}x} / 2$)

2.4 Acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*)

Es una planta herbácea bianual cultivada como anual (SIAP, 2023). Es una hortaliza que se encuentran en el mercado durante todo el año. En México se producen más de 12 mil toneladas anuales siendo Puebla el estado líder productor con más de 4 mil toneladas (SADER, 2020).

Para que se presente la floración necesita pasar por un período de temperaturas bajas. El vástago floral alcanza una altura promedio de 1.20 m. y las flores son sésiles y hermafroditas pudiendo aparecer solas o en grupos de dos o tres, el cáliz es de color verdoso y está compuesto por 5 sépalos y 5 pétalos. Las semillas son muy pequeñas y están encerradas (en grupos de 3 o 4) en un pequeño fruto al que comúnmente se le llama semilla (SIAP, 2023).

Los primeros informes que se tienen de esta hortaliza (Fig. 2) es que se encontraron en la región del Mediterráneo y desde entonces ha sido considerada como alimento básico de la nutrición humana al tener un sabor que recuerda a la tierra, se come tanto la hoja, como la penca o parte blanca (SADER, 2020).



Figura 2. Acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*). Tomada de SADER, 2020

Las hojas constituyen la parte comestible, las cuales son grandes, con forma ovalada; la penca puede presentar varios colores, desde el blanco hasta el rosa fuerte. Los limbos de las hojas son grandes y redondeados y en ocasiones recubren ligeramente los pecíolos hasta su base. Los colores de las hojas son variables, desde amarillos hasta verdes oscuros como se muestra en la Fig. 3. A medida que avanza la temporada, sus hojas se vuelven más amargas (SIAP, 2023).



Figura 3. Variedades de acelga. Tomada de SADER, 2020

Se consume fresca, sola o acompañada con otros alimentos. La industria agroalimentaria ofrece acelga procesada de distintas maneras: cortada, similar a la espinaca, fresca, en conserva o congelada; por pencas, por hojas o combinada con otros vegetales (SIAP, 2023).

La acelga es muy rica en fibra, contienen vitaminas A, B1, B3, B5, B6, B9, C, además de vitamina E y K, también es rica en minerales como calcio, sodio, potasio, y tiene contenido en cobre, hierro y fósforo. (SADER, 2020).

Su consumo aporta al cuerpo humano ácidos grasos como el Omega-3, luteína flavonoides, ácidos fenólicos, betacaroteno, y betalaínas como zeaxantina (SADER, 2020). Estos compuestos se distribuyen de forma desigual entre la hoja y la penca, los ácidos fenólicos como el ácido ferúlico, el ácido clorogénico y el ácido cafeico son los que predominan en la acelga actuando como defensores de la planta contra el estrés ambiental; los flavonoides que predominan son vitexina, isovitexina y quercetina (Pyo et al., 2004).

Al no ser lisa la superficie de la acelga, los patógenos se alojan en las pencas y las ramificaciones de las venas actuando como micro-oasis que protegen a las bacterias de la desecación; además son capaces de crear biopelículas adhiriéndose a las hojas de la acelga que las hace resistentes al lavado simple o desinfectantes como el cloro en bajas concentraciones (Macarisin et al., 2014). Las verduras de hoja verde como lechugas, espinacas o acelgas suelen consumirse crudas después de un proceso de lavado/desinfectado que pueden contaminarse a través del agua de riego, fertilizantes, etc. Los patógenos más comunes en las hortalizas son *E.coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* (Torres Armendáriz et al., 2016).

2.5 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso de metabolitos secundarios que se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilo (-OH), de reacción ácida, unidos a un anillo aromático (grupo fenol) como se observa en la Fig. 4. Los fenoles presentan comportamiento ácido dado que el oxígeno (-O) del grupo hidroxilo está fuertemente unido al anillo fenilo, mientras que el enlace relativamente débil entre

el -O y el hidrógeno (-H) permite la disociación de un protón (H^+) que puede ser liberado al medio, originando un ión fenolato cargado negativamente (Bowsher et al., 2008).

Se encuentran como metabolitos secundarios en diversos alimentos de origen natural como vegetales, hortalizas y frutas, por lo que ingresan al organismo por medio de la dieta (Govea Salas et al., 2013).

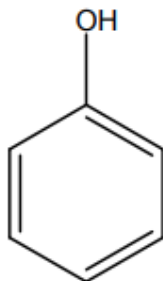


Figura 4. Grupo fenol. Tomada de Bowsher, 2008

Los polifenoles se subdividen en taninos condensados (flavonoides, proantocianidinas) y taninos hidrolizables (elagitaninos y galotaninos); estos compuestos inhiben la oxidación de sustratos, moléculas simples y complejas (Bravo, 1998).

Los taninos son una variedad de polifenoles vegetales, se caracterizan por ser compuestos solubles en agua. Como el resto de los compuestos fenólicos, los taninos son químicamente reactivos, capaces de formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, son sustancias fácilmente oxidables. La actividad biológica de los taninos se correlaciona con su capacidad de unirse a las proteínas y combinarse con enzimas (Viña, 2020).

El crecimiento de diversos hongos, levaduras y bacterias resulta inhibido por los taninos. El mecanismo de acción se vincula con la capacidad de estas sustancias de inactivar a las enzimas, y a las proteínas en general, de los microorganismos. La infección de células vegetales se inicia frecuentemente con la secreción de enzimas microbianas que causan la lisis de las paredes celulares de las plantas. Estas enzimas pueden ser inactivadas cuando los taninos se unen a ellas (Heldt & Heldt, 2005).

El ácido gálico también conocido como ácido 3, 4,5-trihidroxibenzoico (Fig. 5) es un tanino y un ácido fenólico. Se encuentra en la naturaleza en plantas, frutas y verduras, así como bebidas (Govea Salas et al., 2013).

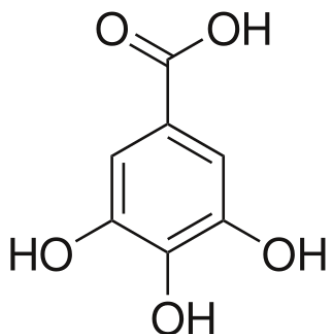


Figura 5. Estructura del ácido gálico. Toma de Govea Salas, 2013

Se le atribuyen varios efectos biológicos, que van desde la actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibiótica, hasta la protección cardiovascular y anticancerígena. Siendo la actividad antibiótica la más importante en este trabajo (Govea Salas et al., 2013).

En 1999, se mencionó que el ácido gálico presenta actividad antibacterial, promoviendo la inhibición enzimática de algunos microorganismos, la interacción sobre las adhesinas (proteínas de la pared celular), y la capacidad que tienen de unirse a polisacáridos, interviniendo así, en el desarrollo microbiano (Cowan, 1999).

La actividad antimicrobiana del ácido gálico puede aumentar con la aplicación de luz ultravioleta debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y compuestos fotooxidados (Luna-Domínguez et al., 2023); gracias a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura, teniendo la capacidad de interactuar con las membranas y otros sitios activos de las células bacterianas (Govea Salas et al., 2013).

Para años posteriores, se informa que las luces UV-A y UV-C aumentaron la actividad antimicrobiana de ácido gálico contra *E. coli* O157:H7, la irradiación con luz UV-A y UV-C de ácido gálico (15 mM) durante 30 minutos aumentó la capacidad antimicrobiana, logrando una reducción de 4,4 y 3,2 log UFC/mL, respectivamente (Wang et al., 2017 & Wang et al., 2019).

2.6 Irradiación

Técnica analítica no destructiva en donde las moléculas de una muestra son irradiadas con luz ultravioleta (UV) para inducir en ellas transiciones electrónicas. El proceso de transición, excitación o promoción electrónica consiste en transferir, transitoriamente, a los electrones de una molécula a un nivel de mayor contenido energético (García Fabila, 2016).

La luz UV-C (200 y 280 nanómetros) es un tratamiento no térmico ampliamente utilizado para desinfectar agua y superficies, se considera germicida contra microorganismos como bacterias, virus, protozoos, levaduras, mohos y algas (Koutchma et al., 2016). A continuación, en la tabla 5 se presentan sus ventajas y desventajas.

Tabla 5. Ventajas y desventajas del uso de luz UV-C

Característica	Ventajas	Desventajas
Eficacia	Mata el 99.9% de patógenos, incluidos los que son resistentes a antibióticos.	Requiere una "línea de visión" directa. Si hay sombras o rugosidades, los microorganismos sobreviven.
Residuos	Es un método físico, no químico. No deja residuos, olores, ni subproductos tóxicos en el agua o aire.	No tiene efecto residual, una vez que se apaga la lámpara.
Mantenimiento	Las lámparas modernas (LED o mercurio) tienen vidas útiles largas (hasta 10,000 horas).	La suciedad y el polvo en la lámpara bloquean los fotones. Requiere limpieza constante del tubo de cuarzo.
Velocidad	La desinfección es casi instantánea (segundos o minutos) dependiendo de la potencia.	La eficacia depende de la distancia. Si el objeto está lejos, la intensidad cae drásticamente.
Seguridad humana	No hay riesgo de quemaduras químicas o intoxicación por ingesta de desinfectantes.	Es peligrosa para la piel y ojos. Puede causar eritemas (quemaduras) y fotoqueratitis.

Costo operativo Bajo consumo eléctrico en Inversión inicial alta y los materiales comparación con sistemas de como plásticos o gomas se degradan. filtración masiva o químicos industriales.

Fuente: IUVA, 2021 y CDC, 2017

Los ácidos nucleicos de los microorganismos absorben la radiación de forma máxima en una longitud de onda cercana a los 260 a 265 nm, los fotones son absorbidos por la timina en el DNA creando un dímero de timina deformando la doble hélice y el uracilo en el RNA (Sinha et al., 2002).

Se ha observado el efecto bactericida de algunos polifenoles fotoirradiados como el ácido gálico, cafeico y proantocianidina mediante luz azul contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Nakamura et al., 2015). Y se ha demostrado recientemente que el ácido gálico irradiado con UV-C exhibió mayor actividad antimicrobiana contra *E.coli* O157:H7 debido a la generación de ROS y compuestos fotooxidados (quinona) durante la exposición a la luz UV-C, demostrando que este compuesto fenólico tiene potencial para aplicarse como un antimicrobiano natural en verduras y frutas (Wang et al., 2019).

Por otro lado, Cossu ha demostrado que hay una interacción sinérgica entre la luz UV-A y el ácido gálico para inactivar a *E.coli* O157:H7 en espinacas, por lo tanto, es un tratamiento eficaz para la desinfección de productos frescos a un bajo costo, escalabilidad y sin toxicidad. Las soluciones de ácido gálico pueden reciclarse por 3 ciclos de tratamiento UV-A sin que haya una pérdida significativa de su efecto antibacteriano (Cossu et al., 2016).

2.7 Limpieza ultrasónica

La limpieza ultrasónica por medio del equipo que es el limpiador ultrasónico, funciona a través de ondas sonoras de alta frecuencia aproximadamente 20 a 120 kHz, que son transmitidas a través del líquido, lo agitan y provocan la cavitación de las moléculas (Muqbil et al., 2005).

La cavitación se forma cuando la energía sónica crea un vacío y queda atrapada como una burbuja en un líquido, estas burbujas son microscópicas e implosionan

con tal fuerza que los contaminantes adheridos a la superficie que se está limpiando, se desprenden; este tipo de limpieza elimina contaminantes muy adheridos en grietas, huecos y lugares ciegos (Vijigiri & Krishna, 2014).

La limpieza ultrasónica es más eficaz a comparación de lavar con las manos (Muqbil et al., 2005). Sin embargo, la combinación de la limpieza ultrasónica más un desinfectante, resulta en una desinfección mayor que una ultrasonicación por sí sola ya que ésta no provocó una muerte significativa de las bacterias. Y demostró que la sonicación puede actuar como un poderoso agente sinérgico para aumentar la eficacia del desinfectante (Jatzwauk et al., 2001).

Así mismo, la distribución de las cavitaciones en un baño de ultrasonidos no es homogénea (Jatzwauk et al., 2001). Por otro lado, la aplicación de un agente de remojo antes de la limpieza ultrasónica produjo el régimen de limpieza de instrumentos dentales más eficaz, esto puede extrapolarse a la industria alimentaria en la desinfección de hortalizas remojando previamente con ácido gálico y después realizar la limpieza ultrasónica, realizar uno solo de los procedimientos es menos efectivo que combinarlos (Walker et al., 2006).

Algunos efectos de la cavitación en las membranas bacterianas incluyen ondas de choque, microchorros y altas fuerzas de choque que debilitan o desgarran la membrana; microcorrientes que causan cizallamiento y pequeñas áreas con temperaturas extremadamente altas afectando la integridad de las membranas y con mayor susceptibilidad a ROS (Mojca Zupanc et al., 2019). En la Fig. 6 se observa que la morfología celular de las células vegetativas pretratamiento tenía forma de bastón, era larga y redondeada. Las células postratamiento, bajo los mismos parámetros, presentaban una clara distorsión desintegrándose en varios fragmentos, acortándose y presentando dimensiones irregulares. Además, algunas investigaciones han indicado cambios estructurales similares en las células tras la ultrasonicación en otros organismos, como *Escherichia coli* (Almalki et al., 2023).

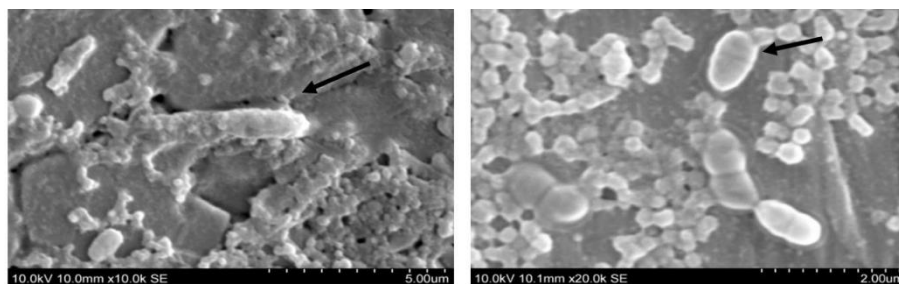


Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células vegetativas antes y después de la cavitación. Las flechas indican la morfología de las células vegetativas antes (Izquierda) y después de la cavitación (Derecha). Tomada de Almalki, 2023

2.8 Antimicrobianos y agentes desinfectantes

Los antimicrobianos son sustancias terapéuticas que se utilizan para prevenir o tratar infecciones. Los desinfectantes son agentes antimicrobianos que se aplican a superficies no vivas (Di Martino, 2022). Los antimicrobianos pueden eliminar microorganismos o prevenir su crecimiento al actuar sobre etapas clave del metabolismo celular, como la síntesis de macromoléculas biológicas, la actividad de las enzimas celulares o estructuras celulares como la pared celular y las membranas celulares (Pursell, 2020; Di Martino, 2022).

Cada año, se liberan al medio ambiente, varios miles de toneladas de antimicrobianos y sus subproductos, teniendo consecuencias ecológicas en el entorno natural, en entornos tecnológicos como las plantas de tratamiento de aguas residuales (Di Martino, 2022) así mismo a la salud como el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos y a la propagación de determinantes genéticos de resistencia (Flores-Vargas, 2021).

La desinfección da lugar a la reducción del número de microorganismos vivos, generalmente no mata las esporas bacterianas. Un desinfectante eficaz reduce el número de microorganismos a un nivel que no perjudica la salud (Secretaría de Salud, 1999). Entre las formulaciones comerciales para desinfectar agua y alimentos, se encuentran las que contienen plata coloidal, compuestos clorados, compuestos limpiadores y extractos cítricos (PROFECO, 2001).

- Plata coloidal: La plata en su forma coloidal es eficaz para eliminar diversas bacterias, consiste en una combinación de partículas metálicas de plata y una cubierta proteica. Contiene grandes partículas de plata que no pueden permanecer suspendidas en el sustrato en el que se encuentran, por lo que necesitan de un aditivo proteico el cual evite que estas sedimenten, el más común es la grenetina; creando un riesgo de contaminación bacteriana (Secretaría de Salud, 2015).
- Compuestos clorados. Contienen compuestos como hipoclorito de sodio, clorato de sodio y/o dióxido de cloro; atacan la pared celular de los microorganismos, pero tienen un efecto residual que puede actuar evitando la recontaminación; la efectividad del producto dura hasta que el cloro residual se agota (Secretaría de Salud, 1999).

Tabla 6. Reducciones logarítmicas de agentes desinfectantes

Desinfectante	Reducción Logarítmica	Porcentaje de Eliminación	Objetivo Principal
Cloro	3-log a 4-log	99.9% - 99.99%	Bacterias y virus
Plata Coloidal	2-log a 3-log	99% - 99.9%	Bacterias

Fuente: PROFECO, 2001

Debido a la alta concentración de grandes partículas de plata, se sabe que los productos a base de plata proteica causan argiria, una condición anormal que causa que la piel se torne gris-azulosa. La exposición aguda a concentraciones altas (pero no letales) de cloro pueden dar lugar a edema pulmonar, o liquido en los pulmones (Secretaría de Salud, 2015).

Como menciona Di Martino, el futuro de los antimicrobianos reside en el desarrollo de moléculas de origen biológico o bioinspiradas.

3. Justificación

Actualmente, se ha visto que los antimicrobianos de uso doméstico hechos de plata coloidal y/o cloro, utilizados para la desinfección de agua y alimentos, no son totalmente eficaces debido a la inhibición de su actividad antimicrobiana por el desarrollo de mecanismos de resistencia de las enterobacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*; por lo tanto, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) aumentan con el riesgo de que la población las contraiga y en casos graves, provoque la muerte por una mala limpieza y/o desinfección de los alimentos. Así mismo, se han reportado casos donde personas que utilizan plata coloidal y cloro, son propensas a desarrollar daños dermatológicos (argiria), daños en pulmones y daños a nivel de Sistema Nervioso como convulsiones; por las razones antes mencionadas, se pretende crear antimicrobianos de tipo naturales con una mayor eficacia y seguridad en su uso, utilizando al ácido gálico, un compuesto fenólico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en la acelga debido a la capacidad de inactivar proteínas de tipo bacterianas; todo esto en conjunto, ayudará a aumentar la calidad de vida de la población evitando a las ETAs al consumir acelga, una hortaliza que generalmente se consume cruda en diferentes platillos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de la irradiación y la limpieza ultrasónica sobre la actividad antimicrobiana del ácido gálico contra enterobacterias en acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*).

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la concentración de ácido gálico irradiado y sin irradiar sobre *Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium inoculado en acelga.
- Evaluar el efecto del ultrasonido como agente coadyuvante al ácido gálico irradiado en la inactivación de *E. coli* y *S. Typhimurium* inoculado en acelga.
- Evaluar el efecto del tiempo de irradiación y el tiempo de contacto con ácido gálico para la inactivación de *E. coli* y *S. Typhimurium* en acelga.

5. Diagrama de trabajo

En la figura 7 se presenta el diagrama de trabajo que se llevó a cabo durante la investigación.

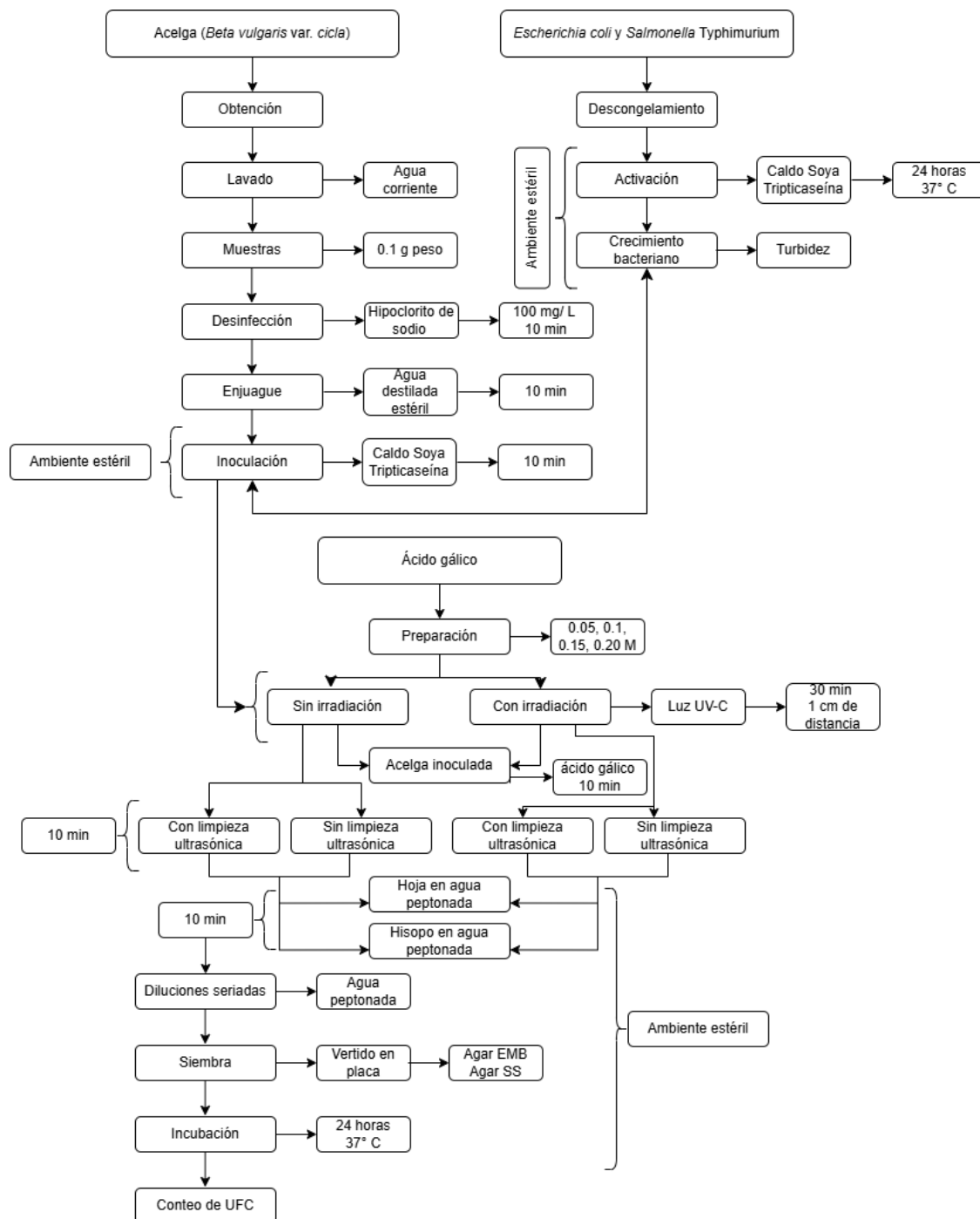


Figura 7. Diagrama de trabajo para la evaluación del efecto de la irradiación y la limpieza ultrasónica sobre la actividad antimicrobiana del ácido gálico contra enterobacterias en acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*).

6. Material y métodos

- Material de vidrio: el requerido para las determinaciones.
- Material biológico: Acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*), cultivos de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), cepas obtenidas del Laboratorio Bioquímica-Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas.
- Reactivos: ácido gálico y los necesarios para cada determinación.

En la tabla 7 se muestran los equipos con los que se trabajó y en la tabla 8 se muestran los métodos que se emplearon.

Tabla 7. Equipos empleados en la metodología.

Equipo	Marca	Modelo
Cuenta colonias	SOL-BAT	QUEBEC Q-20
Limpiador ultrasónico	VEVOR	ULTRASONIC CLEANER
Lámpara UV	Hidrotec	UV-12 W
Incubadora	SEV-PREND0	INO-650 M
Autoclave	AESA	CV300
Balanza analítica	Ohaus – Serie Pioneer	PA 224C
Parilla	Fisher Scientific	Isotemp

Tabla 8. Métodos y referencias que se utilizaron.

Métodos	Referencias
Preparación de medios de cultivo	Manual o instructivo de medios de cultivo de la casa comercial
Esterilización	Norma ISO 17665 NOM-110-SSA1-1994
Diluciones seriadas	NOM-110-SSA1-1994
Vertido en placa	NOM-113-SSA1-1994
Conteo de UFC	NOM-113-SSA1-1994 NOM-114-SSA1-1994
Irradiación con UV	Wang et al., 2017
Hisopado	Luna-Dominguez et al., 2023

7. Metodología

Según lo indicado en el diagrama de trabajo, la metodología que se implementó se detalla a continuación.

7.1 Reactivación de microorganismos

Se llevó a cabo la reactivación de las cepas de los microorganismos de interés que se encontraban congeladas (*Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*) en 9.9 mL de caldo Soya Trypticaseína, el caldo previamente esterilizado fue inoculado con 0.1 mL de la enterobacteria de interés, posteriormente se incubaron en una estufa de cultivo durante 24 horas a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; pasado este tiempo, se revisó que el caldo presentara turbidez indicativo de crecimiento bacteriano.

7.2 Obtención, desinfección e inoculación de la acelga

La hortaliza acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*) se obtuvo del mercado local, con las características de color de la hoja verde homogéneo, libre de daños físicos y microbiológicos en apariencia. La acelga se lavó con agua de la llave para quitar restos de tierra, se dejaron secar al aire libre y posteriormente se cortaron las hojas que serán las muestras, con un peso de 0.1 g, para después realizar la desinfección con una solución de NaClO en agua destilada siguiendo las instrucciones de la etiqueta (100 mg/ L durante 10 minutos); se enjuagó con 9.9 mL de agua destilada estéril para cada muestra durante 10 min para quitar restos de cloro; posteriormente se inoculó con el microorganismo de interés colocándola en el caldo soya tripticaseína durante 10 minutos, las hojas se escurrieron para su uso posterior.

7.3 Preparación y activación del ácido gálico por luz ultravioleta (UV-C)

Se realizaron cuatro concentraciones de ácido gálico (0.05, 0.1, 0.15 y 0.20 M) para posteriormente ser activadas por irradiación de luz UV-C usando una lámpara con una intensidad de irradiación de $4360 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. De cada concentración se tomaron 9.9 mL, se irradiaron durante 30 minutos a 1 centímetro de distancia y se utilizaron inmediatamente para evaluar la actividad antimicrobiana contra *S. Typhimurium* y *E. coli* en acelga.

7.4 Inactivación de enterobacterias inoculadas en hojas de acelga mediante ácido gálico irradiado y sin irradiar a diferentes concentraciones

Se evaluó el efecto del ácido gálico con irradiado o sin irradiar contra *S. Typhimurium* y *E. coli*; las hojas inoculadas que anteriormente se escurrieron se colocaron en contacto con 9.9 mL de solución de ácido gálico (0.05 – 0.2 M) irradiado o sin irradiar durante 10 minutos.

Posterior a este tiempo, las hojas se colocaron en 9.9 mL de agua peptonada estéril o se hisopó, ese hisopo se colocó en 9.9 mL de agua peptonada durante 10 minutos. Después se diluyó en serie hasta obtener un recuento adecuado en 9 mL de agua peptonada (30-300 UFC/ mL).

7.5 Limpieza ultrasónica como agente coadyuvante en la inactivación de enterobacterias inoculadas en hojas de acelga mediante ácido gálico irradiado y sin irradiar a diferentes concentraciones

Se utilizó la misma metodología del punto 7.4, sin embargo, se agregó el uso del limpiador ultrasónico que se caracteriza por el fenómeno de cavitación promoviendo una limpieza profunda. Cuando las hojas de acelga fueron colocadas en el ácido gálico irradiado y sin irradiar inmediatamente se colocan dentro del limpiador ultrasónico a 120 W y una frecuencia de 40 kHz con agua fría durante 10 minutos

Posteriormente, como se mencionó en el punto 7.4 las hojas se colocaron en 9.9 mL de agua peptonada estéril o se hisopó, ese hisopo se colocó en 9.9 mL de agua peptonada durante 10 minutos. Después se diluyó en serie hasta obtener un recuento adecuado en 9 mL de agua peptonada (30-300 UFC/ mL).

7.6 Caracterización de microorganismos después del tratamiento

Después de realizar las diluciones seriadas, se tomaron muestras de 1 mL para sembrar por la técnica de vertido en placa, para *E. coli* las diluciones que se sembraron fueron 10^{-2} y 10^{-3} y para *S. Typhimurium* se sembró directamente y 10^{-1} ; con 7 mL del agar utilizado. Se inocularon por cada determinación cuatro cajas Petri y sus duplicados.

Se determinó la presencia de *E. coli* y *S. Typhimurium* usando como medios de cultivo agar EMB y agar Salmonella - Shigella respectivamente, todas las placas se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, de manera invertida (boca abajo). Finalizado el tiempo de incubación para cada microorganismo, se contabilizaron las colonias típicas empleando un contador de colonias, y se reportó la población como unidades formadoras de colonia (UFC/mL).

7.7 Descripción de la inactivación microbiana mediante modelos matemáticos

Se ajustó la cinética de inactivación microbiana del ácido gálico a diferentes concentraciones contra *E. coli* y *S. Typhimurium* inoculados en hojas de acelga, modificando el modelo de Monod (ecuación 1), donde N_0 y N son las cargas microbianas sin y en cada concentración de ácido gálico (UFC/g) respectivamente, S es la concentración de ácido gálico (M), μ es la reducción logarítmica máxima y K es la concentración de ácido gálico (M) donde se alcanza la mitad de la reducción logarítmica máxima.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = \frac{\mu \times S}{K + S} \quad \text{Ecuación 2}$$

7.8 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados se analizaron mediante comparación de medias ($\alpha = 0,05$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando la prueba de Tukey del software Minitab v.14

8. Resultados y discusión

En la Figura 8 se presenta el efecto del tiempo de contacto con ácido gálico irradiado sobre la inactivación de *E. coli* y *S. Typhimurium*. Se observa una reducción microbiana de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos después de 30 minutos de contacto con ácido gálico irradiado 0.15 M. Donde en los primeros 5 a 10 minutos de contacto se obtiene la mayor inactivación microbiana, posteriormente se observa que no hay un efecto en las reducciones microbianas en el tiempo restante de contacto. La bacteria *S. Typhimurium* es más resistente al tratamiento, obteniendo menor inactivación después de 30 minutos comparado con la bacteria *E. coli*. Esto se debe a que *S. Typhimurium* podría retrasar su muerte debido a que constituyentes de la membrana celular y constituyentes intracelulares de las bacterias que mueren primero, protegen del tratamiento a las bacterias restantes. La inactivación no es lineal, ya que se observa el efecto de cola, es decir, los microorganismos se hacen resistentes al tratamiento conforme el tiempo de contacto avanza.

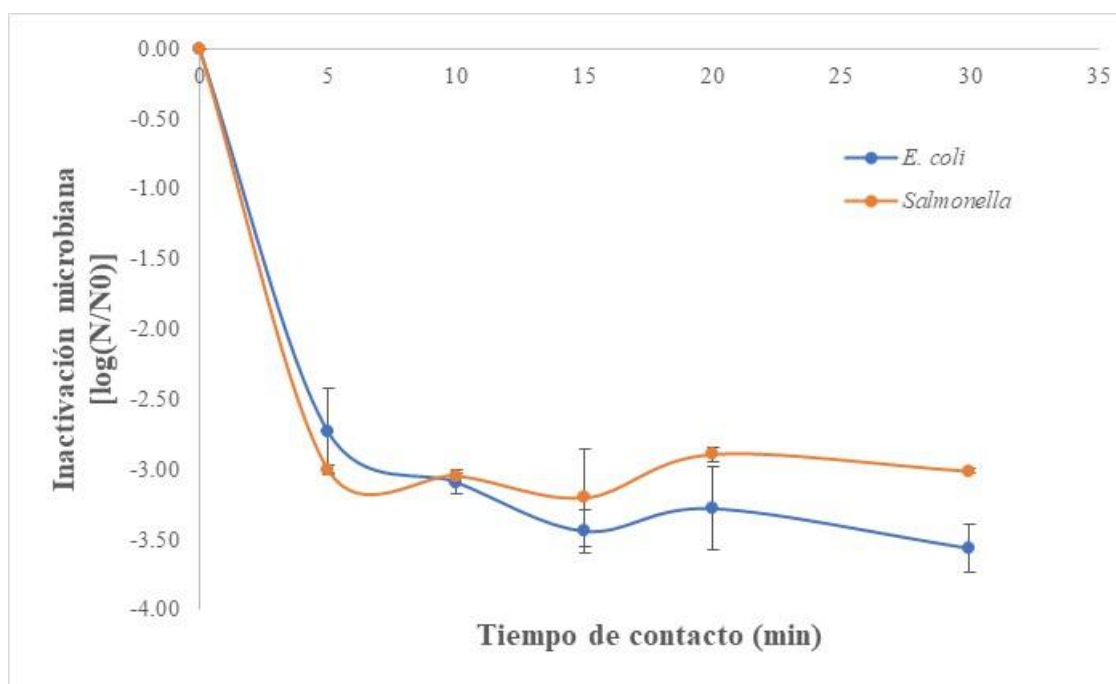


Figura 8. Efecto del tiempo de contacto con ácido gálico irradiado (0.15 M, 30 min irradiación) en la inactivación de *E. coli* y *S. Typhimurium*.

El ácido gálico tiene una baja actividad antimicrobiana por sí sólo, sin embargo, cuando se irradia con luz UV-C aumenta debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y compuestos fotooxidados (Luna-Domínguez et al., 2023); gracias a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura, teniendo la capacidad de interactuar con las membranas y otros sitios activos de las células bacterianas incluyendo el DNA (Govea Salas et al., 2013); esto es lo que ocurre en los primeros 10 minutos de contacto, pasado este tiempo, de acuerdo con Humpheson et al. (1998) que estudiaron la curva de inactivación térmica de *Salmonella enteritidis* PT4, concluyeron que la inducción de la cola se debía principalmente a la síntesis de proteínas de novo. Adicionado que los constituyentes de la membrana celular e intracelulares de *Salmonella* que mueren primero, protegen del tratamiento a las bacterias restantes. La cola que presenta *E. coli* al tratamiento es igualmente a la síntesis de proteínas de novo inducidas por el estrés (Noma, 2006).

Los resultados obtenidos se pueden comparar con los obtenidos por Luna-Domínguez et al., 2023 para *E. coli*, donde se han ocupado parámetros similares a este trabajo, reportaron que a menor tiempo de contacto (más una baja concentración microbiana y menor concentración de ácido gálico irradiado), se obtienen más de 5 reducciones logarítmicas. Mientras que en este trabajo se han obtenido 3 reducciones logarítmicas en los primeros 10 minutos.

En la Figura 9 se presenta el efecto de la concentración y el tiempo de contacto con ácido gálico en la inactivación de la bacteria *E. coli*. Se observa que en las cuatro concentraciones empleadas 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M y 0.2 M de ácido gálico se logran reducciones de más de 3 ciclos logarítmicos en el tiempo de 5 minutos del tratamiento, siendo que en las concentraciones 0.15 y 0.2 M se obtienen las mayores inactivaciones microbianas; en la concentración 0.15 M hay una reducción microbiana de aproximadamente 5 ciclos logarítmicos en 5 minutos y posteriormente en la concentración 0.2 M ésta se obtiene en la mitad del tiempo, 2.5 minutos. En el tiempo corto de 0.5 min se observa que a partir de la concentración de 0.15 M no hay efecto de la concentración, deteniéndose en 4

ciclos logarítmicos aproximadamente. Para la concentración 0.25 M en 2.5 y 5 min, se observa que ya no hay efecto en *E. coli* debido a la resistencia al tratamiento.

En la Figura 10 se presenta el efecto de la concentración y el tiempo de contacto con ácido gálico en la inactivación de la bacteria *S. Typhimurium*. Se observa que en los tiempos cortos de 2.5 min de las concentraciones empleadas 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M y 0.2 M no hay más de 2 ciclos logarítmicos de reducción microbiana; para los tiempos de 5 min a partir de la concentración 0.15 M se logran más de 3 ciclos logarítmicos, donde en la concentración 0.20 M se obtiene la mayor inactivación microbiana de más de 5 ciclos logarítmicos. Posteriormente para los tiempos de 10 min, existe un aumento constante en la inactivación microbiana alcanzando una reducción mayor a 4 ciclos logarítmicos, sin embargo, en la concentración 0.25 no existe un efecto en *S. Typhimurium* ya que en los tiempos 5 y 10 min, las reducciones logarítmicas son las mismas de más de 5 ciclos debido a la resistencia al tratamiento.

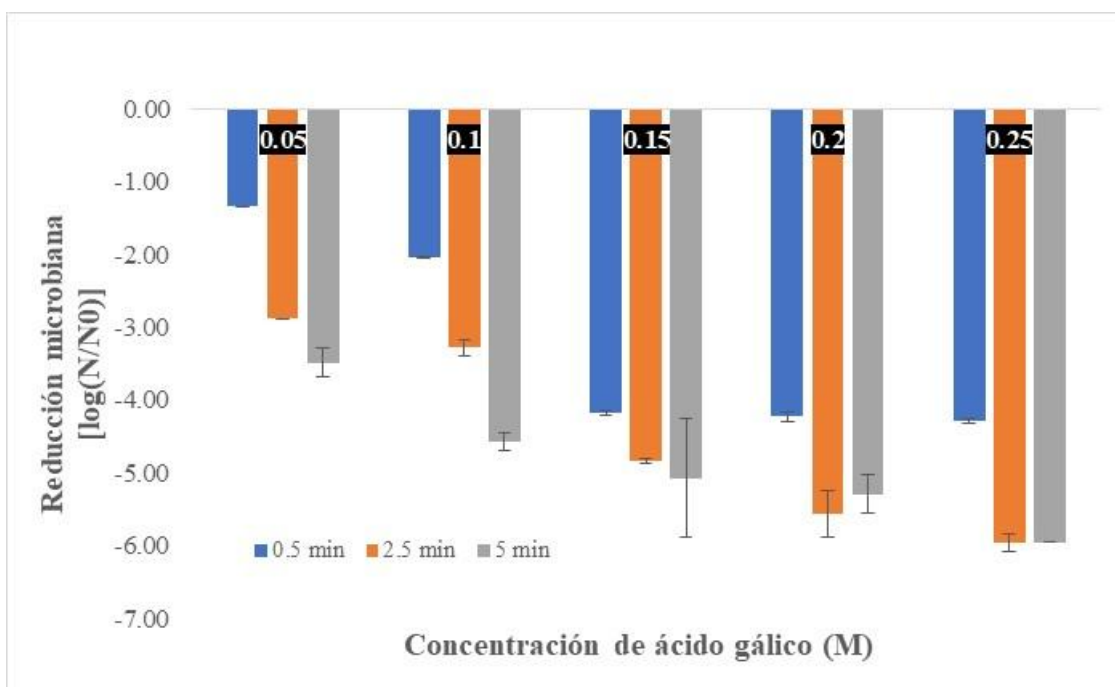


Figura 9. Efecto de la concentración y el tiempo de contacto con ácido gálico en la inactivación de *E. coli* (1×10^7 CFU/mL).

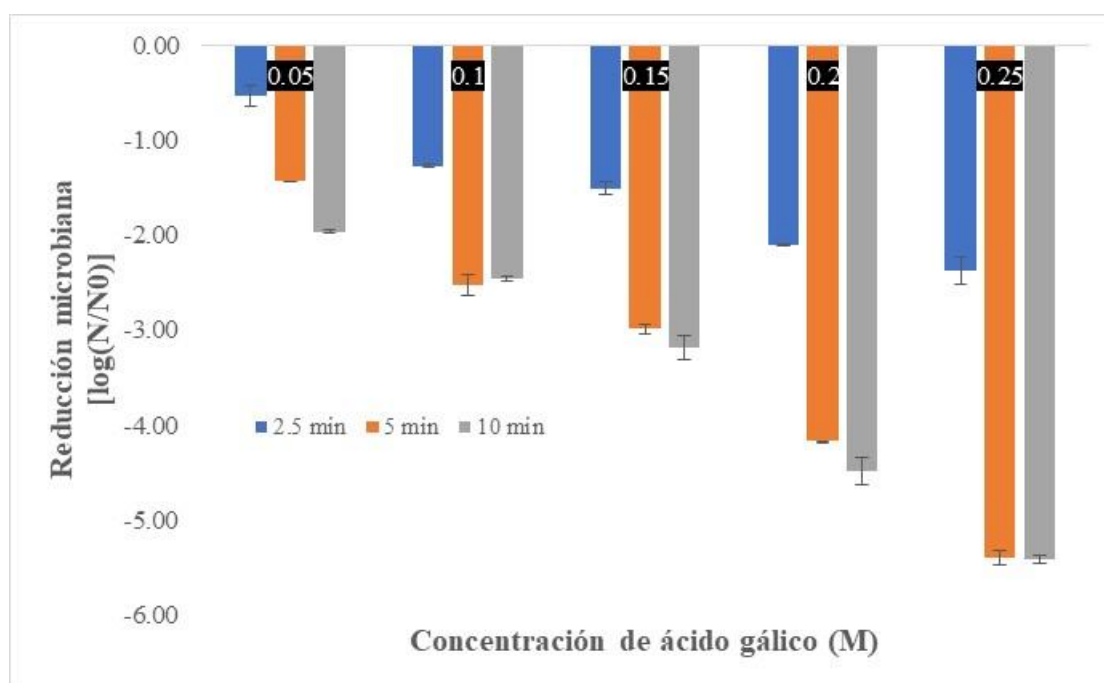


Figura 10. Efecto de la concentración y el tiempo de contacto con ácido gálico en la inactivación de *S. Typhimurium*

Como ya se mencionó anteriormente, cuando el ácido gálico es irradiado con luz UV-C su actividad antimicrobiana aumenta lo que conlleva a la generación de ROS y compuestos fotooxidados (Luna-Domínguez et al., 2023); la resistencia de *E. coli* al tratamiento se debe a la síntesis de proteínas de novo inducidas por el estrés (Noma, 2006). Un estudio hecho por Kim & Lee en 2021, indican que *E. coli* entre otros microorganismos cuando entran en contacto con agentes tóxicos, se detecta una muerte celular programada similar a la apoptosis donde se producen daños en el DNA, producción de una proteína similar a caspasa, contracción celular y despolarización de la membrana. Por otro lado, *Salmonella* spp. ha desarrollado una sólida respuesta antioxidante para sobrevivir al estrés del medio ambiente; esta bacteria responde con un robusto sistema de reparación del ADN como reparación de bases (deoBCD), reparación de desajustes de bases únicas (dinIG), reparación temprana de roturas de doble hebra (yebG), reparación de múltiples roturas de doble hebra (recAN) y replicación del ADN (polB, dinP). Así como sistemas de reparación de proteínas codificando proteínas de choque térmico (Liu et al., 2020).

Para la Figura 9 y 10, los resultados obtenidos se pueden comparar con los obtenidos por Luna-Domínguez et al., 2023; para *E. coli*, donde se han ocupado parámetros similares a este trabajo, reportaron que el aumento de la concentración de ácido gálico aumentó la reducción microbiana de *E. coli*, que también se puede observar en *S. Typhimurium*. *Salmonella* podría retrasar su muerte debido a que constituyentes de la membrana celular y constituyentes intracelulares de las bacterias que mueren primero, protegen del tratamiento a las bacterias restantes (Humpheson et al. 1998), esta enterobacteria además muestra resistencia a los desinfectantes al formar biopelículas en superficies bióticas y abióticas (Ohashi et al., 2022). Cossu et al., 2016 demostró que hay una interacción sinérgica entre la luz UV-A y el ácido gálico para inactivar a *E. coli* O157:H7 en espinacas, por lo tanto, es un tratamiento eficaz para la desinfección de productos frescos a un bajo costo, escalabilidad y sin toxicidad, examinó cómo 10 mM de ácido gálico combinados con luz UV-A logran una reducción de >5 log (inactivación casi total) en un tiempo de contacto de 30 minutos.

Tabla 9. Parámetros del Modelo de Monod para la inactivación microbiana con ácido gálico de *E. coli*.

Aplicación	Tratamiento	μ [log(N/N0)]	K (M)	R
Hisopo	Sin sonicar	5.07 ± 0.07	0.09 ± 0.01	0.98
	Sonicado	3.52 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.99
Hoja	Sin sonicar	5.57 ± 0.96	0.17 ± 0.04	0.99
	Sonicado	25.12 ± 4.13	0.79 ± 0.16	0.94

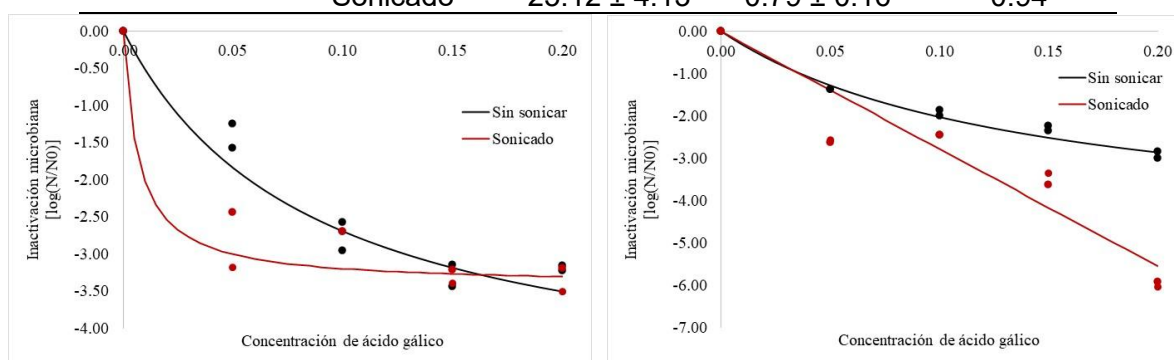


Figura 11. Efecto de la concentración de ácido gálico y sonicación sobre la inactivación de *E. coli* inoculada en acelga. Muestra tomada con hisopo (izquierda) y en agua peptonada (derecha).

Tabla 10. Parámetros del Modelo de Monod para la inactivación microbiana con Ácido gálico de *S. Typhimurium*.

Aplicación	Tratamiento	μ [log(N/N0)]	K (M)	R
Hisopo	Sin sonicar	18.38 ± 3.21	0.42 ± 0.09	0.99
	Sonicado	8.78 ± 0.09	0.10 ± 0.01	0.99
Hoja	Sin sonicar	7.24 ± 0.75	0.15 ± 0.04	0.99
	Sonicado	5.40 ± 0.21	0.05 ± 0.01	0.94

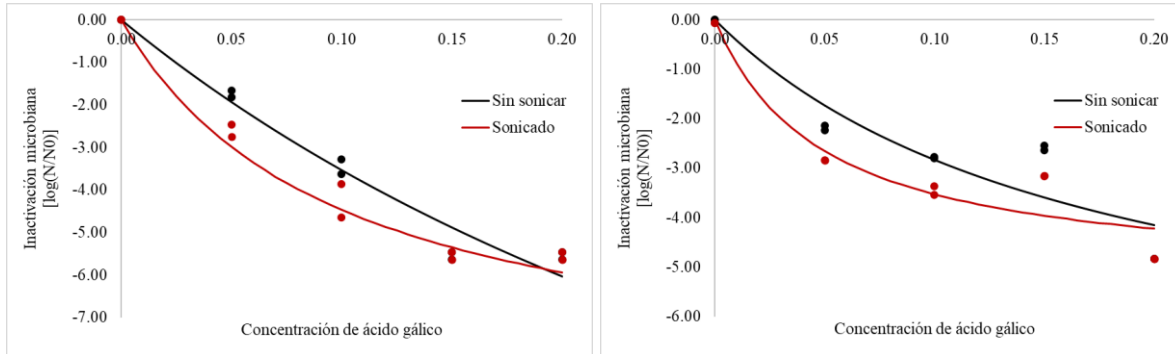


Figura 12. Efecto de la concentración de ácido gálico y sonicación sobre la inactivación de *S. Typhimurium* inoculada en acelga. Muestra tomada con hisopo (izquierda) y en agua peptonada (derecha).

Se aplicó la forma negativa del modelo de Monod para ajustar la cinética de inactivación microbiana de ácido gálico contra *S. Typhimurium* y *E. coli* inoculadas en hojas de acelga a diferentes concentraciones, en las Tablas 9 y 10 se muestran los parámetros del modelo antes mencionado con y sin la limpieza ultrasónica; de acuerdo con los datos experimentales se demuestra que existe un ajuste adecuado con una $R > 0.94$. Para *E. coli* la tasa máxima de inactivación μ y la constante media de concentración K , oscilaron entre 5.07 - 25.12 y 0.09 - 0.79 M, respectivamente; esto quiere decir que durante el tratamiento la bacteria demostró tener menor resistencia. Para *S. Typhimurium* la tasa máxima de inactivación μ y la constante media de concentración K , oscilaron entre 18.38 – 5.40 y 0.42 – 0.05 M, respectivamente teniendo mayor resistencia al tratamiento.

Existe una diferencia significativa en la inactivación microbiana de *E. coli*, se observa que dependiendo el tipo de muestra (hisopo o agua peptonada) y si se somete o no al tratamiento de sonicación, la inactivación en hisopos es menor a comparación de la inactivación en agua peptonada; se necesita más concentración

cuando no se sónica para alcanzar mayor reducción logarítmica 0.09 M para una reducción de 5.07, a comparación de cuando se sónica 0.01 M para una reducción de 3.52, *E. coli* posee fimbrias usadas como mecanismo de adherencia a las superficies celulares (Vidales Rodríguez et al., 2014), en este caso, debido a la naturaleza del algodón de los hisopos y la hoja de acelga, se adhiere mayormente al algodón.

El parámetro K es la concentración de ácido gálico (M) donde se alcanza la mitad del ciclo logarítmico máximo, siendo mayor en agua peptonada que en hisopos, es decir, se necesita una menor concentración de ácido gálico cuando se usan los hisopos ya que hay una mayor eficiencia del tratamiento, se observa una tendencia lineal (derecha), donde al sonicar se alcanza mucho más reducciones logarítmicas 25.12 sin embargo de mucha concentración 0.79 M resultado que sería incoherente porque la máxima concentración utilizada fue de 0.2 M. Sin sonicar se observa menor reducción, pero a una concentración aceptable; sin embargo, el fenómeno de cola que se presenta en la Fig. 11 (izquierda) sugiere que *E. coli* se vuelve resistente al proceso de inactivación del tratamiento.

La inactivación para *S. Typhimurium* por el contrario, es mayor en hisopo que en agua peptonada, al igual que K ; es decir, el tratamiento es más eficiente en agua peptonada con una menor concentración de ácido gálico, 7.24 con una concentración de 0.15 M cuando se sónica y 5.4 con una concentración de 0.05 M cuando no se sónica.

En *S. Typhimurium* observamos que para mayores inactivaciones se necesita de más concentración si no se sónica, pero al sonicar se reducen a ciclos logarítmicos aceptables con una concentración más baja, por lo tanto, al igual que *E. coli* aplicar la sonicación aumenta la inactivación. Y como se muestra en la Figura 12 (derecha), *Salmonella* también presenta el fenómeno de cola.

Las Figuras de *E. coli* y *S. Typhimurium* (Figura 11 y 12) indican que la aplicación de la limpieza ultrasónica aumenta la inactivación microbiana de ambos patógenos gracias al fenómeno de cavitación, donde se facilita la eliminación de las bacterias de la superficie de la acelga y exponiéndolas al ácido gálico como agente

higienizante (Marques et al., 2019). Yang et al. En 2022 demostró que se generan poros de manera temporal en la membrana celular de las bacterias permitiendo la internalización del ácido gálico y sus ROS provocando su muerte, así mismo Borges et al., 2013 describió cómo el ácido gálico altera la permeabilidad de la membrana de *E. coli*, indica que concentraciones de ~1.5 mg/mL son críticas para observar cambios fisicoquímicos en la bacteria; para *Salmonella* entérica, el ácido gálico actúa dañando la integridad de la membrana citoplasmática, provocando la fuga de potasio y proteínas.

E. coli y *S. Typhimurium* muestran que, a bajas concentraciones de ácido gálico, se logran mayores inactivaciones microbianas, donde *E. coli* muestra una menor resistencia frente a *Salmonella*, como se mencionó anteriormente, bacterias que mueren primero en el tratamiento protegen a las restantes con sus constituyentes de la membrana celular (Humpheson et al. 1998).

Se observa que entre mayor es la concentración del ácido gálico, ambas bacterias adquieren resistencia a la inactivación con el tratamiento. Sin embargo, la limpieza ultrasónica retrasa esta resistencia, ya que como se observa en las figuras 11 y 12, las líneas negras (sin sonicar) muestran una resistencia prematura a concentraciones menores de ácido gálico. Los resultados obtenidos para *E. coli* y *S. Typhimurium* se pueden comparar con los obtenidos por Moreno-Vázquez et al., 2017, donde se evaluaron rangos de 5 a 15 mM de ácido gálico pero la combinación de 15 mM de ácido gálico y 15 minutos de limpieza ultrasónica logró las mayores reducciones superando los 3-4 logs demostrando que concentraciones más altas incrementan la inactivación junto con el uso del ultrasonido, pero deben equilibrarse para no afectar el color o la textura de la acelga.

9. Conclusiones

- *Salmonella* Typhimurium es una enterobacteria con mayor resistencia al tratamiento a comparación de *E. coli* teniendo una reducción logarítmica menor (*S. Typhimurium* 3.3 logs y *E. coli* 3 logs aproximadamente) entre 5 a 10 min con una concentración de 0.15 M de ácido gálico.
- El estudio encontró que la concentración de ácido gálico, así como el tiempo de contacto son factores críticos en la eficacia del tratamiento, ya que para ambas bacterias la concentración de 0.15 es la ideal alcanzando la máxima inactivación entre 5 a 10 minutos 3 logs (99.9%).
- A menores concentraciones de 0.15 M de ácido gálico no hay una inactivación significativa de *E. coli* y *S. Typhimurium* solo con agua peptonada. Cuando se combina la luz UV-C con la limpieza ultrasónica a menores concentraciones de ácido gálico se logran mayores inactivaciones microbianas entre 3 logs (99.9%) a 5 logs (99.999%).
- A mayores concentraciones de ácido gálico superando la concentración 0.15 M, se produce un efecto cola, es decir, las bacterias desarrollan resistencia al tratamiento siendo ineficaz la desinfección con y sin la combinación de los métodos de desinfección.
- El modelo de Monod en su manera negativa generó un adecuado ajuste de los datos experimentales ($R > 0.94$) permitiendo la visualización de los datos.
- La combinación del ácido gálico más la luz UV-C junto con la limpieza ultrasónica, aumenta la inactivación microbiana de ambos patógenos gracias al fenómeno de cavitación >3 logs.

10.Recomendaciones

- Evaluar el crecimiento de las bacterias *E. coli* y *S. Typhimurium* en concentraciones menores de 0.05 M de ácido gálico para determinar una concentración más efectiva.
- Monitorear la resistencia microbiana para asegurar que el uso de ácido gálico más el uso de la luz UV-C no conduzca a la selección de cepas patógenas más resistentes.
- Realizar pruebas sensoriales a la acelga después de la combinación de los tratamientos para determinar su aceptabilidad.
- Realizar pruebas bromatológicas a la acelga después del tratamiento para determinar si se han perdido nutrimentos necesarios.
- Realizar el mismo procedimiento a otras enterobacterias de importancia en la prevención de ETAs.

11. Referencias

1. Almalki, T., & Anand, S. (2023). Ultrasound-Assisted Cavitation Effect on the Biofilm-Forming Ability of Common Dairy Sporeformers. *Dairy*, 4(1), 100-107. <https://doi.org/10.3390/dairy4010007>
2. Barer, M. R. (2012). Bacterial growth, physiology and death. In *Medical Microbiology* (pp. 39–53). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-4089-4.00019-6>
3. Basic Biology of Oral Microbes. (2015). In *Atlas of Oral Microbiology* (pp. 1–14). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802234-4.00001-x>
4. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 59-60, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.03.011>
5. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity of gallic acid: Examining its mode of action, cell targets and synergetic potential. *Microbial Pathogenesis*, 59-60, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.03.011>
6. Bowsher, C., Steer, M., & Tobin, A. (2008). *Plant Biochemistry*. Garland Science. <https://doi.org/10.4324/9780203833483>
7. Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
8. Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2017). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities (2008). U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/index.html>
9. Cheng, J.-H., Lv, X., Pan, Y., & Sun, D.-W. (2020). Foodborne bacterial stress responses to exogenous reactive oxygen species (ROS) induced by cold plasma treatments. *Trends in Food Science and Technology*, 103, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.022>

10. Cossu, A., Ercan, D., Wang, Q., Ann Peer, W., Nitin, N., & Tikekar, R. V. (2016). Antimicrobial effect of synergistic interaction between UV-A light and gallic acid against *Escherichia coli* O157:H7 in fresh produce wash water and biofilm. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.020>
11. Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Reviews*, 12(4), 564 – 582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
12. Di Martino P. (2022). Antimicrobial agents and microbial ecology. *AIMS microbiology*, 8(1), 1–4. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2022001>
13. Drasar, B. S., & Hill, M. J. (1974). Human intestinal flora. Academic Press.
14. El Bari, H., Bakraoui, M., El Gnaoui, Y., y Karouach, F. (2021). Modelos cinéticos de producción de metano a partir de la digestión anaeróbica. En *Biorrefinerías basadas en residuos de biomasa: Energía limpia y recuperación de recursos*, 271-294.
15. El-Shorbagy, M. A., & El-Refaey, A. M. (2022). COVID-19: Mathematical growth vs. precautionary measures in China, KSA, and the USA. *Informatics in Medicine Unlocked*, 28, 100834. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2021.100834>
16. Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293. doi: 10.1080/21553769.2015.1051243
17. Flores-Vargas, G., Bergsveinson, J., Lawrence, J. R., & Korber, D. R. (2021). Environmental Biofilms as Reservoirs for Antimicrobial Resistance. *Frontiers in microbiology*, 12, 766242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766242>
18. Frías Salcedo, J. A. (2009). Bacteriemia por salmonela no tifoídica en pacientes inmunocomprometidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(3), 145-149.
19. García Fabila, M. M. (2016). Apuntes para espectrometría de radiación ultravioleta visible (UV/VIS). Universidad Autónoma del Estado de México.

20. Goode, K. R., Phinney, D., Hasting, T., y Fryer, P. (2012). Engineering considerations for cleaning and disinfection in the food industry. En J. Ahmed y M. S. Rahman (Eds.), *Handbook of Food Process Design* (Vol. 2, pp. 1125–1154). Wiley-Blackwell.
21. Govea Salas, M., Zugasti Cruz, A., Silva Belmares, S. Y., Valdivia Urdiales, B., Rodríguez Herrera, R., Aguilar González, C. N., & Morlett Chávez, J. (2013). Actividad anticancerígena del ácido gálico en modelos biológicos in vitro. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 5(9), 5-11.
22. Heldt, H.-W. & Heldt, F. (2005). *Plant Biochemistry*. Elsevier, Inc.
23. Herrera, B. Y., & Jabib, R. L. (2015). Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(1), 1-19.
24. Humpheson, L., Adams, M. R., Anderson, W. A., & Cole, M. B. (1998). Biphasic thermal inactivation kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 459–464. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.459-464.1998>
25. International Ultraviolet Association [IUVA]. (2021). Advice for consumers: UV disinfection for COVID-19 and other pathogens. IUVA Fact Sheet. <https://iuva.org>
26. Jatzwauk, L., Schöne, H., & Pietsch, H. (2001). How to improve instrument disinfection by ultrasound. *The Journal of hospital infection*, 48, S80–S83. [https://doi.org/10.1016/s0195-6701\(01\)90019-2](https://doi.org/10.1016/s0195-6701(01)90019-2)
27. Kim, H., & Lee, D. G. (2021). Contribution of SOS genes to H₂O₂-induced apoptosis-like death in *Escherichia coli*. *Current Genetics*, 67, 969–980.
28. Koutchma, T., Popović, V., Ros-Polski, V., & Popielarz, A. (2016). Effects of Ultraviolet Light and High-Pressure Processing on Quality and Health-Related Constituents of Fresh Juice Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(5), 844–867. doi: 10.1111/1541-4337.12214
29. Liu, S. (2017). How Cells Grow. *Bioprocess Engineering*, 629–697. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63783-3.00011-3>

30. Liu, X., Omar, M., Abrahante, J. E., Nagaraja, K. V., & Vidovic, S. (2020). Insights into the Oxidative Stress Response of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Revealed by the Next Generation Sequencing Approach. *Antioxidants*. Basel, Switzerland, 9(9), 849. <https://doi.org/10.3390/antiox9090849>
31. Luna-Domínguez, R. A., Hernández-Carranza, P., Ávila-Sosa, R., Valadez-Blanco, R., Ruiz-López, I. I., & Ochoa-Velasco, C. E. (2023). Enhancing gallic acid antimicrobial activity against *Escherichia coli* by ultraviolet-C light irradiation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103378>
32. Macarisin, D., Patel, J., Bauchan, G. R., Giron, J. A., & Sharma, M. (2014). Role of Curli and Plant Surface Morphology in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Attachment to Spinach and Swiss Chard. *Journal of Food Protection*, 77(9), 1545-1554.
33. Marques, C.P., Pancini, R., Goncalves, D., Vargas, P., Oliveira, J.C., Fontes, P., Souza, J.C., Campos, P. (2019). Preservation of ready-to-eat salad: A study with combination of sanitizers, ultrasound, and essential oil-containing β -cyclodextrin inclusion complex. *LWT - Food Science and Technology*. 115, 108433.
34. Moreno-Vázquez, M. J., Rosas-Burgos, E. C., Ayala-Zavala, J. F., Cira-Chávez, L. A., & Rodríguez-García, M. E. (2017). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on Swiss chard by the combined effect of gallic acid and ultrasound. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.042>
35. Mueller, M., & Tainter, C. R. (2023). *Escherichia coli* Infection. StatPearls Publishing.
36. Muqbil, I., Burke, F. J. T., Miller, C. H., & Palenik, C. J. (2005). Antimicrobial activity of ultrasonic cleaners. *Journal of Hospital Infection*, 60(3), 249–255. [doi:10.1016/j.jhin.2004.11.017](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.11.017)
37. Nakamura, K., Ishiyama, K., Sheng, H., Ikai, H., Kanno, T., & Niwano, Y. (2015). Bactericidal activity and mechanism of photoirradiated polyphenols

- against Gram-Positive and -Negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7707–7713. <https://doi.org/10.1021/jf5058588>.
38. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>
39. Noma, S., Kajiyama, D., Igura, N., Shimoda, M., & Hayakawa, I. (2006). Mechanisms behind tailing in the pressure inactivation curve of a clinical isolate of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2), 103–108. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.018.
40. Ohashi, I., Kobayashi, S., Tamamura-Andoh, Y., Arai, N., & Takamatsu, D. (2022). Disinfectant resistance of *Salmonella* in in vitro contaminated poultry house models and investigation of efficient disinfection methods using these models. *The Journal of veterinary medical science*, 84(12), 1633–1644. <https://doi.org/10.1292/jvms.22-0311>
41. Procuraduría Federal del Consumidor. (2001, septiembre). Productos para desinfectar agua y alimentos. *Revista del Consumidor*, (295).
42. Pyo, Y. H., Lee, T. C., Logendra, L., & Rosen, R. T. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) extracts. *Food Chemistry*, 85(4), 551-559.
43. Reyes Solórzano, S. J. (2017). Circunspecciones acerca de las enfermedades producidas por alimentos. *Revista Científica Dominio de las Ciencias*, 3, 299-310.
44. Rodríguez Martínez, C. & Zhurbenko, R. (2018). Manual de medios de cultivo. BioCen. Centro Nacional de Biopreparados.
45. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2020). Acelga, una hortaliza muy nutritiva. Gobierno de México.
46. Secretaría de Salud (SSA). (1994). NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras en alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación
47. Secretaría de Salud (SSA). (1994). NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial de la Federación.

48. Secretaría de Salud (SSA). (1994). NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de salmonella en alimentos. Diario Oficial de la Federación.
49. Secretaría de Salud. (1999). *Manual de buenas prácticas de higiene y sanidad*. Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario; Dirección General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios.
50. Secretaría de Salud. (2015). Plata coloidal: ¿Qué tan segura es la plata coloidal? y Cloro. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE).
51. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2023). Monografía de acelga. Gobierno de México.
52. Shane, A. L., Mody, R. K., Crump, J. A., Tarr, P. I., Steiner, T. S., Kotloff, K., Langley, J. M., Wanke, C., Warren, C. A., Cheng, A. C., Cantey, J., & Pickering, L. K. (2017). Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 65(12), e45–e80. <https://doi.org/10.1093/cid/cix669>
53. Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(4), 225-236.
54. Takaya, A., Suzuki, M., Matsui, H., Tomoyasu, T., Sashinami, H., Nakane, A., & Yamamoto, T. (2003). Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection of mice. *Infection and Immunity*, 71(2), 690–696. doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.690-696.2003>
55. Torres Armendáriz, V., Manjarrez Domínguez, C. B., Acosta-Muñiz, C. H., Guerrero Prieto, V. M., Parra Quezada, R. Á., Noriega Orozco, L. O., & Ávila Quezada, G. D. (2016). Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y plantas comestibles. ¿Se han desarrollado mecanismos de internalización bacteriana? *Revista mexicana de fitopatología*, 34(1), 64-83. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-4>

56. Vidales Rodríguez, L. E., Miranda Delgado, P., De Santiago Franco, D., Sánchez Rodríguez, S. H., y Ramírez Santoyo, R. M. (2014). Los patrones de adherencia de *Escherichia coli* patogénica aviar y *E. coli* patogénica de humanos a células epiteliales en cultivo son similares. *Archivos de Medicina*, 10(1), Artículo 21. <https://doi.org/10.3823/1232>
57. Vijigiri, V., & Krishna Pamidi, T. R. (2014). Ultrasound induced cavitation and resonance amplification using adaptive feedback Control System. Blekinge Institute of Technology.
58. Viña, S. Z. (2020). Capítulo 4: Compuestos fenólicos. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. CONICET Digital.
59. Walker, N., Burke, F. J., & Palenik, C. J. (2006). Comparison of ultrasonic cleaning schemes: a pilot study. *Primary Dental Care*, 13(2), 51–56. <https://doi.org/10.1308/135576106776337904>
60. Wang, Q., de Oliveira, E. F., Alborzi, S., Bastarrachea, L. J., & Tikekar, R. V. (2017). On mechanism behind UV-A light enhanced antibacterial activity of gallic acid and propyl gallate against *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific reports*, 7(1), 8325. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08449-1>
61. Wang, Q., Leong, W. F., Elias, R. J., & Tikekar, R. V. (2019). UV-C irradiated gallic acid exhibits enhanced antimicrobial activity via generation of reactive oxidative species and quinone. *Food chemistry*, 287, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.041>
62. Yang, X., Huang, J., Wu, Q., Zhang, J., Yang, S., Wang, J., Ding, Y. Chen, M., Xue, L., Wu, S., Gu, Q., Zhang, Y., & Wei, X. (2022). Occurrence, serovars and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. in retail ready-to-eat food products in some Chinese provinces. *LWT - Food Science and Technology*, 154, 112699.
63. Zúñiga Carrasco, I. R., & Caro Lozano, J. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 37(3), 95–104.
64. Zupanc, M., Pandur, Ž., Stepišnik Perdih, T., Stopar, D., Petkovšek, M., y Dular, M. (2019). Effects of cavitation on different microorganisms: The

current understanding of the mechanisms taking place behind the phenomenon. A review and proposals for further research. *Ultrasonics Sonochemistry*, 57, 147-165. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.05.009>