



BUAP

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE
MEZCLAS BINARIAS DE ACEITES ESENCIALES
EN FASE DE VAPOR CONTRA *SALMONELLA*
SEROVAR MONTEVIDEO EN CONDICIONES *IN*
*VITRO***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO EN:
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

ADRIAN ORDOÑEZ AVILA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RAÚL AVILA-SOSA SÁNCHEZ

CO-DIRECTORA DE TESIS:

DRA. FÁTIMA REYES JURADO



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

2020

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y a toda mi familia por estar siempre presentes.

A mis padres, Sr. Adrian Ordoñez Xahuentitla y Sra. Adriana Avila Salauz, por su amor, comprensión y su apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, unas buenas, otras malas, gracias a mis padres soy quien soy.

A mis hermanos, Emmanuel, Ariel y Ximena por llenarme de alegría, día tras día, por todos los consejos brindados, por compartir horas y horas de películas, por las peleas, los gritos y herir mi cuerpo de puro amor.

A mi Director de Tesis, Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez y Co-Directora, Dra. Fátima Reyes Jurado, que gracias a experiencia, consejos, motivación y amistad hoy puedo culminar este trabajo.

A mis compañeros, Alejandra, Arleth, Israel, Diana, Alan, Salvador, Itzel, Janet, Mara, Ramiro, Rubí, Kevin, Vicente, Maritere y Karina de quienes disfrute y aprendí, aquellos que serán mis colegas.

A mis amigos, Martín, Isaac, Antonio, Eduardo, Abi, Hugo, Andrés, Sabine, Marco, Esmeralda, Daniela y Manuel (QEPD), aquellos amigos del cole, que se convierten en amigos de vida, gracias por todo su apoyo y diversión.

A los Profesores que me han visto crecer como persona, y gracias a sus conocimientos hoy puedo sentirme dichoso y contento.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Facultad de Ciencias Químicas por haberme brindado tantas oportunidades y enriquecerme en conocimiento.

RESUMEN

Los aceites esenciales son los antimicrobianos naturales más utilizados para mantener la inocuidad de los alimentos, debido a la actividad antimicrobiana de los componentes químicos de cada aceite esencial. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición química, la concentración mínima inhibitoria y el efecto antimicrobiano de las mezclas binarias de los aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*), zacate-limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*) en fase de vapor contra *Salmonella* serovar Montevideo. La composición química de cada aceite esencial se determinó a través de una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-SM), una vez obtenidos los patrones de fragmentación de masas estos se compararon con los almacenados en el NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología). El efecto antimicrobiano de cada aceite esencial en fase de vapor se evaluó por la técnica de placa invertida y la presencia de crecimiento bacteriano en la placa, con la finalidad de obtener la concentración mínima inhibitoria de cada aceite esencial. Para evaluar el efecto de la mezcla binaria se realizaron combinaciones de los aceites esenciales a partir de la concentración mínima inhibitoria individual y del modelo tablero de ajedrez, se aplicó la técnica de placa invertida y con los resultados obtenidos se calculó el índice de concentración mínima inhibitoria el cual determinó el efecto que presentó la mezcla binaria. Como resultados se obtuvieron los principales componentes de cada aceite esencial así como su componente mayoritario, linalol, β -citral, mentona y canfeno para los aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*), zacate-limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*). Así mismo, se concluye que los aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*) y zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) tiene un mayor efecto inhibitorio que menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*) contra *Salmonella* serovar Montevideo debido a que se necesitó menos concentración para inhibir el crecimiento en la placa y por último en la evaluación de las mezcla binaria de albahaca (*Ocimum basilicum*) y zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) presentaron un efecto aditivo contra *Salmonella* serovar Montevideo.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	II
Resumen.....	III
Índice general	IV
Índice de tablas	VI
Índice de figuras-	VIII
1. Introducción.	1
2. Revisión bibliográfica	2
2.1- Inocuidad alimentaria.	2
2.2- Conservación de los alimentos	5
2.3- Microbiología de los alimentos	9
2.3.1- <i>Salmonella</i>	12
2.3.1.1- <i>Salmonella</i> serovar Montevideo.	19
2.4- Antimicrobianos	20
2.4.1- Antimicrobianos naturales.	21
2.5- Aceites esenciales	24
2.5.1- Métodos de extracción de los aceites esenciales	27
2.5.2- Métodos de identificación de los aceites esenciales.	28
2.5.3- Aplicaciones de los aceites esenciales.	28
2.5.4- Aceite esencial de albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>).	28
2.5.5- Aceite esencial de zacate-limón (<i>Cymbopogon citratus</i>).	30
2.5.6- Aceite esencial de menta (<i>Mentha piperita</i>)	31
2.5.7- Aceite esencial de jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	32
2.6- Fase de vapor	33
3.- Justificación.	35
4.- Objetivos	36
4.1- Objetivo general	36

4.2- Objetivos específicos	36
5.- Diagrama general de trabajo	37
6.- Materiales y métodos	38
7.- Metodología.....	39
7.1- Caracterización e identificación de los componentes de los aceites esenciales	39
7.2 Determinación de la CMI de los aceites esenciales y mezclas binarias ...	39
8.- Resultados y discusión	42
8.1- Caracterización e identificación de los componentes de los aceites esenciales.....	42
8.1.1- Aceite esencial de albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>).....	42
8.1.2- Aceite esencial de zacate-limón (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	43
8.1.3- Aceite esencial de menta (<i>Mentha piperita</i>).....	44
8.1.4- Aceite esencial de jengibre (<i>Zingiber officinale</i>).....	46
8.2- Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>), zacate-limón (<i>Cymbopogon citratus</i>), menta (<i>Mentha</i> <i>piperita</i>) y jengibre (<i>Zingiber officinale</i>) contra <i>Salmonella</i> serovar en fase de vapor por 24 horas de incubación.....	47
8.3- Determinación del efecto de las mezclas binarias en fase de vapor	50
9.- Conclusiones.....	52
10.- Sugerencias.....	53
Bibliografía.....	54
Anexos.....	61

Índice de tablas

Tabla 1. Alteración de los alimentos, orígenes y consecuencia	4
Tabla 2. Los métodos de conservación de los alimentos a través de la historia.	6
Tabla 3. Acción que ejercen los diferentes métodos de conservación de los alimentos sobre los microorganismos	9
Tabla 4. Principales enfermedades transmitidas por los alimentos en E.U.	11
Tabla 5. Taxonomía de <i>Salmonella</i>	13
Tabla 6. Características diferenciales de las especies y subespecies de salmonelas	14
Tabla 7. Diversidad de serotipos de <i>Salmonella</i> en México aislados de diferentes fuentes desde 1968 hasta 2018.	18
Tabla 8. Clasificación de terpenoides.	25
Tabla 9. Métodos de extracción de aceites esenciales	27
Tabla 10. Comparación de la composición química del aceite esencial de albahaca de diferentes variedades.	29
Tabla 11. Valor porcentual de los principales compuestos presentes en los aceites de <i>Cymbopogon citratus</i> de Escazú y Sarapiquí en Costa Rica.	30
Tabla 12. Principales componentes del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> variedad <i>vulgaris</i>	31
Tabla 13. Principales componentes de extractos de jengibre obtenidos por Soxhlet y por EF.	32
Tabla 14. Equipos utilizados.	38
Tabla 15. Métodos utilizados	38
Tabla 16. Modelo. Tablero de ajedrez para mezclas binarias de aceites esenciales en fase de vapor	40

Tabla 17. Principales componentes del aceite esencial de albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	43
Tabla 18. Principales componentes del aceite esencial de zacate-limón (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	44
Tabla 19. Principales componentes del aceite esencial de menta (<i>Mentha piperita</i>)..	45
Tabla 20. Principales componentes del aceite esencial de jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	47
Tabla 21. Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales contra <i>Salmonella</i> serovar Montevideo en fase de vapor por 24 horas de incubación	48
Tabla 22. Efecto inhibitorio de las distintas combinaciones de la mezcla binaria de aceite esencial de albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>) y zacate-limón (<i>Cymbopogon citratus</i>) contra <i>Salmonella</i> serovar Montevideo en fase de vapor por 24 horas de incubación y el ICIF correspondiente	50

Índice de figuras

Figura 1. Características de la calidad total de un alimento	2
Figura 2. Clasificación universal de los métodos de conservación	7
Figura 3. Detección de <i>Salmonella</i> spp según el método tradicional.	15
Figura 4. Tendencias de los consumidores que tienen impacto directo en la tecnología y conservación de alimentos	21
Figura 5. Métodos para evaluar la eficacia de los antimicrobianos naturales	23
Figura 6. Clasificación de los aceites esenciales.	24
Figura 7. Monoterpenoides con estructura sencilla	25
Figura 8. Sesquiterpenoides acíclicos	26
Figura 9. Cromatograma obtenido de una GC-MS de aceite esencial de albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	61
Figura 10. Cromatograma obtenido de una GC-MS de aceite esencial de zacate-limón (<i>Cymbopogon citratus</i>).	61
Figura 11. Cromatograma obtenido de una GC-MS de aceite esencial de menta (<i>Mentha piperita</i>).	62
Figura 12. Cromatograma obtenido de una GC-MS de aceite esencial de jengibre (<i>Zingiber officinale</i>).	62

INTRODUCCIÓN

Los casos de brotes de enfermedades por el consumo de alimentos contaminados han ido en crecimiento en los últimos años. Virus como norovirus o la hepatitis A, *Aspergillus* y *Fusarium* entre otros hongos, *Trichinella spiralis*, *Taenia solium*, *Taenia saginata* como principales parásitos se encuentran fácilmente en los alimentos cuando la calidad sanitaria es deficiente. *C. perfringenes*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Salmonella* las principales bacterias responsables de estas enfermedades, ya que se encuentran en alimentos como huevos, vegetales, carnes crudas e incluso alimentos procesados. Siendo *S. Typhimurium* el principal microorganismo aislado. Aunque actualmente se está dando un aumento de brotes de salmonelosis por otras serovariedades como *S. Montevideo*, aislada por primera vez en Uruguay.

El estilo de vida saludable conlleva muchas decisiones, entre ellas, llevar una alimentación correcta. Actualmente, el consumo de alimentos en la población se por tendencias en crecimiento, una actualmente es ingerir alimentos naturales o lo más naturales posibles sin que contengan químicos. El uso de antimicrobianos naturales ha permitido que esto se logre poco a poco. Entre los antimicrobianos naturales más utilizados son los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas. Debido a su composición, ya que tienen componentes que presentan actividad antimicrobiana contra ciertos microorganismos, la composición de un aceite esencial va a depender de la especie de la planta, factores agronómicos y tratamientos que reciba. Existe una gran variedad de aceites esenciales, entre los principales están orégano, tomillo, albahaca, mostaza, menta, etc. Aunque en la mayoría de estos aceites esenciales aún no se han tenido en uso por parte de la industrias alimentarias. La aplicación de mezclas binarias de 2 o más aceites esenciales buscan ser una técnica efectiva para poder ser aplicada en distintos alimentos, ya que, es posible presentar mejores resultados que si se utilizaran de manera individual. Una fase de vapor permite a los componentes volátiles de los aceites esenciales tener un mejor efecto antimicrobiano, debido a las condiciones creadas, por lo que relacionar mezclas binarias y una atmósfera creada a partir de una fase de vapor traerá resultados positivos.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1- Inocuidad alimentaria

De la Fuente y Barbosa (2010) señalan que las características nutricionales, sensoriales, comerciales y la inocuidad son los cuatro grupos básicos de características que componen un alimento de calidad como se observa en la Figura 1. Mientras que para Avendaño y Col. (2006) la inocuidad alimentaria se entiende como la implementación de medidas para reducir los riesgos provenientes de agentes biológicos, físicos y químicos, para proteger a los consumidores de peligros involuntarios.

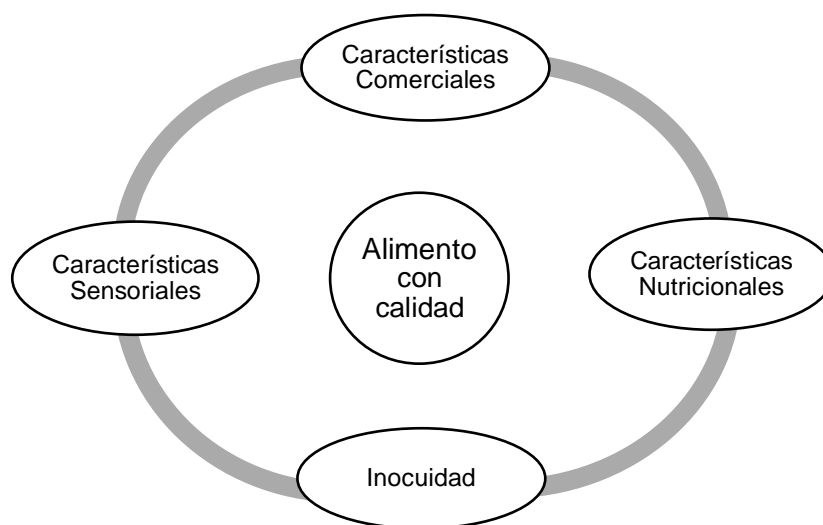


Figura 1. Características de la calidad total de un alimento (De la Fuente y Barbosa, 2010).

La FAO (2003) determinó que la calidad de un alimento es una característica compleja que determina su valor y aceptación por parte del consumidor. Implican tanto los atributos negativos como es el estado de descomposición, contaminación por suciedad, decoloración y olores desagradables, entre otros y los atributos positivos como el origen, características sensoriales y métodos de elaboración de los alimentos. La FAO es la única organización internacional que supervisa toda la cadena alimentaria permitiendo ofrecer una mejor visión sobre la inocuidad alimentaria.

La FAO (2003) explica los distintos factores de inclusión de inocuidad en los alimentos, en los que destacan:

- El crecimiento de enfermedades transmitidas por alimentos y la aparición de nuevos peligros en los alimentos.
- Cambios rápidos en la tecnología de producción, elaboración y comercialización de los alimentos.
- Innovación y desarrollo de nuevas mejores técnicas de análisis e identificación de microorganismos.
- El comercio internacional de alimentos y la necesidad de equilibrar las normas de inocuidad y calidad de los alimentos.
- Cambios en los estilos de vida (Proceso de urbanización).
- Crecientes requerimiento o tendencias por parte de los consumidores.

De la Fuente y Barbosa (2010) mencionan que los alimentos sufren variaciones en su composición química, valor nutritivo y características sensoriales (color, aroma, textura, durante su proceso de cosecha, almacenamiento, manipulación o consumo, por causas provocadas no deliberadamente, de tal manera que su aceptabilidad para el consumo queda disminuida, aunque estos permanezcan inocuos. Arispe y Tapia (2007) indican que la inocuidad es un componente esencial de la calidad total, por lo tanto, la inocuidad de los alimentos debe considerarse como prioridad máxima. La inocuidad de un alimento es uno de los requisitos no escritos incluido en las especificaciones de los consumidores, esto es evidente y no es negociable a diferencia de otras características (como el sabor, textura, olor, sabor y el costo).

Todos los alimentos están expuestos a diversos agentes y así perder su inocuidad. De la Fuente y Barbosa (2010) clasifican a estos agentes en físicos, químicos y biológicos, que pueden provocar un daño en la salud del consumidor. Entre los diferentes agentes físicos están: luz, temperatura, agentes mecánicos, humedad, huesos, plástico o cristales. En los agentes químicos encontramos los productos de limpieza, insecticidas, pesticidas, sustancias tóxicas entre otros más. Insectos, numerosos parásitos, virus o toxinas son muy relevantes pero principalmente bacterias como *Salmonella* spp., *E.*

coli, *Listeria monocytogenes* entre otras más se consideran contaminantes biológicos en los alimentos ya que usan a estos como vehículos de enfermedades para el hombre. En la Tabla 1 se enlistan los distintos agentes que se pueden encontrar en los alimentos.

Tabla 1. Alteración de los alimentos, orígenes y consecuencias.

Agentes	Factores que intervienen en la alteración de los alimentos
Agentes Físicos	Agentes mecánicos Temperatura Humedad, sequedad Aire Luz
Agentes Químicos	Los agentes químicos miden la reacción de oscurecimiento Oxidación de vitaminas Descomposición proteica (Mal olor) Fermentación glucósidos (Sabor picante) Enranciamiento de lípidos
Agentes Biológicos	Enzimáticos Parásitos Bacterias Hongos Levaduras

Fuente: Aguilar, 2012.

Arispe y Tapia (2007) señalan que la instauración de un sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (HACCP), actualmente es un sistema fundamental para alcanzar los requisitos de inocuidad, e idealmente debería vincularse a un sistema de gestión de la calidad integral. El sistema HACCP tiene como finalidad mejorar el

proceso de inocuidad y calidad alimentaria de contaminantes microbiológicos u otros posibles que puedan provocar un malestar en el consumidor. Mercado (2007) considera que los sistemas de inocuidad y calidad dan prioridad al control de materias primas, procesos y productos mediante ensayos físicos, químicos y biológicos. El control de los procesos productivos se realiza mediante técnicas estadísticas y procesos de mantenimiento y control de los equipos utilizados en los procesos de producción.

2.2- Conservación de los alimentos

Evolución de las distintas técnicas de conservación en los alimentos a través de la historia (Tabla 2). Aguilar (2012) afirma que las escasas oportunidades de obtener alimento para el hombre primitivo lo orillaba sólo a la caza. El hombre consumía los alimentos en estado natural; no obstante, durante su evolución comenzó a cocinarlos. Desde hace mucho tiempo existen diferentes métodos o técnicas de conservación, los cuales se han consolidado y se han perfeccionado con el paso de los años; entre los métodos de conservación de alimentos más comunes están: el salado, el curado, el ahumado, el escabeche, el refrigerado y el calor. Vásquez y Col. (2009) mencionan que actualmente, se han identificado serios problemas relacionados directamente con las limitadas formas de conservar los alimentos, sumado el hecho de la continua exigencia por disminuir y prohibir cada vez más el uso de conservadores y aditivos químicos en los alimentos, debido a los efectos adversos que pueden presentar al consumidor. Esto obliga a la búsqueda de metodologías alternativas para conservar los alimentos. La Figura 2 muestra la clasificación de los distintos métodos de conservación utilizados.

Tabla 2. Los métodos de conservación de los alimentos a través de la historia.

Época	Método utilizado
Tiempos primitivos	Se utilizaba sal común, hielo, col, aire.
Región egipcia	Se utilizaban líquidos como el aceite, derivados de vinagre, y en algunos lugares se usaba miel.
Reino de los persas	Adición de azúcares.
Griegos	Grajeado de frutas y hortalizas.
Antigua roma	Adición de dióxido de azufre (SO ₂) al vino
Anterior al siglo XV	Empleo de adobo.
Siglo XVIII	Empleo de bórax. Aplicación de sulfitos a carne.
Siglo XIX	Pasteurización. Descubrimientos como el papel de los ácidos orgánicos: bórico, fórmico, salicílico y benzoico. Congelación de los alimentos. Conservadores químicos.
Siglo XX	Irradiación. Liofilización Envasado aséptico Procesos no térmicos: alta presión, pulsos eléctricos, etc.

Fuente: Aguilar, 2012.



Figura 2. Clasificación universal de los métodos de conservación (Aguilar, 2012).

Berastegui (2010) menciona que conservar los alimentos conlleva en bloquear la acción de los agentes (microorganismos o enzimas) que pueden alterar las características originarias de un alimento. Estos agentes pueden ser ajenos a los alimentos (microorganismos del entorno como bacterias, mohos y levaduras) o estar en su interior, como las enzimas naturales presentes en ellos. Por lo tanto, se define a la conservación de los alimentos como la aplicación de tecnologías y procesos tradicionales que se encargan de prolongar la vida útil y disponibilidad de los alimentos para su consumo, protegiéndolos de microorganismos patógenos y garantizar sus características sensoriales, nutrientes y otros aspectos. Si el alimento no mantiene estas características la conservación no ha cumplido su propósito. Por su parte, Aguilar (2012) define la conservación de alimentos como la aplicación de tecnologías que se encargan de prolongar la vida útil y disponibilidad de los alimentos para el consumo humano y animal, protegiéndolos de microorganismos patógenos y otros agentes responsables de su deterioro, y así garantizar su consumo futuro.

Aguilar (2012) señala que los alimentos vegetales y animales son sistemas acuosos de hidratos de carbono, proteínas y grasas, disueltos en agua con sales minerales, vitaminas y pigmentos, pero de distinta composición, a ello se debe la diversidad de métodos de conservación que se pueden aplicar. Guevara y Col. (2008) expresan que para conservar los alimentos se deben considerar los factores externos e internos causantes del deterioro del alimento. Dentro de los factores externos se encuentra la temperatura, oxígeno, humedad relativa y/o actividad del agua (a_w), luz, presión, vibración y esfuerzos mecánicos. Mientras que como factores internos es común controlar el pH o acidez, °Brix, contenido de sal, entre otros. La Tabla 3 describe como actúa el método de conservación sobre los microorganismos.

Tabla 3. Acción que ejercen los diferentes métodos de conservación de los alimentos sobre los microorganismos.

Acción sobre los microorganismos	Forma de actuación	Método empleado
Destrucción	• Por acción de calor	• Pasteurización
	• Por radiaciones ionizantes	• Esterilización
	• Por acción de antisépticos	• Irradiación
	• Por acción mecánica	• Alcohol
	• Por acción mixta: calor-mecánica	• Ácidos
	• Por bajas temperaturas	• Conservantes químicos
	• Por utilización de atmosferas pobres en oxígeno (O ₂)	• Altas presiones
Efecto barrera	• Por reducción del contenido de agua	• Cocción-extrusión
	• Protección de incorporación y recubrimiento con inhibidores	• Refrigeración
		• Congelación
		• Vacío
		• Mezclas de gases inertes
		• Atmosferas controladas
		• Deshidratación
Eliminación	• Por separación física	• Liofilización
		• Concentración
		• Salazón
		• Inmersión en salmuera
		• Recubrimientos con materias grasas
	• Recubrimiento con azúcar (frutas escarchadas)	
	• Inmersión en ácido	
	• Filtración esterilizante	
	• Ultrafiltración	

Fuente: Aguilar, 2012.

2.3- Microbiología de los alimentos

Palomino-Camargo y González-Muñoz (2014) indican que las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son un problema de salud pública en todo el mundo y son una causa importante de morbilidad, lo cual supone una carga económica significativa para las naciones, peligro para los consumidores y un impacto negativo al

comercio internacional de productos alimenticios. Ray (2003) clasifica a los microbianos de los alimentos en grupos que consisten en varios géneros y especies de bacterias, levaduras, mohos y virus. Aunque algunas algas y protozoos, así como algunos gusanos son importantes en los alimentos.

Ray (2003) expresa que los microorganismos entran en los alimentos tanto de fuentes naturales como de fuentes externas con las que un alimento entra en contacto desde el momento de la producción hasta el momento de consumo. Por su parte, Blanco-Ríos y Col. (2011) afirman que la contaminación de los alimentos es una consecuencia directa derivada de las deficiencias sanitarias presentes durante el proceso de elaboración, manipulación, transporte, almacenamiento y las condiciones en que son proporcionados al consumidor. Los microorganismos provenientes de distintas fuentes de contaminación, son transferidos a la superficie de los alimentos donde encuentran los nutrientes necesarios para proliferar.

Ray (2003) apunta que los tejidos internos de plantas sanas y animales son esencialmente estéril. Sin embargo, los alimentos crudos y procesados (excepto estériles) contienen diferentes tipos de bacterias, virus, mohos y levaduras. Los microorganismos entran en los alimentos tanto de fuentes naturales (incluidas las internas) como de fuentes externas, a las que se entra en contacto desde el momento de la producción hasta el momento del consumo:

- Fuentes naturales en alimentos de origen vegetal incluyen las superficies de frutas, verduras, y los poros de algunos tubérculos (por ejemplo, rábano y cebolla).
- Fuentes naturales para los alimentos de origen animal incluyen la piel, el pelo, las plumas, el tracto gastrointestinal, el tracto urinogenital, el tracto respiratorio y los conductos mamarios (canal del pezón) en las ubres de los animales lecheros

Se sabe que alrededor de 40 diferentes patógenos de origen alimentario provocan enfermedades en humanos (Tabla 4). Más del 90% de los casos confirmados y las pérdidas humanas han sido causa de bacterias. Entre las bacterias más comunes se encuentran; *C. botulinum*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Shigella* spp., *L.*

monocytogenes, *Y. enterocolitica*, *B. cereus*, y *C. jejuni*. No obstante, aproximadamente el 98% de los microorganismos encontrados en los alimentos no son patógenos (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014).

Tabla 4. Principales enfermedades transmitidas por los alimentos en E. U.

Bacteria	Principales síntomas	Fuentes de contaminación	Núm. de casos	Núm. de muertes
<i>Bacillus cereus</i>	Diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas	Productos cárnicos, leche, vegetales pescado y pan	27,360	0
<i>Campylobacter</i> spp.	Diarrea acuosa, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y dolor abdominal	Pollo crudo, leche cruda, carne de cerdo y vaca y pescado.	1,963,141	99
<i>Clostridium perfringenes</i>	Cólicos abdominales intensos, diarrea	Carne, productos cárnicos, salsas	248,520	7
<i>Listeria monocytogenes</i>	Náuseas, vómito y diarrea	Leche, carne y vegetales crudos, queso, pescado ahumado y crudo.	2,493	499
<i>Salmonella</i> spp	Fiebre, dolor de cabeza y abdominal	Carnes crudas, leche y productos lácteos, huevos, pescado y ensaladas.	1,341,873	553
<i>Shigella</i> spp	Dolor abdominal, diarrea, fiebre, vómitos	Ensaladas, macarrones pollo, vegetales crudos, leche y productos lácteos.	89,648	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	Náuseas, vómitos y dolor abdominal	Carnes y productos cárnicos, huevos, ensaladas, leche y productos lácteos.	185.060	2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Fiebre, diarrea, vómitos y dolor abdominal	Carnes, ostiones leche cruda y pescado.	86,731	2

Fuente: Scientific Status Summary, 2004.

La capacidad de los microorganismos (excepto los virus) para proliferar en un alimento es determinado por el entorno alimentario, así como el entorno en el que los alimentos

se almacenan, designado como el entorno intrínseco y extrínseco de los alimentos respectivamente. Entre los factores intrínsecos de un alimento se incluyen los nutrientes, factores de crecimiento e inhibidores, actividad del agua, pH y etc. Mientras que en los factores extrínsecos en el crecimiento microbiano en un alimento incluyen el medio ambiente, siendo la temperatura, humedad relativa y gases, entre otros. (Ray, 2003).

Las enfermedades transmitidas por alimentos se clasifican en dos (Rodríguez y Col., 2015):

- Infecciones alimentarias: cuando el patógeno está presente en el alimento, se establece y prolifera en el consumidor
- Intoxicaciones alimentarias: las bacterias producen toxinas que se han multiplicado hasta cierta concentración en el alimento, tal aspecto es controlado por las mismas a través del quorum sensing.

2.3.1- *Salmonella*

Barreto y Col. (2016) señalan que el género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está constituido por bacterias Gram negativas, son facultativas, que se han clasificado en las especies *S. enterica* y *S. bongori*. Sin embargo, el potencial patogénico está representado por la especie *S. enterica* y por su gran variedad de serotipos descritos hasta la fecha (Tabla 5). *S. enterica* se divide en 6 subespecies (*enterica* o I, *salamae* o II, *arizonae* o IIIa, *diarizonae* o IIIb, *houtenae* o IV e *indica* o VI) en base a sus características bioquímicas y de estas *S. enterica*, subespecie *enterica* (o subespecie I) se aísla en humanos en la mayoría de los casos (Protocolo de Vigilancia y Alerta de Salmonelosis, 2012).

El género *Salmonella* fermenta glucosa, presenta producción de gas, no fermenta lactosa ni sacarosa; produce de forma irregular el ácido sulfhídrico (H₂S) en el agar Triple azúcar hierro (TSI), no hidrolizan urea, no produce indol, ni β-galactosidasa y generalmente descarboxila la lisina (Organización internacional de normalización, 2002). Para Bayona (2009) las especies de *Salmonella* corresponden a patógenos para humanos y animales, adquiridos por vía oral, causando enteritis, infección sistémica y

fiebre entérica. Se asocian con la ingestión de alimentos contaminados o manipulados inapropiadamente.

Tabla 5. Taxonomía de *Salmonella*.

Especie	Subespecie	Número de serovariedades
<i>S. entérica</i>	<i>entérica</i>	1443 (Typhimurium, Montevideo, etc.)
	<i>salamae</i>	488
	<i>arizonae</i>	94
	<i>diarizonae</i>	323
	<i>houtenae</i>	70
	<i>indica</i>	11
<i>S. bongori</i>		20

Fuente: García y Labbé, 2001.

Barreto y Col. (2016) mencionan que *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) y *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) poseen un amplio rango de hospederos y provocan una enfermedad gastrointestinal en el ser humano en la mayoría de casos. Otros serovares en cambio, tienen una alta especificidad hacia cierto hospedero y generalmente causan la enfermedad en una única especie animal, como es el caso de *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), que afecta sólo al ser humano provocando fiebre tifoidea, una enfermedad sistémica. La epidemiología de transmisión de *Salmonella* varía de cada serovariedad y de las distintas fuentes de contaminación. *S. Typhimurium* ha sido el serotipo más identificado en los casos y representa cerca del 20% de los aislados comunicados por año a los CDC (Koneman, 2008).

La infección por *Salmonella* spp está relacionada con la ingesta de alimentos preparados de manera inadecuada o que se han contaminado durante su manipulación. *Salmonella* se encuentra principalmente en aves de corral, ganado ovino y vacuno, cerdos, aves, burros e incluso mascotas siendo estas, las fuentes principales de contaminación de salmonelosis no tifoidea en humanos. Barreto y Col. (2016) señalan que *Salmonella* se transmite por la ruta fecal-oral, ya sea directamente, o indirectamente, a través de los alimentos. Es capaz de sobrevivir la acidez del estómago y la alta osmolaridad del intestino delgado, induce su internalización por las

células epiteliales intestinales de íleon y resiste la fagocitosis mediada por las células dendríticas y macrófagos, logrando colonizar el tejido linfoide subyacente y los ganglios linfáticos mesentéricos. Contreras-Soto y Col. (2019) indican como otro factor importante de *Salmonella*, su resistencia a antibióticos, lo que aumenta el riesgo de infecciones en humanos y animales debido a la presencia de clones multirresistentes, dificultando más el tratamiento terapéutico de estas enfermedades. En la Tabla 6 se muestran los resultados a pruebas bioquímicas de las distintas especies de *Salmonella*.

Tabla 6. Características diferenciales de las especies y subespecies de salmonelas.

Especie	<i>S. enterica</i>					<i>S. bongori</i>	
Subespecie	I <i>Enterica</i>	II <i>Salamae</i>	III A <i>Arizonae</i>	III B <i>Diarizonae</i>	IV <i>Houtenae</i>	V <i>Indica</i>	
Pruebas bioquímicas							
Dulcitol	+	+	-	-	-	D	+
ONPG	-	-	+	+	-	D	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinasa	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+/-	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
D-tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonato	-	+	-	+	+	+	+
MUG	D	D	-	+	-	D	-
Mucato	+	+	+	(70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	(75%)	+(75%)	-	D	-

+: 90% o más cepas positivas, -: 90% o más cepas negativas, D: Diferentes reacciones por diferentes serovariedades.

Fuente: Koneman, 2008

La detección de *Salmonella* spp por el método tradicional ISO 6579:2002 (Figura 3.) en los alimentos se consiste en distintas etapas:

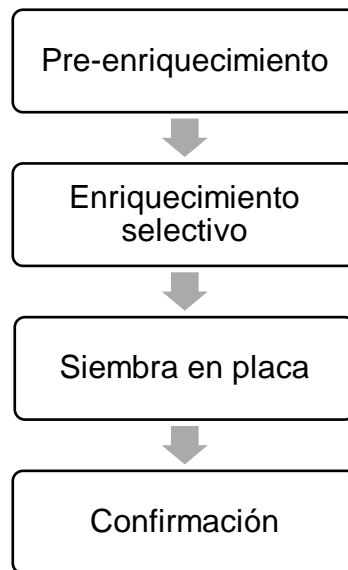


Figura 3. Detección de *Salmonella* spp según el método tradicional (Organización internacional de normalización, 2002).

- Pre-enriquecimiento en medio selectivo no líquido:

En condiciones asépticas, se toma entre 15-50 gramos de muestra, se multiplica por 9, obteniendo así la cantidad de diluyente necesarios para la dilución 1:10. Se tritura y homogeniza el alimento en agua peptonada con ayuda de un stomacher. Se deja incubar en un recipiente estéril a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18-20 horas (Organización internacional de normalización, 2002).

- Enriquecimiento en medio selectivos:

Transcurrido el tiempo de incubación, se siembra la muestra con volumen total de 0.1 ml y se distribuyen 3 gotas de manera separada y a la misma distancia con ayuda de una pipeta automática con punta estéril desechable, en una placa de caldo Rappaport-Vassiliadis peptona de soja (Caldo RVS), cultivo selectivo semisólido, previamente aditivado con una solución de novobiocina. Se incuban las placas en posición invertida a $41.5\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Paralelamente, se transfiere 1 ml de la misma muestra incubada a un tubo de 10 ml de caldo Müller-Kauffmann Tetrionato Novobiocina,

previamente aditivado con una solución de novobiocina y una solución de yodo-yoduro potásico. Se dejan incubar los tubos a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (Organización internacional de normalización, 2002).

- Siembra en placa en agar selectivo

Se utilizan dos medios solidos selectivos, agar XLD y agar Hektoen. Se siembra $1\ \mu\text{l}$ con ayuda de una asa de siembra desechable estéril dentro del borde del halo opaco de crecimiento y se inocula en la superficie de una placa XLD y al mismo tiempo una placa Hektoen con una estría de agotamiento, para obtener colonias aisladas. Se dejan incubar las placas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas en posición invertida (Organización internacional de normalización, 2002).

- Aislamiento en agar no selectivo

Se toma una colonia y se vuelve a aislar en la superficie de agar nutritivo con una asa de siembra, se realiza una estría por agotamiento para obtener colonias, se invierten las placas y se incuban a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (Organización internacional de normalización, 2002).

- Confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella*.

Transcurrido el tiempo de incubación y obtenidas las colonias en el agar nutritivo, se realiza una siembra en un tubo de agar de hierro Kligler, con ayuda de la asa de Nicrom estéril se realiza una primer siembra en picadura en el agar y una segunda siembra en forma de zigzag en la superficie inclinada del medio. Se incuban los tubos a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (Organización internacional de normalización, 2002).

- Confirmación bioquímica: RapiD ONE/API 20E

Se realiza la prueba de oxidasa a partir del tubo de Kligler para definir si es necesario hacer una confirmación bioquímica posterior. Si la zona impregnada vira a un color lila la prueba es oxidasa positiva y por lo tanto *Salmonella* negativa pero si no vira es oxidasa negativa y se prosigue con una confirmación bioquímica final. El test RapiD ONE se basa en un micro método cualitativo para la identificación de Enterobacterias y

bacilos Gram negativos y negativos a oxidasa. Está formado por una galería que contiene 18 pocillos de reacción. Mediante el líquido de inoculación RapID se realiza una suspensión bacteriana que permite rehidratar los pocillos. Se incuba la galería por 4 horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Transcurrido el tiempo de incubación se examina la galería según el cambio de color (Organización internacional de normalización, 2002).

Salmonelosis es una enfermedad bacteriana que se caracteriza por un cuadro clínico que asociado a manifestaciones gastrointestinales o sistémicas que pueden evolucionar. En humanos, las infecciones de salmonelosis no tifoidea se asocian con el consumo de alimentos contaminados, siendo *Salmonellas* no tifoideas identificadas en estos brotes. Los síntomas de salmonelosis comienzan en forma de diarrea que puede ir acompañada de fiebre, náuseas, vómitos, cefalea, mialgias y otros síntomas de 3 a 7 días de duración. La enfermedad es auto limitada para la mayor parte de los casos, aunque también puede evolucionar a una septicemia o una infección localizada (Protocolo de Vigilancia y Alerta de Salmonelosis, 2012).

La salmonelosis es considerada como un problema de salud mundial, afecta a gran número de países y se encuentra relacionada con el consumo de diversos tipos de alimentos. Quesada y Col. (2016) apuntan que la intoxicación ocasionada por *Salmonella* es una de las zoonosis de mayor prevalencia en países desarrollados y una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales en el hombre. El número de infecciones humanas por *Salmonella* spp aproximadamente es superior a 93,800,000 casos anuales, con 155,000 muertes en todo el mundo. En América Latina, Asia y África la incidencia reportada de salmonelosis es de 200 a 500 casos por 100,000 habitantes por año. Rincón (2011) refleja que México es el país más afectado por salmonelosis, ya que su Secretaría de Salud reporta anualmente un promedio de 68,000 casos de infecciones causadas por bacterias del género *Salmonella*. La Tabla 7 muestra los casos de infecciones por *Salmonella* en México de años previos.

Tabla 7. Diversidad de serotipos de *Salmonella* en México aislados de diferentes fuentes desde 1968 hasta 2018.

Serotipo	Origen de asilamiento					Total	%
	Animal	Humanos	Medio ambiente	Alimentos animales	Alimentos vegetales		
Enteritidis	7	190	1	53	6	257	6.61
Typhimurium	47	63	38	100	29	247	6.52
Anatum	25	38	18	120	4	205	5.41
Agona	3	67	5	106	8	189	4.99
Meleagridis	1	41	0	118	0	160	4.22
Oranieburg	32	43	50	2	0	127	3.35
Derby	14	4	0	66	0	84	2.21
Infantis	4	35	7	36	0	82	2.16
Ohio	0	67	0	2	0	69	1.82
Havana	2	8	0	49	0	59	1.55
Arizonae	24	0	0	1	12	37	0.97
Typhi	0	0	6	11	3	20	0.52
Montevideo	2	0	4	0	0	6	0.16
Otras	739	251	173	958	124	2,245	59.51

Fuente: Contreras-Soto y Col., 2019.

El control de *Salmonella* en la cadena alimentaria es bastante complicado, esto es debido a las interrelaciones entre la manipulación por parte del hombre, la contaminación ambiental y el origen del alimento. Barreto y Col. (2016) señalan que las funciones de virulencia y supervivencia que están codificadas en las islas de patogenicidad, la capacidad de formar biopelículas y el progresivo aumento de la resistencia contra los antimicrobianos, constituyen elementos que permiten a *Salmonella* su amplia diseminación y distribución en la naturaleza, transformándose en una amenaza para la salud pública que persiste en el ambiente, en los alimentos y en un amplio rango de hospederos.

La salmonelosis se presenta bajo dos síndromes en la especie humana (Adelantado, 2008):

1. Fiebre entérica, incluyendo la fiebre tifoidea causada por *Salmonella enterica* subs. *enterica* serotipo Typhi y la fiebre paratifoidea, patología similar a la tifoidea pero con sintomatología menos grave, causada por *Salmonella enterica* subs. *enterica* serotipos Paratyphi A, B o C. La fiebre enterica implica una infección sistemática, debido a la capacidad invasiva de las cepas.
2. Gastroenteritis, causada por diversos serotipos de *Salmonella enterica*. Este tipo de infecciones no se acompaña generalmente de una infección sistemática.

La prevención de *Salmonella* exige el control de todas las etapas de producción de los alimentos preparados y destinados al consumo humano, tanto en las industrias como en los hogares (Protocolo de Vigilancia y Alerta de Salmonelosis, 2012):

- Cocinar a temperaturas que rondan los 65°C en el centro del producto.
- Las comidas ya preparadas deben refrigerarse a temperaturas menores a los 5°C.
- Evitar la contaminación cruzada de alimentos crudos de los cocidos.
- Mantener limpias superficies y utensilios una vez se haya cocinado.
- Lavarse las manos con frecuencia al manipular alimentos.
- Establecer programas de control de *Salmonella*.
- Educar a la población, de manera que se evite el consumo de huevos crudos, sucios, rotos o que hayan sido cocinados de forma incompleta.

2.3.1.1- *Salmonella* serovar Montevideo

Allard y Col. (2012) indican que *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Montevideo es uno de los diez serovares más comunes asociados con alimentos contaminados. Lalsiamthara y Hwa (2017) señalan que en los últimos años se ha observado un aumento de las infecciones humanas y los brotes de un serotipo en particular, *Salmonella* Montevideo (SM), en todo el mundo. Se ha informado en los EE. UU., Europa, Australia y Asia, incluidos Corea y Japón. En 2002, se identificaron los primeros brotes de SM en Australia y Nueva Zelanda y, desde entonces, se han

notificado 68 personas infectadas. En 2010, se informó de un brote de SM asociado con un complemento alimenticio dietético en Alemania, y se identificaron 15 infecciones de SM inusuales. En los EE. UU., de 2009 a 2015 se informaron varios brotes de SM y los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) registraron más de 500 casos durante este periodo. *Salmonella enterica* serovar Montevideo está constantemente en la lista de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los 20 serovares de *Salmonella* que causan enfermedades humanas. Las fuentes de los brotes de Montevideo varían, con casos recientes atribuidos a granos de pimienta negra y roja, tahini y pistachos (Nguyen y Col., 2018).

2.4- Antimicrobianos

Calvo y Martínez (2009) mencionan que el descubrimiento de la penicilina en 1929 y su posterior introducción en clínica supuso una verdadera revolución en el tratamiento de la patología infecciosa. Desde entonces, se han incorporado a la práctica clínica decenas de familias de antimicrobianos, con actividad frente a bacterias, hongos, parásitos y virus. Los mecanismos por los que los compuestos con actividad antibacteriana inhiben el crecimiento o causan la muerte en bacterias son muy variados. Los antimicrobianos ejercen su acción estructuras o funciones bacterianas, pueden inhibir la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos.

Quiñones (2017) apunta que desafortunadamente, la evolución en la producción de antimicrobianos se ha acompañado en un incremento importante de la resistencia de bacterias, hongos, parásitos, incluso virus, a diferentes familias de antimicrobianos. Entre los distintos mecanismos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos encontramos:

- Enzimas inactivantes de antibiótico.
- Impermeabilidad de la membrana.
- Alteración de porinas y/o polisacárido.
- Bombas de expulsión.

- Modificación del sitio blanco (diana donde actúa el antibiótico).
- Vías metabólicas alternativas.
- Protección citoplasmática del sitio blanco.

2.4.1- Antimicrobianos naturales

Pastrana-Puche y Col. (2017) señalan que existe la necesidad de disminuir o eliminar los agentes patógenos o alterantes en los alimentos a través de nuevas metodologías de higiene y seguridad, evitando que disminuya la calidad de un alimento o afecte la salud del consumidor. Rodríguez (2011) indica que la demanda de productos frescos sin tratamiento químico está en aumento, así como el interés por usar agentes antimicrobianos de origen natural, por esto actualmente se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente, controlando la población microbiana y permitiendo con esto, productos semejantes al producto fresco pero con menos aditivo. El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica la incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que afecte negativamente a las características del alimento. En la Figura 4 se muestran algunas tendencias de mercado por parte de la población.

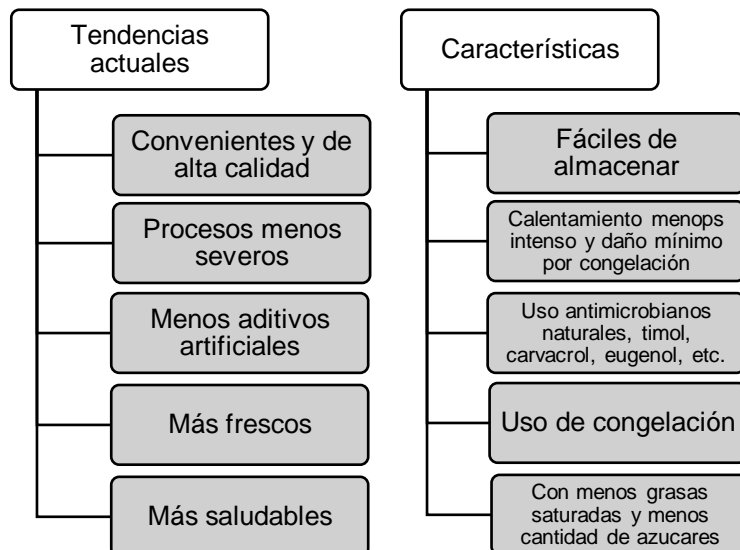


Figura 4. Tendencias de los consumidores que tienen impacto directo en la tecnología y conservación de alimentos (Welti, 1997).

Los antimicrobianos naturales se pueden obtener principalmente de hierbas, plantas, y especias. Lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad (Beuchat y Golden, 1989). Nychas (1995) indica que el uso de antimicrobianos es una práctica común dentro de la industria alimentaria, por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente (que en ciertos casos han causado daño a la salud de los consumidores, si se utilizan en concentraciones altas como en el caso de los sulfitos), siendo rechazados por gran parte de los consumidores de alimentos procesados, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras alternativas. En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados.

Métodos utilizados para la evaluación de la actividad de estos antimicrobianos es a base de pruebas *in vitro* y pruebas de aplicación. Durante estas pruebas es importante que se mantenga bajo control factores como temperatura, pH, actividad de agua, nutrientes entre otras cosas. Rodríguez (2011) menciona que el futuro de los antimicrobianos de origen natural, se encuentra determinado por la actitud de aceptación del consumidor por estos antimicrobianos y el rechazo del consumidor ante los conservadores químicos. Los antimicrobianos de origen natural, se consideran como fuentes seguras, pero su uso real en los productos alimenticios, se ha establecido en muy pocos casos. Cualquiera de estos antimicrobianos de origen natural, deberá ser sometido a rigurosos estudios toxicológicos y confirmar su seguridad. En la Figura 5 se muestran ejemplos de métodos para evaluar la actividad antimicrobiana.

Métodos de evaluación de punto final

- Difusión de agar
- Difusión de agar y caldo
- Gradiente en placa
- Pruebas para desinfectantes

Métodos descriptivos

- Ensayos turbidimétricos
- Curva de inhibición y muerte

Métodos aplicados

- Punto final
- Curva de inhibición y muerte

Métodos para evaluar mezclas de sustancias

Figura 5. Métodos para evaluar la eficacia de los antimicrobianos naturales (Rodríguez, 2011).

Lucera y Col. (2012) establecen que los principales compuestos naturales son los aceites esenciales derivados de plantas aromáticas (albahaca, tomillo, orégano, canela, clavo, romero, etc.), bacteriocinas de fuentes microbianas (nisina, natamicina), ácidos orgánicos (ácido sórbico, propiónico, cítrico), enzimas obtenidas de fuentes animales (lisozima, lactoferrina) y naturalmente polímeros presentes (quitosano). En este contexto, los aceites esenciales están ganando un gran interés por parte de la industria alimentaria por su potencial uso como agentes antimicrobianos, ya que son generalmente reconocidos como seguros (GRAS). Los componentes activos se encuentran generalmente en las fracciones del aceite esencial y está bien establecido que la mayoría de ellos tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, contra patógenos transmitidos por los alimentos y bacterias de descomposición

2.5- Aceites esenciales

Rodríguez (2011) define a los aceites esenciales como líquidos aceitosos obtenidos de diferentes partes de la planta como flores, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. Son una mezcla compleja de compuestos como ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Mientras que para Lucera y Col. (2012) la actividad

antimicrobiana de los aceites esenciales vegetales se debe a su estructura química, en particular a la presencia de grupos funcionales hidrófilos, como grupos hidroxilo de componentes fenólicos y/o lipofilia de algunos componentes de aceites esenciales.

Rodríguez (2011) menciona que la aplicación de antimicrobianos de origen natural, es necesario comprobar su eficacia en medios microbiológicos y en productos alimenticios. Las pruebas “*in vitro*” proporcionan información valiosa respecto a su efectividad antimicrobiana del compuesto, y pueden ser evaluados de igual manera, las variables que afectan a la actividad antimicrobiana, de la cual depende del tipo, género, especie y microorganismo a evaluar. La FAO (1998) estima que existen alrededor de 3,000 aceites esenciales conocidos, de los cuales aproximadamente el 10% tienen importancia comercial y se utilizan ampliamente en diferentes ramas de la industria. En la Figura 6 se muestra la clasificación de los aceites esenciales en base a su consistencia, origen y naturaleza de los componentes mayoritarios.

Consistencia	Origen	Naturaleza química de los componentes mayoritarios
<ul style="list-style-type: none"> • Fluidas • Bálsamos • Concretos y absolutos • Oleorresinas 	<ul style="list-style-type: none"> • Naturales • Sintéticos • Artificiales 	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterpenoides • Sesquiterpenoides • Compuestos oxigenados

Figura 6. Clasificación de los aceites esenciales (Montoya, 2010).

Montoya (2010) señala que los terpenoides o terpenos son las sustancias más abundantes en productos naturales, presentan gran diversidad sensorial. Están conformados por unidades isoprénicas (C₅H₈) que se usan para clasificarlos como en la Tabla 8. Muchos de estos compuestos tienen distintos grupos funcionales, entre estos están ácidos libres, alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, ésteres, etc.

Tabla 8. Clasificación de los terpenoides.

Nombre	Fórmula	Unidades Isoprénicas (C ₅ H ₈)
Monoterpenoides	C ₁₀ H ₁₆	2
Sesquiterpenoides	C ₁₅ H ₂₄	3
Diterpenoides	C ₂₀ H ₃₂	4
Sesterpenoides	C ₂₅ H ₄₀	5
Triterpenoides	C ₃₀ H ₄₈	6
Carotenoides	C ₄₀ H ₆₄	8
Resinoides	(C ₅ H ₈) _n	n

Fuente: Montoya, 2010.

Vaillant y Col. (2009) expresan que los monoterpenos presentes en aceites esenciales son compuestos que resultan menos perjudiciales que los fungicidas químicos desde el punto de vista ambiental. Montoya (2010) menciona que los monoterpenoides son los principales compuestos de los aceites esenciales extraídos de las plantas. Los monoterpenoides se clasifican en acíclicos, monocíclicos y bíciclicos (Figura 7). Los sesquiterpenoides están compuestos por 3 unidades isoprénicas, resultantes del metabolismo secundario de las plantas. Estos compuestos se clasifican en monocíclicos, bíciclicos, tricíclicos y tetracíclicos. Farnesol y nerolidol (Figura 8) son dos sesquiterpenoides muy comunes en los aceites esenciales.

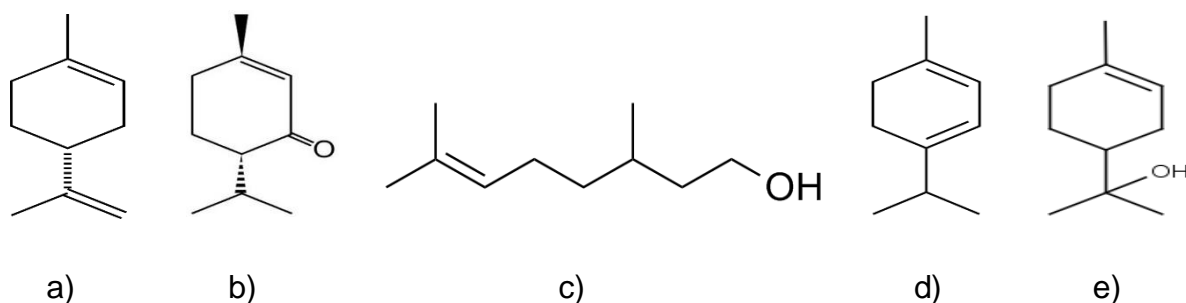


Figura 7. Monoterpenoides con estructura sencilla: a) Limoneno, b) Mentona, c) Citronelol, d) α-Terpineno y e) α-Terpineol (Montoya, 2010).

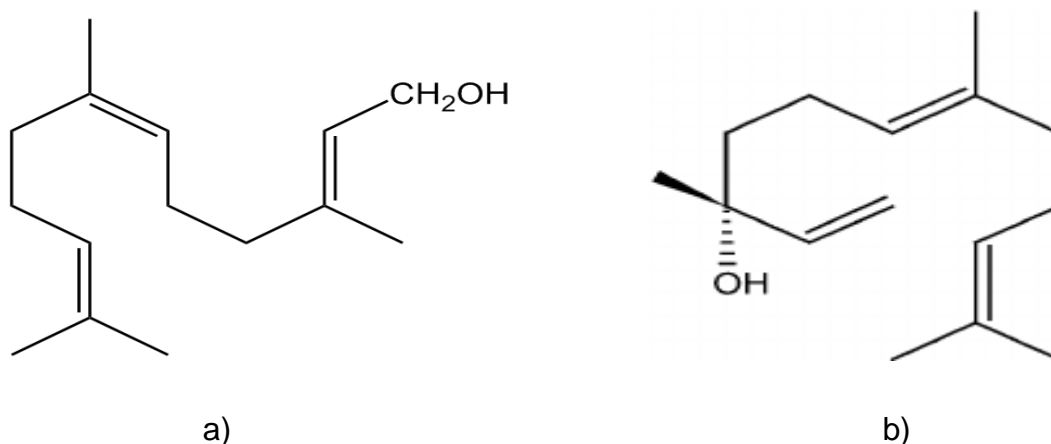


Figura 8. Sesquiterpenoides acíclicos: a) Farnesol y b) Nerolidol (Montoya, 2010).

Cuando se combinan dos o más antimicrobianos, se pueden presentar tres efectos. Uno de ellos es que puede ocurrir un efecto aditivo, este efecto se hace presente cuando el efecto combinado de los antimicrobianos es igual a la suma de los efectos observados de los agentes individualmente o igual al efecto del agente más activo en la combinación. Por lo tanto, este efecto aditivo se hace presente cuando la actividad microbiana de un antimicrobiano no se ve aumentada ni disminuida con la presencia de otro agente antimicrobiano. El segundo efecto que puede ocurrir es la presencia de sinergismo, el efecto inhibitorio que se observa en la combinación de antimicrobianos es mayor a la sumas de los efectos observados de los agentes probados individualmente. Un efecto sinérgico se refiere al incremento de la actividad antimicrobiana de un compuesto antimicrobiano en presencia de un segundo compuesto. Por último, también puede ocurrir un efecto antagónico. Este efecto aparece cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto antimicrobiano es reducida por la presencia de un segundo agente antimicrobiano (Rodríguez, 2011).

2.5.1- Métodos de extracción de los aceites esenciales

Montoya (2010) establece que los aceites esenciales se extraen de los tejidos vegetales mediante diversos procedimientos físicos y químicos según la especie de la planta, las condiciones de cultivo y partes de la planta que se utilizaran. Peredo-Luna y Col. (2009) señalan que la composición de los aceites esenciales y extractos pueden varias de acuerdo al método de extracción utilizado. Las variaciones radican en diferencia a la

proporción de los compuestos. En la Tabla 9 se muestran los distintos métodos de extracción utilizados.

Tabla 9. Métodos de extracción de aceites esenciales

Método		Procedimiento	Productos obtenidos	
Métodos directos		Extrusión	Compresión de cáscaras	Aceites esenciales cítricos
			Raspado de cáscaras	
		Exudación	Lesiones mecánicas en corteza	Gomas, resinas, bálsamos
Métodos indirectos	Destilación	Directa	Aceites esenciales y aguas aromáticas	
		Arrastre con vapor de agua (directo, indirecto, a presión, a vacío)		
		Destilación-maceración (Liberación enzimática de agliconas en agua caliente)		
	Extracción con solventes	Solventes volátiles	En caliente	Infusiones y resinoides alcohólicos
			En frío	Concretos y absolutos
		Solvente fijos (grases y aceites)	En caliente	Absolutos de pomadas
			En frío	Absolutos de enflorados
	Técnicas de vanguardia	Utilización de ultrasonidos en el proceso extractivo de la destilación		
		Extracción por microondas		
		Extracción por fluidos en estado súper crítico		

Fuente: Montoya, 2010.

2.5.2- Métodos de identificación de los componentes de los aceites esenciales

Montoya (2010) señala como los métodos de separación e identificación para aceites esenciales más importantes son: la destilación fraccionada; las técnicas cromatográficas de capa fina; cromatografía de columna; cromatografía preparativa; cromatografía líquida de alta eficiencia (obtención de fracciones); cromatografía de gases (columnas capilares de alta eficiencia); técnicas espectroscópicas,

particularmente la espectrometría de masas (EM), la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectroscopia infrarroja (IR); los sistemas cromatográficos acoplados a técnicas espectroscópicas, especialmente la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM o CG-MS) y la cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia infrarroja (CG-FTIR) y lo último es cromatografía líquida de alta resolución acoplada a cromatografía de masas.

2.5.3- Aplicaciones de los aceites esenciales

Existe una diversidad de consumo de aceites esenciales por parte de la industria, se emplean como aromatizantes, ambientadores, artículos de limpieza, se emplean para la elaboración de jabones, en cremas, licores, desodorantes y en alimentos. La gama de productos en los que se utilizan los aceites esenciales o sus subproductos es amplia y variada (Montoya, 2010):

- Industria farmacéutica y dental: Se utilizan contra enfermedades y en aromaterapia, también en la producción de cremas y artículos de tocador.
- Industria alimentaria y de licores: Se agregan a los alimentos como aditivos naturales, saborizantes, colorantes, antioxidantes y conservadores.
- Industria cosmética, de perfumería, de jabón y de los ambientadores.
- Productos de uso veterinario
- Otros usos

2.5.4- Aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*)

Ljaz y Col. (2008) señalan que la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) pertenece a la familia *Lamiaceae*, es una hierba aromática que se produce en todo el mundo, se cree que su origen nació en la India e Irán, y después fue introducida a Europa durante el siglo XII, tradicionalmente, la albahaca ha sido ampliamente utilizada en alimentos como un saborizante, así como en la perfumería e industrias farmacéuticas. Politeo y Col. (2007) indican que es una fuente de compuestos aromáticos y de aceites esenciales con constituyentes biológicos que poseen propiedades antimicrobianas, insecticidas, fungistáticas y nematocidas. Cardozo-Ugarte y Sosa-Morales (2012) mencionan que debido a la necesidad actual de crear alimentos seguros y funcionales de origen natural,

el aceite esencial de albahaca tiene un amplio potencial de utilización como aditivo en los alimentos, aportando funcionalidades y beneficios al producto final. En la Tabla 10 se muestra los compuestos encontrados en diferentes investigaciones.

Tabla 10. Comparación de la composición química del aceite esencial de albahaca de diferentes variedades.

Compuesto químico	Variedad País	Ebrahim (2006)		Bozin y Col. (2006)	Carovic y Col. (2010)	Politeo y Col. (2007)
		Verde	Morada Irán	Verde S. y M.	Verde Alemania	Verde Croacia
Geranial		27.6	-	-	28.58	-
Estragol		-	-	45.8	0.65	21.7
Cariofileno		1.6	1.2	4.5	1.96	0.3
Neral		18.5	1.2	-	7.15	-
Eugenol		-	-	-	0.57	5.9
Oxido cariofileno		5.4	1.4	0.1	7.12	-
Linalol		-	20.1	24.2	12.15	28.6
1,8-cineol		0.3	0.4	0.1	-	-
Alcanfor		-	0.6	0.3	-	0.5
α -Bergamoteno		0.8	5.2	0	7.96	2.2

Fuente: Cardozo-Ugarte y Sosa-Morales, 2012.

Cardozo-Ugarte y Sosa-Morales (2012) mencionan que las propiedades y uso que le han dado al aceite esencial de albahaca son atribuidos a los componentes mayoritarios tales como metilchavicol, eugenol, linalol, alcanfor y metilcinamato. La composición del aceite va a depender de las hojas, flores y origen de la planta, así como el periodo de siembra y de cosecha pero en general los principales componentes son monoterpenos, fenilpropanoides, sesquiterpenoides y compuestos alifáticos.

2.5.5- Aceite esencial de zacate-limón (*Cymbopogon citratus*)

El *Cymbopogon citratus* es una planta perteneciente a las gramíneas y es cultivada en gran mayoría de países tropicales y subtropicales. Es una planta que exige un espacio

soleado, clima caliente, temperatura 23-27°C y humedad relativa para su cultivo. Wannissorn y Col. (1996) reportaron que el citral es el componente mayoritario del aceite esencial de *C. citratus*, otorgándole un olor característico a limón. Existen alrededor de 120 especies que pertenecen al género *Cymbopogon* con diferente composición química. El aceite esencial se ha utilizado para fines de perfumería, cosméticos, preparaciones farmacéuticas y en la industria alimentaria. Bermúdez-Vásquez y Col. (2019) determinaron la composición del aceite esencial de zacate-limón de dos diferentes orígenes (Tabla 11).

Tabla 11. Valor porcentual de los principales compuestos presentes en los aceites de *Cymbopogon citratus* de Escazú y Sarapiquí en Costa Rica.

Compuesto	<i>Cymbopogon citratus</i>	
	Escazú	Sarapiquí
Mirceno	-	9.18
Limoneno	-	2.47
Isoneral	0.72	3.97
Isogeranial	1.56	3.88
β -citral	30.67	33.01
α -citral	49.61	37.51
Geraniol	-	4.28
2,4-di-tert-butilfenol	-	5.7
Ácido geránico	14.43	-
Ácido 3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenilpropiónico	3.01	-

Fuente: Bermúdez y Col., 2019.

2.5.6- Aceite esencial de menta (*Mentha piperita*)

Paz y Col. (2006) señalaron que la *Mentha piperita* es una de las principales plantas medicinales más utilizadas por el hombre moderno. Pertenece a las *Labiadas* y se conoce como toronjil de menta, menta inglesa, entre otros. Es una hierba aromática con el tallo ramoso y flores pequeñas en verticilos blancos. Maraví (2012) describe que la *Mentha piperita* (Menta), es una especie herbácea, vivaz, con tallos erectos,

cuadrangulares muy ramificados, llega a alcanzar una altura de 80 cm que nace de un rizoma subterráneo del que brota un extenso sistema radicular. Hojas opuestas pecioladas, lanceoladas o agudas, con bordes aserrados, color verde oscuro en la cara superior y más claro en la inferior. Flores agrupadas en tirsos densos, color púrpura. Los estolones son de sección cuadrangular y crecen bajo y sobre la superficie del suelo en todas direcciones. A continuación, en la Tabla 12 se muestran los componentes obtenidos por Solis-Quispe y Col. (2017) de una muestra de aceite esencial de menta cultivada en Perú.

Tabla 12. Principales componentes del aceite esencial de *Mentha piperita* variedad *vulgaris*.

Componente	<i>Mentha piperita</i> (%)
Mentol	35.4±3.2
Metil acetato	19.6±2.0
Mentona	7.1±0.8
Limoneno	5.9±0.2
1,8-cineol	4.8±0.2
Neo mentol	2.9±0.3
Mirceno	1.9±0.1
Terpinen-4-ol	1.9±0.1
(E)-cariofileno	1.8±0.1
α-pineno	0.4±00

Fuente: Solis-Quispe y Col., 2017.

2.5.7- Aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*).

Bartley y Jacobs (2000) señalan que el jengibre (*Zingiber officinale*) se ha utilizado como una especia desde hace más de 2000 años. Tiene un considerable interés comercial y actualmente es uno de las especias más importantes comercializadas internacionalmente. Se cultiva en muchas zonas tropicales y países subtropicales, incluidos India, Nigeria, Fiji, Taiwán, China y Australia. El jengibre es un aditivo común en varios alimentos comerciales y bebidas y es valorada tanto por su aroma,

componentes volátiles y por su picante. Los constituyentes volátiles que imparten el olor característico, agradable (descrito como dulce, cálidos, alcanforados o cítricos) están presentes en el vapor de aceite volátil. Reyes-Najar y Col. (2011) realizaron la caracterización del aceite esencial de jengibre obtenido por la extracción de Soxhlet y por extracción por fluidos supercríticos (Tabla 13).

Tabla 13. Principales componentes de extractos de jengibre obtenidos por soxhlet y por EF.

Compuesto	% Relativo por normalización de áreas			
	Sox ₁	Sox ₂	EFS ₁	EFS ₂
α -zingibereno	1.3	17.5	3.8	2.4
<i>Trans</i> -nerolidol	-	1.4	22.6	-
Decanal	9.9	4.1	4.1	0.3
Limoneno	1.7	1.7	0.4	3.9
β -Burboneno	9.6	1.3	2.6	3.3
Oxido de humuleno	2.5	-	5.4	7.9
α -terpineol	2.2	1.5	1.0	0.6
β -sesquifelandreno	-	13.2	-	-
Nerol	2.8	5.1	2.0	10.3
β -citronelol	2.9	0.4	2.1	-
Citral	3.9	7.9	2.8	12.6

Fuente: Reyes-Najar y col., 2011.

2.6- Fase de vapor

La generación de vapores de los aceites esenciales se basada en crear una atmósfera o un microambiente dado por los propios aceites. Hasta el momento, no se ha encontrado una metodología estándar para evaluar la inhibición antimicrobiana por medio del contacto de los vapores de los aceites esenciales (Reyes-Jurado y Col., 2012). Existen varios métodos utilizados por diferentes autores, los dos principales son: 1) el método de superposición, que es solo una variación simple del ensayo de difusión de disco y puede relacionarse al contacto directo de las películas en las superficies de

los alimentos y 2) el método de la fase de evaporación donde los AE y los microorganismos se colocan por separado en algún entorno sellado y pueden estar relacionados con la inhibición microbiana a distancia sin contacto directo de la película con la comida contaminada (Ávila-Sosa y Col., 2012). Sin embargo, algunos métodos reportados, dentro de los cuales destacan (Reyes-Jurado y Col., 2012):

- Uso de placas invertidas, consiste en inocular los agares con el microorganismo de prueba, una vez que se inocula el microorganismo la placa se invierte y sobre la tapa de la placa se coloca papel filtro, sobre el papel filtro se depositan los aceites esenciales y se mantiene una temperatura controlada. Su principio se basa en la rápida volatilización de los vapores los cuales entran en contacto con el microorganismo.
- Creación de una atmósfera a partir de aceites esenciales, técnica que consiste en utilizar una cámara de plástico con tapa transparente y sellada herméticamente, en su interior y en el centro se coloca cierta concentración del aceite esencial y sobre este una rejilla donde se colocan los agares inoculados, las cámaras se mantienen a temperatura controlada y cerradas herméticamente, de tal manera que los vapores generados por los aceites esenciales entran en contacto con los microorganismos, y consecuentemente su evaporación en el interior del microambiente puede generar zonas de inhibición.

El contacto de vapor es una alternativa cuando los EO y los microorganismos se colocan por separado en un entorno sellado y, por lo tanto, la inhibición microbiana se logra desde la distancia sin contacto directo del agente antimicrobiano con los alimentos (Velázquez-Nuñez y Col., 2013). Algunos estudios han informado que el vapor generado por los aceites esenciales tiene un mayor efecto antimicrobiano en comparación con los aceites esenciales en forma líquida aplicados por contacto directo (Reyes-Jurado y Col., 2019).

Dado que el efecto antimicrobiano de cada aceite esencial es diferente su actividad antimicrobiana puede ser evaluada como la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración mínima requerida del aceite esencial que tiene la capacidad de detener o eliminar el crecimiento del microorganismo. La actividad

antimicrobiana de los aceites esenciales depende de tres características principales: por su carácter hidrófilo o hidrófobo, por sus componentes químicos y por el tipo de microorganismo al que se está atacando (Reyes-Jurado y Col., 2019).

3.- JUSTIFICACIÓN

En años recientes se han reportado un gran aumento en el número de brotes infecciosos a causa del consumo de alimentos contaminados y consumidos por la población.

Esta investigación tiene como finalidad demostrar la efectividad de la aplicación de un tratamiento alternativo a partir de compuestos naturales para la eliminación de patógenos en alimentos siguiendo las nuevas tendencias por parte de la población al consumir alimentos lo más naturales posibles. Los aceites esenciales presentan una alta actividad antimicrobiana en contacto directo. Por lo cual, una exposición directa en fase de vapor de los aceites esenciales en contra de *Salmonella* serovar Montevideo puede ser eficaz, debido a los compuestos volátiles presentes y su gran actividad antimicrobiana en contacto directo.

4.- OBJETIVOS

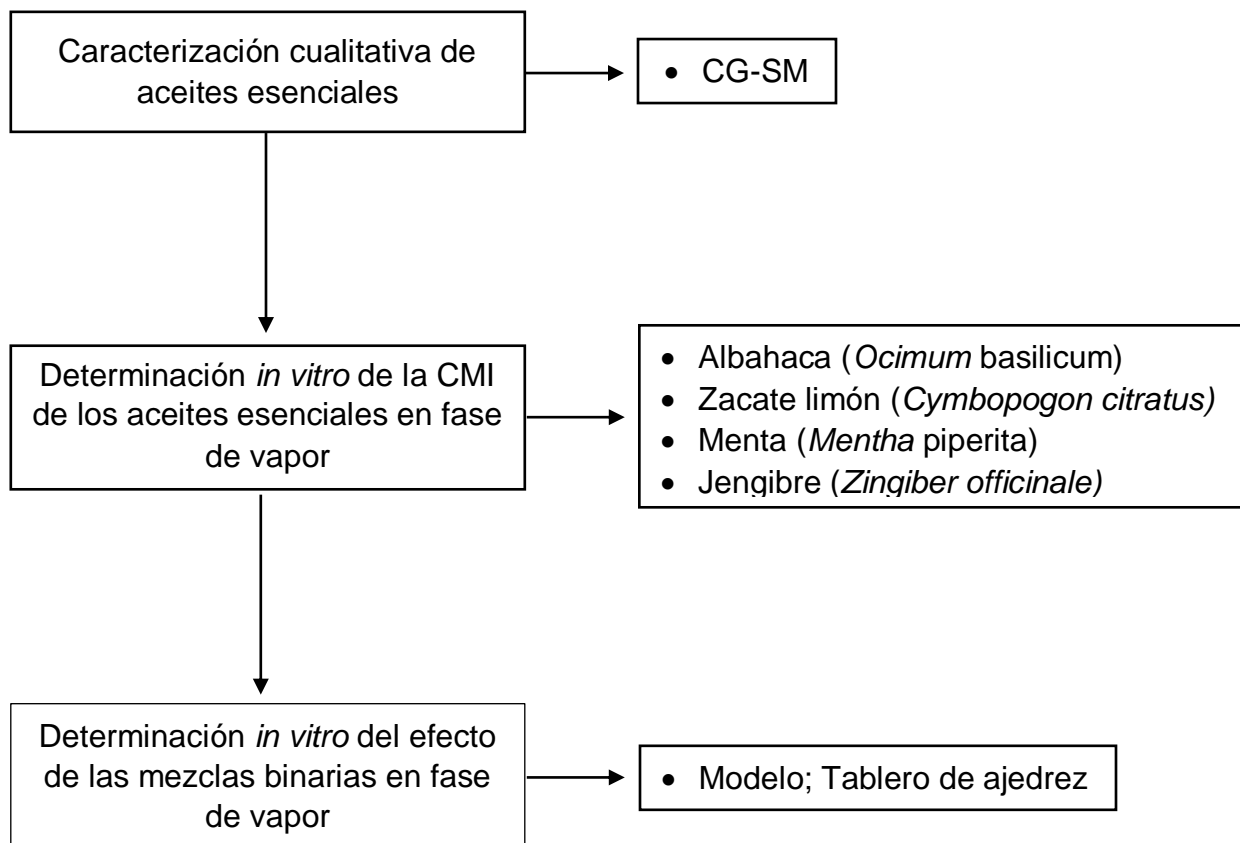
4.1- Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio en fase de vapor de mezclas binarias de aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*), zacate limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*) contra *Salmonella* serovar Montevideo en condiciones *in vitro*.

4.2- Objetivos específicos

1. Realizar una caracterización cualitativa de los de aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*), zacate limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*).
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria en fase de vapor de aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*), zacate limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*) contra *Salmonella* serovar Montevideo *in vitro*.
3. Determinar el efecto de las mezclas binarias en fase de vapor de los aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*), zacate limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*) contra *Salmonella* serovar Montevideo *in vitro*.

5.- DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



6.- MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico: Cepa de *Salmonella* serovar Montevideo proporcionada por el Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.

Aceites esenciales: Se obtuvieron en el Laboratorio Hersol S.A. de C.V.

Material de vidrio y reactivos de grado analítico: los necesarios para cada determinación.

Tabla 14. Equipos utilizados.

Equipo	Marca	Modelo
Balanza	VELAB	VE-5000
Incubadora	BG.	E-41
Campana de flujo	ESEVE	CFL-102V
Parrilla de calentamiento	FISHER CIENTIFIC	ISOTEMP
Micropipeta 1000 µl	LABMATE PRO	LMP 1000
Micropipeta 10 µl – 100 µl	LABMATE PRO	LM100
Refrigerador	WHIRPOOL	WT8240N
Baño María	BARNSTEAD	AQUABATH
Cromatógrafo	AGILENT TECHNOLOGIES	6850N

Tabla 15. Métodos utilizados.

Determinación	Técnica	Referencia
Caracterización cualitativa de aceites esenciales	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (CG-MS)	Sarria, R. A., (2017).
Determinación CMI por contacto de vapor	Técnica de placa invertida	Reyes-Jurado y col. (2019)
Elaboración de mezclas binarias	Modelo tablero de ajedrez	Davidson y col (2005).

7.- METODOLOGÍA

7.1- Caracterización e identificación de los componentes de los aceites esenciales

Los componentes químicos se identificaron cualitativamente mediante la técnica cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-SM), se realizó a través de un cromatógrafo marca Agilent Technologies modelo 6850N, equipado con un detector de masa de triple eje 5975C. Para separar los componentes de los aceites esenciales se usó una columna capilar HP5-MS, se utilizó helio grado cromatográfico como gas acarreador en modo de flujo constante (1.5 mL/min) y el inyector estuvo a una temperatura de 240°C. El tiempo de ejecución total fue de 45 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo durante 10 minutos a 60°C. Posteriormente, se incrementó cada 5 minutos hasta alcanzar 240°C y se mantuvo en este valor durante 50 minutos. Los extractos fueron diluidos 1:100 (v/v) con éter dietílico y 1 µL de la muestra diluida se inyectó de forma automática. El inyector y detector de temperatura se fijaron en 250 y 280°C respectivamente. Los componentes de los aceites esenciales se cuantificaron por porcentaje de área de pico relativa y se identificaron mediante la comparación de su patrón de fragmentación de masas con los almacenados en la base de datos del NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología)

7.2 Determinación *in vitro* de la concentración mínima inhibitoria los aceites esenciales y mezclas binarias.

Se preparó un caldo soya tripticasa inoculando *Salmonella* serovar Montevideo previamente identificada y se incubó por 24 horas. A partir de este cultivo se realizaron diluciones seriadas en tubos de ensayo con agua peptonada al 0.1%, se inició por una dilución 1:10 hasta llegar a 1:100000. Se realizó el sembrado con la técnica de extendido en placa en medios de agar soya tripticasa, se trabajó con un volumen de 10 µl del caldo TSA de las diluciones 1:1000 y 1:100000. Se invirtió la placa petri y en la tapa se colocó un pedazo de papel filtro estéril, al cual se le agregaron distintos volúmenes de aceite esencial, se preparó el duplicado correspondiente a cada volumen que se evaluó. Se selló la caja petri con parafilm para evitar que se escapara la fase de vapor del aceite esencial, se realizaron los respectivos controles de trabajo, del medio de cultivo, del ambiente y de agua peptonada. Se incubó la placa por 24 horas y

transcurrido el tiempo se hicieron las determinaciones de la concentración mínima inhibitoria. Esta técnica se evaluó en cada uno de los aceites esenciales de importancia. Igualmente se evaluaron de manera *in vitro* las mezclas binarias, el proceso fue idéntico con la diferencia que al invertir la placa, se colocaron 2 pedazos de papel filtro estéril, se agregaron dos aceites esenciales, uno en cada papel filtro sin que estos llegasen a entrar en contacto.

La cantidad que se agregó de cada aceite se determinó a través del modelo; tablero de ajedrez (Tabla 16). El cual consistió en que una vez que determinada la concentración mínima inhibitoria individual de cada aceite esencial, se aplicaron combinaciones con 25, 50 y 75% de la CMI. Con ayuda de un tablero de ajedrez se hicieron las mezclas binarias correspondientes, en el eje superior se representaron los valores de uno de los aceites esenciales y en el eje izquierdo los valores de otro aceite esencial y se hicieron las mezclas binarias.

Tabla 16. Modelo tablero de ajedrez para mezclas binarias de aceites esenciales en fase de vapor.

		Aceite Esencial 2.			
		CMI	25%	50%	75%
Aceite Esencial 1.	25%	25%-25%	25%-50%	25%-75%	
	50%	50%-25%	50%-50%	50%-75%	
	75%	75%-25%	75%-50%	75%-75%	

Fuente: Davidson y col., 2005.

Se realizaron los duplicados y controles correspondientes, se sellaron las placas con parafilm evitando que la fase de vapor se escapara, se dejaron incubando por 24 horas, y así, se determinó la concentración mínima inhibitoria de cada mezcla binaria que fue evaluada.

Para obtener el índice de concentración inhibitoria fraccionada (ICIF) se realizaron los siguientes cálculos (Reyes-Jurado y Col., 2016):

$$CIF_{Indice} = CIF_A + CIF_B \quad (1)$$

$$CIF_A = \frac{(CMI \text{ de } A \text{ en presencia de } B)}{(CMI \text{ de } A \text{ individualmente})} \quad (2)$$

$$CIF_B = \frac{(CMI \text{ de } B \text{ en presencia de } A)}{(CMI \text{ de } B \text{ individualmente})} \quad (3)$$

Si bien el ICIF se calcula en base a la CMI de cada aceite esencial en combinación, el valor que resulta indica el efecto de la mezcla:

- Si el ICIF es < 1.0, la mezcla es sinérgica.
- Si el ICIF es = o cercano a 1.0, la mezcla es aditiva.
- Si el ICIF es > 1.0 y hay crecimiento bacteriano, la mezcla es antagónica.

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1- Caracterización e identificación de los componentes de los aceites esenciales.

8.1.1- Aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*)

En la Tabla 17 se muestran los principales componentes del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*). El componente mayoritario es linalol (cerca del 50% de la composición total del aceite esencial) seguido por estragol (en una proporción menor pero significativa en comparación a los demás compuesto obtuvo un porcentaje de 21%) actuando como el segundo componente mayoritario. En menor porcentaje se determinó eucaliptol, α -bergamotano, eugenol y β -pineno. Mientras que las determinaciones de Rivas y Col. (2015) arrojaron 14 constituyentes que representan el 77.2% del aceite esencial, entre ellos, isoestragol (58.33%), humuleno (5.71%), eucaliptol (4.09%) y β -linalol (2.71%) actuaron como los componentes mayoritarios. Pérez y Col. (2018) determinaron como componentes mayoritarios a eugenol (45.15%) y β -elemeno (23.11%). Por su parte, Cardozo-Ugarte y Sosa-Morales (2012) hicieron una recopilación de determinaciones de varios autores de diferentes países, entre ellos, Ebrahim (2006) que determinó albahaca verde (geranial 27.6%) y morada (linalol 20.1%) originarias de Irán, Bozin y Col. (2006) realizaron un análisis a una especie nativa de Serbia y Montenegro cuyo componente mayoritario resulto el estragol (45.8%), Carovic y Col. (2010) en Alemania y Politeo y Col. (2007) en Croacia determinaron como componentes mayoritarios a geranial (28.58%) y linalol (28.6%) respectivamente. Cada determinación muestra distintos componentes mayoritarios para el aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) y sus variedades.

Tabla 17. Principales componentes del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*).

Componente químico detectado	Área (%)	Tiempo de retención (min)
Linalol	42.77	18.93
Estragol	21.10	21.51
Eucaliptol	8.00	12.88
α -Bergamoteno	2.88	12.88
Eugenol	2.77	25.55
β -Pino	2.05	9.55
Germacreno D-4-ol	2.00	29.28
Tau-cadinol	1.65	32.25
β -Elemeno	1.34	26.12
Bornyl acetato	1.27	23.27
α -Cariofileno	1.22	27.77
δ -Cadineno	1.05	29.39
β -Cubebeno	1.39	28.41
Cariofileno	1.00	26.80
(-)-Espatulenol	0.88	30.69
α -Pino	0.81	6.48
Cubenol	0.76	31.59
α -Bulneseno	0.75	28.93
3,5,5-Trimetil-9-metilen-2,4 α ,5,6,7,8,9,9 α -octahidro-1H-benzo(α)ciclohepteno	0.71	29.68
Nerol	0.61	21.83
Longifoleno	0.47	28.67
Alcanfor	0.52	19.96
Isoaromadendreno	0.34	35.54

8.1.2- Aceite esencial de zacate-limón (*Cymbopogon citratus*)

La caracterización del aceite esencial zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) determinó como componentes a γ -muroleño (8.20%), farnesol (5.79%), canfeno (5.54%), limoneno (4.87%) y β -citral (39.21%) representando casi el 75% total del aceite esencial, actuando β -citral como agente mayoritario (Tabla 18). En estudios previos, Fernández (2009) reportó como compuesto mayoritario al citral (65%). Bermúdez-Vásquez y Col. (2019) determinaron los componentes mayoritarios de dos aceites esenciales de zacate-limón de distinto origen, uno de Escazú y otro de Sarapiquí ambos en Costa Rica. En ambas cuantificaciones se determinaron como componentes

mayoritarios a α -citral y β -citral con diferentes porcentajes. Otros componentes con menor porcentaje que se cuantificaron en ambos estudios fue mirceno, acetato de geraniol, geraniol entre otros. En las 3 determinaciones, el componente que actúa como mayoritario es el citral en diferentes porcentajes.

Tabla 18. Principales componentes del aceite esencial de zacate-limón (*Cymbopogon citratus*).

Componente químico detectado	Área (%)	Tiempo de retención (min)
β -Citral	39.21	23.77
γ -Muroleno	8.20	29.63
Farnesol	5.79	27.46
Canfeno	5.54	8.40
Limoneno	4.87	13.04
Isopulegol	4.16	20.46
(+)-Canfeno	4.07	14.22
α -Citral	3.41	26.82
Isogeraniol	3.38	19.56
(3Z)- β -Ocimeno	2.19	15.49
Isoeugenol	2.07	29.07
α -Cembrenediol	1.96	42.08
Etil linalol éter	1.90	18.07
Linalol	1.87	17.31
Acetato de geraniol	1.81	28.03
β -Cubebeno	1.46	29.52
Sulcatona	1.02	11.03
Geranil vinil éter	1.01	27.28
1,2-15,16-Diepoxihexadecano	0.88	12.05
β -Cariofileno óxido	0.83	31.61
α -Pineno	0.71	6.84
Elemol	0.64	30.75
Geranil linalol	0.53	41.64

8.1.3- Aceite esencial de menta (*Mentha piperita*)

El aceite esencial de menta (*Mentha piperita*) mostró como componente mayoritario a la mentona (32.31%), en porcentaje similar al mentol (15.26%) y 4-Isopropil-1-metilciclohexanol (19.34%) pero mucho menor en comparación al de mentona (Tabla 19). Estos resultados difieren con los reportados por Martínez (2019) en el cual el componente mayoritario es el mentol (51.8%), seguido por la mentona (20.5%) y

acetato de metilo (6.6%). De la misma manera, caracterizó una segunda especie de menta, *Menta longifolia* L, la cual presentó distintos compuestos, siendo óxido de piperitenona (39.5%) y óxido de piperitona (35.8%) los componentes mayoritarios y en menor porcentaje compuestos como β -cariofileno (5.0%) y 1,8-cineol (4.8). Solis-Quispe y Col. (2017) concluyen que el componente mayoritario obtenido por su parte es el mentol (35.4%), otros componentes determinados fueron el metil acetato (19.6%) y mentona (7.1%). Es importante mencionar como la especie puede influir en los componentes químicos presentes en los aceites esenciales, ya que, muchos reportes previos registran principalmente al mentol o alguno de sus isómeros como componentes mayoritarios.

Tabla 19. Principales componentes del aceite esencial de menta (*Mentha piperita*).

Componente químico detectado	Área (%)	Tiempo de retención (min)
Mentona	32.31	19.95
4-Isopropil-1-metilciclohexanol	19.34	21.07
Mentol	15.26	21.57
Isomentol acetato	6.26	23.93
Eucalyptol	4.25	13.99
Isomentol	3.72	20.17
Cariofileno	3.62	26.90
β -Pino	1.67	8.41
Pulegona	1.50	22.44
β -Cubebeno	1.19	28.05
α -Pino	1.12	7.00
Piperitona	0.79	22.90
β -Bourboneno	0.62	25.81
Isocariofileno	0.60	27.53
γ -Elemeno	0.38	28.60
α -Terpinen	0.34	13.99
γ -Terpinen	0.24	14.78
β -Elemeno	0.17	25.97
Metil acetato	0.16	23.05
Elixeno	0.14	24.53
β -Elemeno	0.17	25.97
δ -Cadineno	0.11	29.11

8.1.4- Aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*)

La CG-SM caracterizó el aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*), obteniendo a canfeno y a 2-ciclohexen-1-ol-(1-metil)-4-(1-metiletil)-cis como compuestos principales con un porcentaje de 11.35% y 10.98% respectivamente (Tabla 20). Vásquez y Col. (2001) determinaron como componente mayoritario α -zingereno (22.22%), también *ar*-curcumeno (13.11%) entre otros compuestos. Mientras que los resultados por parte de Martínez y Col. (2007) son bastante distintos, el geranial fue el componente mayoritario con 14%, seguido de neral con 10.4% y con un porcentaje más bajo borneol y geraniol con 4.0% y 3.5% respectivamente. En un estudio más actual, Reyes-Najar y Col. (2011) obtuvieron extractos de jengibre mediante dos técnicas distintas de extracción; por Soxhlet y por fluidos supercríticos. En la extracción por Soxhlet se identificaron como componentes mayoritarios a decanal y α -zingibereno mientras que por la extracción de fluidos supercríticos se cuantificó como mayoritarios a *trans*-nerolidol y citral. Se observa que la composición depende del tratamiento para la obtención del aceite esencial, de su tipo de cultivo y cosecha que sufre.

En general, hay una gran diferencia con respecto a los componentes de cada aceite esencial evaluado y comparado con otros estudios. Esta diversidad de componentes, se debe a los diversos factores agronómicos del cultivo así como a la especie de la planta, el método de extracción utilizado, su duración, incluso la temperatura utilizada tienen repercusión para la composición del aceite esencial, las partes de la planta de donde se extrae el aceite esencial igualmente tienen un impacto en la composición. De igual manera se debe tener en cuenta que los aceites esenciales están en permanente cambio (oxidación) por lo tanto se debe tener en consideración el almacenamiento en condiciones adecuadas para mantener una estabilidad.

Tabla 20. Principales componentes del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*).

Componente químico detectado	Área (%)	Tiempo de retención (min)
Canfeno	11.35	23.77
2-ciclohexen-1-ol,(1-metil) -4-(1-metiletil)-cis	10.98	13.34
β-Pineno	4.44	10.05
α-Pinene	4.39	6.97
Diepi-α-cedieno epoxido	4.87	13.04
α-Terpineol	4.16	20.46
1,3,3-Trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene	4.07	14.22
Borneol	3.41	26.82
Bornil acetato	3.38	19.56
Tolueno	2.19	15.49
1-Heptatriacotanol	2.07	29.07
Guaniol	1.96	42.08
α-Isopropil-1,5-dimetil-1,2metileno-5-azatriciclo	1.90	18.07
Alcanfor	1.87	17.31
Hexanal	1.81	28.03
Triciclo(2,2,1,0(2,6))heptano,1,7,7-trimetil	1.46	29.52
2-Hexanona,4-metil	1.02	11.03
β-Citronelol	1.01	27.28
δ-Elemeno	0.88	12.05
Geranil genariol	0.83	31.61
Fenol,2-metil-5-(1,2,2-metilciclopentil)	0.71	6.84
Ciclosativeno	0.64	30.75
E-Nuciferol	0.53	41.64

8.2- Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*), zacate-limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*) contra *Salmonella* serovar en fase de vapor por 24 horas de incubación.

En la Tabla 21, se pueden observar las concentraciones mínimas inhibitorias (µl/L aire) de los diferentes aceites esenciales evaluados por contacto en fase de vapor. Es complicado realizar una comparación directa de los resultados con los ya reportados en la literatura. Muchos autores reportan diversos métodos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, se reportan en diferentes unidades,

en algunos casos no se menciona la composición química del aceite esencial evaluado o el experimento no se hizo en fase de vapor.

Tabla 21. Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales contra *Salmonella serovar* Montevideo

Aceite esencial	Concentración mínima inhibitoria (µl/L aire)
Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	1,500
Zacate-limón (<i>Cymbopogon citratus</i>)	5,000
Menta (<i>Mentha piperita</i>)	40,000
Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	50,000

De los aceites esenciales evaluados, el de albahaca (*Ocimum basilicum*) demostró un gran efecto antimicrobiano contra *Salmonella serovar* Montevideo. Rivas y Col. (2015) evaluaron a *Salmonella enteritis* de forma directa con aceite esencial de albahaca (*O. basilicum*), presentando una actividad antimicrobiana ligera (200 mg/mL) por el método de agar envenenado. Mientras que Beltrán y Col. (2013) reportaron que *O. basilicum* L. var. *Cinammom* utilizando la técnica de macro dilución en caldo presentó inhibición a concentraciones más altas del aceite esencial (0.8 -1.6%) en comparación a *O. basilicum* L. var. *album* y *O. thyriflorum* (0.2 -0.8%), tampoco utilizaron una fase de vapor. La actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) depende de sus componentes ya que un porcentaje alto corresponde a compuestos que son aldehídos, alcoholes y compuestos fenólicos que tienen una alta respuesta antimicrobiana que queda demostrado ya que es el aceite esencial que necesitó menor concentración para una respuesta antimicrobiana positiva.

Igualmente, la gran efectividad del aceite esencial zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) se debe a los compuestos presentes. Bermúdez-Vásquez y Col. (2019) determinaron la actividad inhibitoria de 2 aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* de distinta localización a través de una prueba de difusión en disco de manera directa, 10 µl de aceite esencial, en ambos aceites se presentaron inhibición contra *Salmonella Typhimurium* de 26.67% y 36.67%, para *Salmonella enteritidis* el porcentaje de inhibición fue de 40% y 46.67% y para *Salmonella Cholerasuis* 50% en ambos casos.

Guerra y Col. (2004) demostraron una CMI de 2.0 mg/mL del mismo aceite esencial por la técnica de dilución de medio en tubo contra *Salmonella* Typhimurium.

Por parte de los aceites esenciales de menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*) no presentan una alta eficacia antimicrobiana contra *Salmonella* serovar Montevideo ya que se necesita una alta concentración del aceite esencial para que se presente un efecto de inhibición importante. Esto es debido a los compuestos presentes, estos contienen grupos funcionales como cetonas o hidrocarburos que presentan menor actividad antimicrobiana que otros grupos funcionales. El aceite esencial de menta (*Mentha piperita*) presenta como componente mayoritario, mentona (32.31%) perteneciente al grupo funcional cetonas, la mentona se deriva de otro componente presente en la cuantificación, el mentol (15.26%) que es un alcohol, cuyo grupo funcional tiene una mayor efectividad antimicrobiana que las cetonas. Se puede afirmar que el aceite esencial de menta (*Mentha piperita*) está en una etapa de cambio metabólico por los componentes detectados ya que no tuvo una gran efectividad antimicrobiana. En el aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*) su compuesto con mayor porcentaje canfeno (11.35%) tiene un porcentaje bajo para ser considerado como un compuesto mayoritario, ya que muchos estudios previos consideran un porcentaje de 25-75% para un compuesto mayoritario. Este bajo porcentaje del aceite esencial puede estar influenciado por una etapa de enranciamiento por parte del aceite esencial al no tener una estabilidad estable.

8.3- Determinación del efecto de las mezclas binarias en fase de vapor

Las combinaciones binarias se hicieron a partir de CMI individual de los aceites esenciales, en este caso solo se evaluaron el aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) y el de zacate-limón (*Cymbopogon citratus*), ya que presentaron el mayor efecto de inhibición contra *Salmonella* serovar Montevideo en comparación al de menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*), los cuales necesitaron concentraciones mayores para presentar un efecto de inhibición. A partir de las 9 combinaciones obtenidas del modelo tablero de ajedrez, 4 presentaron inhibición del crecimiento bacteriano después de 24 horas de incubación (Tabla 22).

Tabla 22. Efecto inhibitorio de las distintas combinaciones de la mezcla binaria de aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) y zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) contra *Salmonella* serovar Montevideo en fase de vapor por 24 horas de incubación y el ICIF correspondiente.

% de CMI		<i>Salmonella</i> serovar Montevideo	ICIF	Efecto
Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	Zacate-limón (<i>Cymbopogon citratus</i>)			
25	25	C	-	-
	50	C	-	-
	75	NC	1.00	Aditivo
50	25	C	-	-
	50	C	-	-
	75	NC	1.25	Aditivo
75	25	C	-	-
	50	NC	1.25	Aditivo
	75	NC	1.50	Aditivo

C, Crece; NC, No crece.

Al realizar los cálculos para obtener el ICIF se puede observar que la combinación de albahaca (*Ocimum basilicum*) y zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) 25%-75% respectivamente, presentó un efecto aditivo. Para el resto de las combinaciones, se obtuvieron valores de 1.25 (valor cercano a 1.00, indicando un efecto aditivo). La combinación 75%-75% se obtuvo un valor 1.50 que representa un efecto antagónico, pero el hecho de no observar crecimiento bacteriano muestra un efecto aditivo y que esta combinación funciona para controlar el crecimiento bacteriano del microorganismo. Davidson y Col. (2005) indican que un efecto aditivo deberá estar en un rango ICIF entre 0.5 y 2.0 para pruebas de antimicrobianos. El efecto aditivo se hace presente cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto no mejora ni se reduce en presencia de otro agente, por lo que en cualquiera de los casos se observará un efecto inhibitorio contra *Salmonella* serovar Montevideo. Por lo tanto, hay que tomar en cuenta para la decisión final de utilizar mezclas binarias o aceites esenciales de manera individual en fase de vapor, el costo de estos. Es importante resaltar que en las mezclas binarias un aceite esencial va a actuar como antimicrobiano principal. Esto se observa

en la combinación 25%-75% de albahaca (*Ocimum basilicum*) y zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) ya que se obtuvo un efecto aditivo. Sin embargo, si se analiza el porcentaje inverso de la combinación hay crecimiento bacteriano. Concluyendo que el aceite esencial de zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) es el que contiene los componentes antimicrobianos principales de esta mezcla. Finalmente de las cuatro combinaciones, se considera la más efectiva, la que utiliza menor concentración de ambos aceites esenciales en este caso la combinación de albahaca (*Ocimum basilicum*) y zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) 25%-75% respectivamente

La finalidad de desarrollar mezclas binarias es para mantener la inocuidad, tener un efecto antimicrobiano y evitar el exceso de concentración de un aceite esencial utilizado de manera individual. La aplicación de estos compuestos en fase de vapor en alimentos proporciona la ventaja de que al no ser aplicado directamente, no modifica las características sensoriales del alimento y de este modo se puede asegurar que los alimentos se conserven en buenas condiciones y que no sean rechazados por el consumidor.

A pesar de no contar con estudios previos relacionados con la mezcla binaria evaluada o del microorganismo, existen estudios como Techathuvanan y Col. (2014) que evaluaron el efecto antimicrobiano de la mezcla binaria de aceites esenciales de mostaza blanca y olivo a través del ensayo de dilución en caldo, obteniendo un efecto sinérgico contra *Salmonella* Enteritidis y Zhou y Col. (2007) demostró efectos sinérgicos cuando se combina timol con carvacrol, cinamaldehído con carvacrol y cinamaldehído con timol contra *Salmonella* Typhimurium.

9.- CONCLUSION

La caracterización química determinó como componente mayoritario al linalol (42.77%) en el aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*), β -Citral (39.21%) en el aceite esencial de zacate-limón (*Cymbopogon citratus*), la mentona (32.31%) en el aceite esencial de menta (*Mentha piperita*) y como componente principal en el aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*), al canfeno (11.35%) cuyo porcentaje es bajo para un componente mayoritario. En general, se determinaron más de 20 distintos componentes en cada aceite esencial.

El aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) presentó el mayor efecto inhibitorio de todos los aceites esenciales evaluados en fase de vapor de manera individual, seguido del aceite esencial de zacate limón (*Cymbopogon citratus*).

La efectividad antimicrobiana del aceite esencial de menta (*Mentha piperita*) y el aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*) es baja en comparación a los dos aceites esenciales anteriores, esto es debido a la composición química del aceite esencial y el ciclo metabólico que tienen actualmente.

Al determinar el ICIF de la mezcla binaria evaluada en fase de vapor de aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) y aceite esencial zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) contra *Salmonella* serovar Montevideo presento un efecto aditivo, la combinación 25% y 75% de albahaca (*Ocimum basilicum*) y zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) respectivamente, resultó ser la combinación más efectiva.

10.- SUGERENCIAS

Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*), zacate-limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinale*) individualmente en un *test in vivo* en semillas de chía inoculadas con *Salmonella* serovar Montevideo.

Evaluar la mezcla binaria de aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) y zacate-limón (*Cymbopogon citratus*) en un *test in vivo* en semillas de chía inoculadas con *Salmonella* serovar Montevideo en una cámara de vapor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adelantado, F. C., & Real Escuela Oficial y Superior de Avicultura. (2008): La *Salmonella*, de actualidad desde siempre. Arenys de Mar: Real Escuela de Avicultura.
2. Aguilar, J., (2012): Métodos de conservación de alimentos. Editorial Red Tercer Milenio. ISBN 978-607-733-150-6.
3. Allard M. W., Luo, Y., Strain, E., Li, C., Keys, C. E., Son, I., ... Brown, E. W., (2012): High resolution clustering of *Salmonella enterica* serovar Montevideo strains using a next-generation sequencing approach. BMC Genomics. 2012; 13: 32. doi: 10.1186/1471-2164-13-32
4. Arispe, I. y Tapia, M., (2007): Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. Agroalimentaria, 13(24) ,105-117. ISSN: 1316-0354.
5. Avendaño, B. D., Rindermann, R. S., Lugo, S. Y., y Mungaray, A., (2006): La inocuidad alimentaria en México: Las hortalizas frescas de exportación. Mexicali, B.J., México: Univ. Autónoma de Baja California.
6. Ávila-Sosa, R., Palou, E., Jiménez Munguía, M. T., Nevárez-Moorillón, G. V., Navarro Cruz, A. R., y López-Malo, A., (2012): Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, orstarch edible films. International Journal of Food Microbiology 153 (2012) 66–72. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.017
7. Barreto, M., Castillo-Ruiz, M. y Retamal, P., (2016): *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. Revista chilena de infectología, 33(5), 547-557.
8. Bartley, J. P., y Jacobs, A. L., (2000): Effects of drying on flavour compounds in Australian-grown ginger (*Zingiber officinale*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(2), 209–215. doi:10.1002/(sici)1097-0010(20000115)80:2<209::aid-jsfa516>3.0.co;2-8
9. Bayona, M. A., (2009): Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá. Rev. U. D.C.A. Act. Y Div. Cient, 12 (2): 9-17.
10. Blanco-Ríos, F. A., Casadiego-Ardila, G. y Pacheco, P. A., (2011): Calidad microbiológica de alimentos remitidos a un laboratorio de salud pública en el año 2009. Revista de Salud Pública, 13(6), 953-965. ISSN: 0124-0064.
11. Beltrán, M. C., Cantillo, M. P. y Vivas, A. M., (2013): Actividad antibacteriana de los aceites obtenidos de *Ocimum basilicum L. var. cinammom*, *O. album*, *O. thyriflorum*,

- para uso potencial en fitocosmética. Laboratorio COBILAN Fundación Universitaria del Área Andina Seccional Pereira. Investig. Andina vol.15 no. 27 Pereira Sept. 2013
12. Berastegui, E., (2010): Métodos de conservación de alimentos. Universidad Nacional de Cajamarca, Perú. Rev. Recitelia. Editorial Lab MSD. ISSN 2027-6850.
 13. Bermúdez-Vásquez, M. J., Granados-Chinchilla, F. y Molina, A., (2019): Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. *Agronomía Mesoamericana*, vol. 30, núm. 1, 2019 Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
 14. Beuchat, L. y Golden, D., (1989): Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 43(1): 134-142.
 15. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., y Anackov, G., (2006): Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54 (5). 1822-1828.
 16. Calvo, J. y Martínez-Martínez, L., (2009): Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Vol. 27. Núm. 1. Páginas 44-52. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
 17. Cardozo-Ugarte G. A. y Sosa-Morales, M. E., (2012): Propiedades del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y sus aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 6-1: 54-65
 18. Carovic, K., Orlic, S., Politeo, O., Strikic, F., Kolak, I., Milos, M. y Satovic, Z., (2010): Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa*. *Food Chemistry.* 119(1): 196-201.
 19. Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J.A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J. y Castro-del Campo, N., (2019): Los últimos 50 años de Salmonella en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista bio ciencias*, 6(spe), e54
 20. Davidson, P. M., Sofos, N. J., Branen, A. L. (2005). *Antimicrobials in food.* (3ª ed.) Estados Unidos: Editorial CRC:Taylor & Francis Group.
 21. De la Fuente, N. y Barbosa, J. E., (2010): Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*, vol. 20, núm. 1, enero-abril, 2010, pp. 43-52.7.
 22. Ebrahim, S., (2006): Analisis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.). From Irán. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 14(3):128-130.

23. Fernández. C., (2009): Evaluación del efecto repelente del té de limón (*Cymbopogon citratus*) utilizado a diferentes diluciones contra la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) en ganado bovino de doble propósito durante el mes de enero de 2008 en Salamá, baja Verapaz (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Guatemala.
24. García, S. y Labbé, R. G., (2001): Guide to foodborne pathogens: [an international symposium entitled "Food Pathogens - Current Concerns and Approaches to Control" was held in 1998 in Monterrey, Mexico]. New York: Wiley.
25. Guerra, M., Rodríguez, M., García, G. y Llerena, C., (2004): Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). *Stapf. Revista Cubana de Plantas Medicinales*
26. Guevara, A. y Cancino, K., (2008): Métodos apropiados para inactivar o controlar el deterioro microbiológico en alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de industrias alimentarias.
27. Koneman, E. W., (2008): Koneman diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color. Buenos Aires [etc.: Panamericana.
28. Lalsiamthara, J., y Hwa, J., (2017): Pathogenics traits of *Salmonella* Montevideo in experimental infections *in vivo* and *in vitro*. *Scientific Reports* 7:46232; doi: 10.1038/srep46232; published online 07 April 2017; updated on 04 May 2017.
29. Ljaz, A., Anwar, F., Hussain, S. T. y Przybylski, R., (2008): Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Science*, 108: 986-995.
30. Lucera, A., Costa, C., Conte, A., y Del Nobile, M. A. (2012): Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00287
31. Maraví, GG., (2012): Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: *Mentha piperita* (Menta), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) Sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Cándida albicans* ATCC 90028 [Tesis]. Lima-Perú: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico de la Universidad de Wiener,
32. Martínez, J. J., (2019): Composición química y actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Mentha longifolia* y *Mentha x piperita*. Trabajo de fin de grado de Ciencia y Tecnología de Alimentos. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA. 2019. Valencia, España.

33. Martínez, J. R., Ferrada, P. J., Leyva, M. A. y Stashenko, E. E., (2007): Rendimiento y composición química del aceite esencial de *Zingiber officinale* en función del diámetro de partícula. Scientia et Technica Año XIII, No 33, Mayo de 2007. UTP. ISSN 0122-1701
34. Mercado, C. E., (2007): Los ámbitos normativos, la gestión de la calidad y la inocuidad alimentaria: una visión integral. Agroalimentaria, 12(24), 119-131.
35. Montoya, G., (2010): Aceite esenciales: Una alternativa de diversificación para el eje cafetero. Universidad Nacional De Colombia Sede Manizales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. I.S.B.N 958-8280-26-4
36. Nguyen, S. V., Harhay, D. M., Bono, J. L., Smith, T., Fields, P. I., Dinsmore, B. A., Santovenia, M., Wang, R., Bosilevac, J. M. y Harhay G. P., (2018): Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Montevideo reveals lineage-specific gene differences that may influence ecological niche association. Microbial Genomics 2018; 4.
37. Nychas, G. J. E., (1995): Natural antimicrobials from plants. New Methods of Food Preservation, 58–89. doi:10.1007/978-1-4615-2105-1_4
38. Organización internacional de normalización (2002): Microbiología de alimentos y piensos - Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. ISO 6579:2002
39. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (2003): Estrategia de la FAO Relativa al Enfoque de Calidad e Inocuidad de los Alimentos Basado en la Cadena Alimentaria: Documento Marco para la Formulación de la Futura Orientación Estratégica. Comité de Agricultura. 17 Período de Sesiones. Roma: FAO.
40. Paz, N., Maceira, M. A., Corral, A. y González, C., (2006): Actividad antiparasitaria de una decocción de *Mentha piperita* Linn. Revista Cubana de Medicina Militar, 35(3).
41. Palomino-Camargo, C. y González-Muñoz, Y., (2014): Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Rev Perú Med Exp Salud Pública. pp 31(3):535-46.
42. Pastrana-Puche. Y. I., De Paula, C. D. y Gallo-García, L. A., (2017): Evaluación de sustancias antimicrobianas naturales en la conservación de avena sinuana. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria, Mosquera (Colombia), 18(2): 321-334 ISSN 0122-8706
43. Peredo-Luna, H.A., Palou-García, E. y López-Malo A., (2009): Aceites esenciales: Métodos de extracción. Temas selectos de ingeniería en alimentos 3-1. 24-32.
44. Pérez Cordero, A., Vitola Romero, D. y Chamorro Anaya, L., (2018): Actividad del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) contra *colletotrichum gloeosporioides* de

- ñame (*dioscorea alata*). Universidad de sucre, facultad de ciencias agropecuarias. Rev. U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica, 21(1), 99-108
45. Politeo, O., Jukic, M. y Milos, M., (2007): Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*. 101 (1): 379-385.
 46. Protocolo de vigilancia y alerta de salmonelosis (2012) Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
 47. Quesada, A., Reginatto G. A., Ruiz, E. A., Colantonio, L. D. y Burrone M. S., (2016): Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. Rev. Perú Med Exp Salud Pública
 48. Quiñones, D., (2017): Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3), 1-17.
 49. Ray, B., 2003: Fundamental Food Microbiology. CRC PRESS.
 50. Reyes-Najar, A. Castro-Vargas, H. I., Rodríguez-Varela, L. I., Quijano-Celis, C. E. y Parada-Alfonso, F., (2011): Obtención de extractos de jengibre (*Zingiber officinale*) empleando CO2 supercrítico. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 35 (136): 381-385, 2011. ISSN 0370-3908.
 51. Reyes-Jurado, F., Palou, E. y López-Malo, A., (2012): Vapores de aceites esenciales: alternativa a antimicrobianos naturales. Temas selectos de ingeniería en alimentos 6-1 29-39.
 52. Reyes-Jurado, F., López-Malo, Aurelio y Palou. E., (2016): Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Journal of Food Protection*, Vol. 79. No. 2. Pages 309-315. Doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-392.
 53. Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A. R., Ochoa-Velasco, C. E., Palou, E., López-Malo, A. y Ávila-Sosa, R., (2019): Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
 54. Rincón, D. P., (2011): Transmisión de Salmonella enterica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, vol. 43, núm. 2, mayo-agosto, 2011, pp. 167- 177
 55. Rivas, K., Rivas, C., y Gamboa, L., (2015): Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Multiciencias*, 15(3), 281-289.[fecha de Consulta 9 de Agosto de 2020]. ISSN: 1317-2255.

56. Rodríguez, H., Barreto, G., Sedrés, M., Bertot, J., Martínez, S., y Guevara, G., (2015): Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 16(8), 1-27.
57. Rodríguez, E. N., (2011): Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. ra ximhai, 7(1),153-170. ISSN: 1665-0441
58. Sarria, R. A., (2017): Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
59. Scientific Status Summary, (2004): Bacteria Associated with Foodborne Diseases, report of the Institute of Food Technologists, Washington, D.C. pp. 1-25.
60. Solis-Quispe, L., Solis-Quispe, J. A., Aragon-Alencastre, L. J., Fernández. M. D., Hernández, I., Rodeiro, I, y Pino, J. A., (2017): Composición química y actividad antioxidante de aceites esenciales de *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita* L. var. vulgaris cultivados en Cusco, Perú. Revista CENIC. Ciencias Químicas, 48(1), 41-47. ISSN: 1015-8553.
61. Techathuvanan, C., Reyes, F., David, J. R. D. y Davidson, P. M., (2014): Efficacy of commercial natural antimicrobials alone and in combinations against pathogenic and spoilage microorganisms. J. Food Prot. 77:269–275.
62. Vaillant, D., Romeu, C., Ramos E., González, M., Ramírez, R. y González, J., (2009): Efecto inhibitorio in vitro de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad*, 13(3), 197-200
63. Vásquez, S. M., Suárez, H. y Zapara, S., (2009): Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de carnes. Rev. Chil. Nutr. Vol. 36, N° 1.
64. Vásquez, O., Alva, A. y Marreros, J., (2001): Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). UNAP. Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Iquitos-Perú. Revista Amazónica de Investigación Alimentaria, v.1, n 1, p. 38 – 42.
65. 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
66. Wannissorn, B., Jarikasem, S., y Soontorntanasart, T., (1996): Antifungal Activity of Lemon Grass Oil and Lemon Grass Oil Cream. Phytotherapy Research, 10(7), 551–554. doi:10.1002/(sici)1099-1573(199611)10:7<551::aid-ptr1908>3.0.co;2-q

67. Welti. J., (1995): Investigación en ciencia y tecnología de alimentos: estado actual y desarrollo futuro en la conservación y procesamiento de alimentos. Cuadernos de Nutrición. 21(4):21-28.
68. Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., Li, J. y Yan, W., (2007): The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Safety*, 27(2), 124–133. doi:10.1111/j.1745-4565.2007.00064.x

Anexos

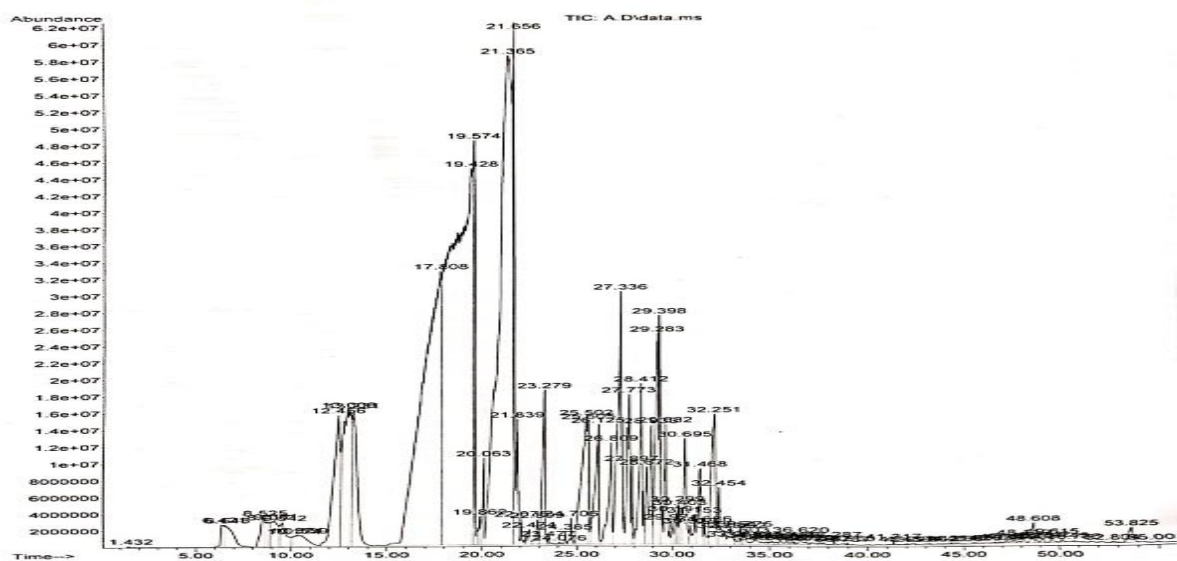


Figura 9. Cromatograma obtenido de una GC-MS de aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*).

