

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS



LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

TESIS:

“ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN POR CONTACTO DE VAPOR DE *Escherichia coli*
Y *Salmonella spp* EN PELÍCULAS COMESTIBLES DE ALMIDÓN ADICIONADAS
CON ANTIMICROBIANOS NATURALES”.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p. QFB. GUADALUPE ANTONIO YAÑEZ

DIRECTOR DE TESIS:

D. C. RAÚL AVILA SOSA SÁNCHEZ

ASESOR:

D. C. ADDÍ RHODE NAVARRO CRUZ

Puebla, Puebla. Abril 2015

DEDICATORIA

A mis padres, por su inmenso amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, porque gracias a ustedes y a su constante apoyo hoy tengo este gran logro, y he podido llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Los amo y los admiro y les estaré eternamente agradecida, ha sido un privilegio ser su hija, gracias por todo, gracias por ser los mejores padres que puedan existir.

Agradecimientos

A Dios por estar siempre conmigo y darme la fuerza para seguir adelante y nunca rendirme.

A mis hermanos Darío, Elba y Sergio, por su cariño, por ser mi mano derecha siempre, por ser mi ejemplo de superación, por estar siempre presentes apoyándome y acompañándome.

A mi tía Tere por su gran apoyo, por su cariño, por su compañía y por sus innumerables consejos.

A ti mi Amor Victor, por creer en mí, por ser mi mayor ejemplo de nunca rendirme, por ser mi complemento, por alentarme a dar lo mejor de mí y por estar siempre a mi lado demostrándome que no existe obstáculo que no podamos superar siempre que estemos juntos. Te amo.

A Kari, Yeni, Luz, Nora, Liz, Ana, Yetzi, Miguel Ángel, Alan E., Martin, por iniciar juntos un sueño, por ser mi apoyo en la universidad, por todos los bonitos momentos que vivimos juntos y por demostrarme que los amigos son para siempre.

Al Doctor Raúl Avila Sosa Sánchez, por haberme aceptado en este proyecto, por su gran apoyo, por su esfuerzo y su dedicación.

A Ale por haber iniciado esta etapa a mi lado y por su apoyo incondicional.

A Silvia, Lupita y a Miriam por ser unas excelentes personas y unas increíbles amigas que me han acompañado siempre.

Y a todas aquellas personas que comparten este triunfo conmigo

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	JUSTIFICACIÓN	3
3	OBJETIVOS	4
3.1	OBJETIVO GENERAL	4
3.2	OBJETIVOS PARTICULARES	4
4	MARCO TEÓRICO	5
4.1	Deterioro de alimentos.....	5
4.2	ETA´S.....	9
4.3	<i>Escherichia coli</i>	13
4.4	<i>Salmonella spp</i>	16
4.5	Métodos de conservación	18
4.5.1	Métodos físicos de conservación	18
4.5.2	Métodos químicos de conservación	20
4.6	Antimicrobianos de origen natural.....	21
4.7	Aceites esenciales naturales.....	23
4.7.1	Carvacrol	25
4.7.2	Timol.....	26
4.7.3	Eugenol	26
4.7.4	Cinamaldehído	27
4.8	Películas Comestibles.....	27
4.9	Contacto por vapor	29
5	DIAGRAMA DE TRABAJO	31
6	MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1	Material.....	32
6.2	Medios de Cultivo	32
6.3	Material Biológico	32
6.4	Equipos.....	32
6.5	Métodos de Determinación	33
7	METODOLOGÍA	34
7.1	Identificación de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella spp</i>	34
7.2	Elaboración de películas comestibles de almidón adicionadas con una solución madre de timol, carvacrol, eugenol y cinamaldehído pH=5.....	34
7.3	Determinación de la CMI por contacto de vapor	34
7.4	Elaboración de películas comestibles adicionadas con mezclas binarias y evaluación del efecto antibacterial.....	35
7.4	Cálculo del Índice FIC.....	36
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
8.1	Concentración mínima inhibitoria.....	37
8.2	Mezclas Binarias.....	38
8.3	Determinación del índice FIC.....	42
9	CONCLUSIONES	49
10	SUGERENCIAS	50

11 BIBLIOGRAFÍA.....	51
12 ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias causantes de ETA's, fuentes típicas, síntomas e información adicional.

Tabla 2. Grupos de *E. coli*, mecanismo patogénico, clínica y epidemiología.

Tabla 3. Componentes de aceites esenciales que presentan actividad antimicrobiana.

Tabla 4. Equipo utilizado.

Tabla 5. Métodos utilizados y su referencia.

Tabla 6. Modelo del tablero de ajedrez utilizado en la realización de las mezclas binarias.

Tabla 7. Efecto correspondiente de las mezclas binarias para los valores de índice FIC.

Tabla 8. CMI (mg/L) de carvacrol, cinamaldehído, timol y eugenol adicionadas a películas comestibles sobre *E. coli* y *Salmonella spp.* por contacto en fase de vapor.

Tabla 9. Efecto de las mezclas binarias de cinamaldehído y carvacrol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *E. coli* por contacto en fase de vapor.

Tabla 10. Efecto de las mezclas binarias de cinamaldehído y timol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *E. coli* por contacto en fase de vapor.

Tabla 11. Efecto de las mezclas binarias de carvacrol y timol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *E. coli* por contacto en fase de vapor.

Tabla 12. Efecto de las mezclas binarias de cinamaldehído y carvacrol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *Salmonella spp.* por contacto en fase de vapor.

Tabla 13. Efecto de las mezclas binarias de cinamaldehído y timol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *Salmonella spp.* por contacto en fase de vapor.

Tabla 14. Efecto de las mezclas binarias de carvacrol y timol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *Salmonella spp.* por contacto en fase de vapor.

Tabla 15. Determinación del índice FIC de la mezcla binaria de carvacrol y cinamaldehído frente a *E. coli* por contacto en fase de vapor.

Tabla 16. Determinación del índice FIC de la mezcla binaria de cinamaldehído y timol frente a *E. coli* por contacto en fase de vapor.

Tabla 17. Determinación del índice FIC de la mezcla binaria de carvacrol y timol sobre *E. coli* por contacto en fase de vapor

Tabla 18. Determinación del índice FIC de la mezcla binaria de carvacrol y timol sobre *Salmonella spp.* por contacto en fase de vapor

Tabla 19. Concentración Mínima Inhibitoria reportada para bacterias y para hongos en contacto directo.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria
ETA's:	Enfermedades Transmitidas por Alimentos.
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
WHO:	World Health Organization
SSA:	Secretaria de Salud.
IMSS:	Instituto Mexicano del Seguro Social.
EPEC:	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC:	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
EIEC:	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EHEC:	<i>E. coli</i> enterohemorrágica.
EAEC:	<i>E. coli</i> enteroagregativa
DAEC:	<i>E. coli</i> de adherencia difusa.
VTEC:	<i>E. coli</i> verotoxigénico.
SHU:	Síndrome Urémico Hemolítico.
kDa:	Unidad de masa atómica, también denominada uma o Dalton.
HEp-2:	Células de cultivo neoplásicas.
CO ₂ :	Dióxido de carbono.
Aw:	Actividad del agua.
SO ₂ :	Anhídrido sulfuroso.
ATP:	Adenosín trifosfato.
GRAS:	Generally Recognized as Safe.
EMB:	Eosina y Azul de Metileno Agar.
SS:	Salmonella Shigela Agar.
FIC:	Concentración Fraccional Inhibitoria.

EOS: Essential oils (aceites esenciales).

AA: Aire del Ambiente.

RESUMEN

Las películas comestibles son recubrimientos que están formados por materiales de carácter biodegradable que pueden ser aplicados sobre el alimento y sirven como barrera contra los agentes externos, además pueden funcionar como vehículos de sustancias necesarias para la conservación de los alimentos como son los antimicrobianos y conservadores.

Una de las características de los aceites esenciales obtenidos de diversas plantas es su capacidad de volatilizarse y ser arrastrables por vapor, esta característica puede utilizarse como un medio en el que los antimicrobianos derivados de diversos aceites esenciales puedan ejercer un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano por contacto indirecto con los alimentos.

El principal objetivo de este trabajo consistió en elaborar películas comestibles a base de almidón donde se incorporaron agentes antimicrobianos naturales como son: carvacrol, cinamaldeído, timol y eugenol, a diferentes concentraciones. Se evaluó el efecto por contacto de vapor de los antimicrobianos individualmente frente a *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, que son de las principales bacterias contaminantes de alimentos y productoras de ETA's.

De igual forma se evaluó el efecto inhibitorio por contacto de vapor de las mezclas binarias de estos antimicrobianos adicionados en las películas y se evaluaron de la misma forma frente a *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, observando diferencias significativas en el efecto inhibitorio por contacto de vapor de dichas mezclas.

Finalmente se concluyó que los antimicrobianos naturales adicionados a películas comestibles si poseen un efecto bactericida por contacto de vapor frente a las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* a las siguientes concentraciones: 250 mg/L de Carvacrol, 350 mg/L de Cinamaldeído, 400 mg/L de Timol y 2000 mg/L de Eugenol para *Escherichia coli*, mientras que 600 mg/L de Carvacrol, 500 mg/L de Cinamaldeído, 600 mg/L de Timol y 5000 mg/L de Eugenol para *Salmonella spp*. De igual forma se evaluaron las mezclas binarias obteniendo un mejor resultado en la mezcla de Carvacrol y Timol tanto para *E. coli* como para *Salmonella spp*.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana en los alimentos es un tema muy estudiado ya que puede causar una gran variedad de enfermedades siendo las bacterias uno de los grupos de microorganismos más importantes, pues son las que causan el espectro más amplio de enfermedades, además de que son las que han demostrado mayor resistencia a los múltiples métodos de conservación y eliminación a los que son sometidos (Artés, 2006).

En la actualidad ha surgido la necesidad de buscar alternativas de conservación, esto debido a que se ha asociado el consumo de conservadores químicos con intoxicaciones. La demanda de productos frescos mínimamente tratados está aumentando, así como el interés por los agentes antimicrobianos de origen natural, por esto en la actualidad, se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana, permitiendo con esto productos semejantes al producto fresco pero con menos aditivos. El principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, nutricionalmente adecuados y cubrir las expectativas de sabor, aroma y apariencia, por lo cual el uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y a su garantía sanitaria (Rodríguez, 2011).

Las películas comestibles tienen la capacidad de actuar como barreras de migración de humedad, de gases como el O_2 y CO_2 así como acarreador de aditivos alimentarios como son los antioxidantes y los agentes antimicrobianos. El auge de su aplicación en la conservación de alimentos se debe a que provienen de biopolímeros, materiales que son renovables y biodegradables, contribuyen a disminuir el problema de la contaminación creado por los empaques tradicionales elaborados a base de polímeros sintéticos (Caamal-Herrera y col. 2011).

Los agentes antimicrobianos pueden incorporarse a los alimentos en películas comestibles para proporcionar estabilidad microbiológica, puesto que las películas

pueden ser utilizadas como portadoras de una gran variedad de aditivos para prolongar la vida útil del producto y reducir el riesgo del crecimiento microbiano sobre la superficie de los alimentos. La adición de agentes antimicrobianos a películas comestibles ofrece ventajas tales como el uso de una pequeña concentración de antimicrobiano y bajas tasas de difusión. (Ávila-Sosa y col., 2012).

Los aceites esenciales derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos. Los constituyentes activos de estos aceites son normalmente compuestos volátiles, hidrofóbicos y muy lábiles (Rodríguez, 2011).

Una de las limitaciones en el uso de aceites esenciales como antimicrobianos en alimentos, es que al utilizarlos de manera directa (fase líquida), son menos eficaces en alimentos que de forma in vitro, por lo que se tienen que utilizar concentraciones mayores para obtener el mismo efecto, con el inconveniente de que se modifican los atributos sensoriales del alimento y se altera la calidad del mismo; por ello es necesario experimentar otras alternativas de aplicación, como el uso de aceites esenciales en fase de vapor (Reyes y col., 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos representan uno de los problemas de salud pública más importantes, debido a la gran incidencia de casos producidos por microorganismos presentes en la superficie de los alimentos que se consumen, es por esta razón que la utilización de películas comestibles representa una nueva alternativa en la conservación de alimentos, ya que, éstas actúan como soporte de aditivos capaces de conservar y mejorar la calidad de los alimentos.

Actualmente, en la industria alimentaria existe una fuerte tendencia a seleccionar productos basados en compuestos naturales con el fin de satisfacer las demandas de los consumidores de alimentos saludables y libres de aditivos químicos. Así, los antimicrobianos obtenidos de aceites esenciales son los compuestos naturales más demandados por sus reconocidas propiedades antimicrobianas.

El contacto indirecto mediante la vaporización de antimicrobianos es una posible alternativa para la preservación de alimentos, ya que existen evidencias de que compuestos volátiles pueden inhibir el crecimiento de microorganismos.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inhibición por contacto de vapor sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* de carvacrol, cinamaldheído, eugenol y timol así como sus mezclas binarias adicionadas a películas comestibles de almidón.

3.1 Objetivos particulares

- Elaborar películas comestibles de almidón adicionadas con carvacrol, cinamaldheído, eugenol o timol a pH de 5
- Determinar por contacto de vapor la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las películas de almidón a pH de 5 adicionadas con carvacrol, cinamaldheído, eugenol o timol en *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*
- Realizar películas comestibles de almidón adicionadas con mezclas binarias de los antimicrobianos utilizados con la concentración mínima inhibitoria (CMI) previamente determinada.
- Evaluar el efecto antibacterial por contacto de vapor de películas comestibles de almidón adicionadas con mezclas binarias de carvacrol, cinamaldheído, eugenol y Timol sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Deterioro de alimentos

Todos los alimentos tanto si proceden de tejidos u órganos animales como de tejidos u órganos vegetales, son productos de carácter perecedero y, por consiguiente, sometidos al deterioro gradual determinado por numerosas reacciones bioquímicas. El grado de deterioro puede ser muy rápido o relativamente lento, dependiendo sobre todo del contenido de agua biológicamente activa, lo que equivale al concepto fisicoquímico de actividad de agua. Los alimentos con una elevada actividad de agua, como la leche, la carne, el pescado y los vegetales, se deterioran en tan solo unos días, mientras que los frutos secos, que contienen una pequeña cantidad de agua estructural, pueden ser almacenados durante periodos largos en condiciones ambientales adecuadas, sufriendo escasas alteraciones en su composición y sus características organolépticas (Gil, 2010).

Los alimentos están expuestos a alteraciones en mayor o en menor grado, pudiéndose clasificar en: perecederos que son aquellos que se alteran fácilmente, semiperecederos que permanecen estables durante cierto tiempo y los estables que se conservan estables durante un tiempo prolongado (Pascual, 2005).

Los alimentos pueden deteriorarse por varios tipos de agentes, físicos, químicos y biológicos. Los agentes físicos suelen actuar durante los procesos de cosecha y los tratamientos posteriores. En general, por sí mismos, no suelen producir una alteración de las características nutricionales de los alimentos, pero sí de su apariencia. Los agentes físicos representan una vía de entrada a otras alteraciones. Entre las alteraciones de tipo físico se destacan:

- Las mecánicas, como golpes, cortes, en general sin graves alteraciones nutricionales, pero implican una disminución de la vida útil del alimento.
- La temperatura, ya que las actividades químicas y enzimáticas aumentan su velocidad cada 10°C, por tanto, aceleran los procesos naturales de descomposición. Asimismo existen nutrientes especialmente sensibles al calor

como es el caso de algunas vitaminas, que se ven afectadas con el aumento de la temperatura.

- La humedad que puede originarse en los mismos alimentos o tener origen ambiental. Su efecto más notable es facilitar el desarrollo de microorganismos.
- El aire, especialmente por contener oxígeno que puede alterar algunas proteínas, producir cambios de color, facilitar la oxidación, etc.
- La luz, que afecta al color y a algunas vitaminas.

Los agentes químicos se manifiestan especialmente durante los procesos de almacenamiento de los alimentos, sin depender de la actividad enzimática de éstos. Su efecto puede afectar de forma notable la comestibilidad del alimento: rancidez oxidativa, pardamiento, etc. Entre los cambios más notables se encuentran:

-Pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard, que consiste en una serie de reacciones complejas entre azúcares y proteínas, las cuales generan pigmentos marrones. En general el calor y la desecación lo favorecen.

-Rancidez oxidativa de lípidos, que se produce por reacciones de hidrólisis y oxidación. Ocurre la formación de compuestos volátiles, que dan olores y sabores característicos (a rancio). La rancidez oxidativa depende de la estructura de los lípidos, siendo más frecuente en grasas insaturadas (aceites, pescados, frutos secos) (Barreiro y col., 1994, Salas y col., 2005).

Por otro lado, los alimentos pueden tener alteraciones originadas por sustancias o compuestos ajenos a los alimentos que pueden incorporarse de forma accidental a partir del medio ambiente, o involuntariamente durante los diversos tratamientos a los que los alimentos son sometidos. Las interacciones entre producto y embalaje pueden, en algunos casos, significar una fuente de contaminación, debido a la migración de sustancias químicas a los productos alimenticios. Son ejemplos de este tipo de contaminantes de los alimentos: metales pesados, hidrocarburos policíclicos, aminas heterocíclicas, residuos de plaguicidas y aditivos alimentarios siempre que estos se encuentren por encima de los límites permitidos. Las consecuencias de estos

contaminantes abarcarían desde los cambios sensoriales hasta posibles riesgos de tipo toxicológico que originan intoxicaciones por agentes químicos (Hernández y col., 1999).

El deterioro microbiológico es causado por microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) que pueden crecer en el alimento bajo ciertas condiciones. Los microorganismos consumen los nutrientes (proteínas, carbohidratos, grasas y minerales) presentes en el alimento, multiplicándose en este y produciendo diversas sustancias como consecuencia de su metabolismo, algunas de las cuales pueden ser tóxicas para el ser humano. Los microorganismos pueden deteriorar a los alimentos de dos formas fundamentales, la primera, simplemente deteriorándolos al crecer en ellos, alterando sus propiedades organolépticas como color, olor, textura, sabor y apariencia, y la segunda contaminándolos o produciendo toxinas en forma tal que puedan originar problemas a la salud pública mediante enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) (Barreiro y col., 1994; Barreiro y Sandoval, 2006).

El conocimiento de los factores que favorecen o inhiben la multiplicación de los microorganismos, es esencial para comprender los principios tanto de la alteración como de la conservación de los alimentos. Los principales factores de la composición de todo alimento que influyen en la actividad microbiana son: pH, actividad de agua, temperatura y oxígeno. Cada microorganismo tiene un pH mínimo, un pH óptimo y un pH máximo de crecimiento. A las células microbianas les afecta de forma importante el pH de los alimentos, ya que carecen de un mecanismo que regule su pH interno. En general las levaduras y los mohos toleran mejor la acidez que las bacterias. Los alimentos cuyo pH es bajo, como es el caso de la mayoría de las frutas, no son alterados fácilmente por las bacterias pero si son sensibles a las alteraciones por mohos y levaduras (Ulloa, 2006).

El agua no solo contribuye a las propiedades reológicas y de textura de un alimento, sino que a través de sus interacciones con los diferentes componentes determina el tipo de reacciones químicas que se pueden suscitar en el alimento. El término "actividad del agua" establece el grado de interacción del agua con los demás constituyentes de los alimentos, y es una medida indirecta del agua disponible para

llevar a cabo las diferentes reacciones a las que están sujetas estas sustancias químicas o para el desarrollo microbiano (Herrera y col., 2003).

Los microorganismos presentan temperaturas óptimas de crecimiento (a las cuales se desarrollan más rápidamente), temperaturas mínimas (por debajo de las cuales no crecen) y temperaturas máximas (por encima de las cuales tienden a inactivarse). Dependiendo del nivel óptimo de temperatura para su crecimiento los microorganismos se clasifican en: termófilos, mesófilos y psicrófilos. Los microorganismos termófilos, como su nombre lo indica, presentan su temperatura óptima de crecimiento a temperaturas relativamente elevadas, normalmente en el rango entre 45 y 55°C, pudiendo algunos incluso crecer a temperaturas de hasta 70°C. Los microorganismos mesófilos tienen temperaturas óptimas de crecimiento intermedias, normalmente entre 20 y 45°C; debido a que la temperatura del cuerpo humano (37°C) se encuentra en este rango, la mayoría de los microorganismos patógenos al hombre pertenecen a esta categoría. Los microorganismos psicrófilos o criofílicos crecen bien a bajas temperaturas de hasta -10°C. El término psicrótrofo se emplea para describir a aquellos microorganismos que, aun cuando son esencialmente mesofílicos en cuanto a su óptimo de crecimiento, pueden crecer a bajas temperaturas. En términos generales, al descender la temperatura, la tasa de crecimiento de los microorganismos tiende a disminuir. (Barreiro y col., 1994; Barreiro y Sandoval, 2006).

Los microorganismos, al igual que otros seres vivos, requieren de oxígeno para llevar a cabo sus procesos metabólicos y por ende su crecimiento. En cuanto a sus requerimientos de oxígeno, los microorganismos se clasifican en aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos. Los microorganismos aerobios necesitan el oxígeno presente en el aire para su crecimiento; en este grupo se incluyen prácticamente todos los mohos y la mayoría de las levaduras y bacterias. Los microorganismos anaerobios no requieren del oxígeno del aire para su crecimiento, lo obtienen de otros compuestos mediante procesos metabólicos, a este grupo pertenecen algunas bacterias. Al grupo de anaerobios facultativos pertenecen aquellos microorganismos que pueden comportarse tanto en forma aeróbica como anaeróbica, dependiendo del ambiente que los rodee, como algunas bacterias y levaduras (Barreiro y Sandoval, 2006).

4.2 Enfermedades transmitidas por alimentos

Entre los problemas de salud más prevalentes que afectan a la población humana a escala mundial se encuentran las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's). Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminadas con microorganismos patógenos que afectan a la salud del consumidor en forma individual o colectiva. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las enfermedades transmitidas por los alimentos como “enfermedades de carácter infeccioso o tóxico causadas, o que se cree que son causadas por, el consumo de alimentos o de agua contaminados (Armada y Ros, 2010).

Muchos microorganismos diferentes pueden contaminar a los alimentos, por lo que existen distintas enfermedades ocasionadas por ellos, la mayoría de ellas son infecciones ocasionadas por bacterias, hongos, virus y parásitos; otras son intoxicaciones producidas por toxinas. La mayoría de las infecciones transmitidas por alimentos se deben a especies bacterianas del género *Salmonella spp.*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7. Una vez que los alimentos perjudiciales son ingeridos existe una fase que procede a la aparición de los primeros síntomas, el periodo de incubación, que oscila entre horas y días. Los síntomas producidos dependen de la clase de microorganismo involucrado en la enfermedad. Las enfermedades de origen alimentario se diagnostican por síntomas y la utilización de pruebas de laboratorio específicas que logran identificar al microorganismo causante. Las enfermedades microbianas de origen alimentario pueden dar lugar a brotes, que se producen cuando un grupo de personas consume un alimento contaminado y dos o más de ellas contraen la misma enfermedad (Pascual, 2005).

Entre las enfermedades transmitidas por alimentos como consecuencia de una contaminación de origen biótico destacan las infecciones producidas por bacilos Gram negativos no esporulados. Todas ellas responden a una sintomatología propia de gastroenteritis y por la frecuencia de los brotes registrados se pueden señalar las siguientes como las principales:

-Salmonelosis, shigellosis, yersiniosis y la gastroenteritis coliforme, producida por patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*.

-Vibriosis y campylobacteriosis, ocasionadas por dos géneros de la familia *Vibrionaceae* (Bello, 2000).

La mayor parte de enfermedades transmitidas por alimentos no se diagnostican por que los síntomas son tan leves que las personas enfermas no buscan atención médica: estos síntomas por lo común incluyen manifestaciones gastrointestinales como nauseas, vómito, diarrea y dolor abdominal tipo cólico. Sin embargo, algunos casos de enfermedades transmitidas por alimentos, en especial cuando se acompañan con problemas de salud, pueden ser prolongadas y ocasionar alergias alimentarias, convulsiones, envenenamiento de la sangre (por microorganismos o sus toxinas en el torrente sanguíneo), falla orgánica, complicaciones crónicas o incluso la muerte (Byrd-Bredbenner, 2014).

La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002) considera que las enfermedades transmitidas por alimentos, y más específicamente las enfermedades diarreicas, son una causa importante de morbilidad y mortalidad a escala mundial, con importantes consecuencias económicas, están ampliamente extendidas tanto en países en vías de desarrollo como en los más desarrollados. Se estima que dos millones de personas mueren cada año en el mundo a causa de este tipo de enfermedades atribuidas principalmente a alimentos y agua contaminados. Lo más alarmante es que 1.8 millones de estas muertes comprendieron a niños menores de cinco años. Las enfermedades de transmisión alimentaria pueden afectar a una persona o pueden presentarse como un brote (si afecta a dos o más personas), en un grupo de personas que consumieron el mismo alimento contaminado. Por ejemplo, en 1994 un brote de salmonelosis por consumo de helados afectó a unas 224.000 personas en EE.UU.; y otro brote, ocurrido en el año de 1988 en China, resultaron afectados 300.000 personas por consumo de almejas contaminadas con virus de hepatitis A (Varó y Segura, 2009; Barreto y col., 2010).

En los países industrializados el porcentaje de personas afectadas por ETA´s cada año es superior al 30% de la población. En EE.UU. se producen 76 millones de casos que obligan a la hospitalización de 325 000 casos y, pese a ello mueren alrededor de 5000 afectados cada año. En los países en vías de desarrollo por lo general las estadísticas no son fiables pues los datos publicados sólo representan una parte del número verdadero de casos. Por ello, aunque los sistemas nacionales de información en salud han mejorado, aun no se puede precisar cuántas personas contraen intoxicaciones alimentarias en una región específica, información indispensable para alcanzar mejor eficacia en los sistemas de prevención y control de estas enfermedades (Barreto y col., 2010).

En México un estudio gubernamental realizado en 2003, reportó 4 556 decesos causados por infecciones intestinales. En 2001 la Secretaría de Salud (SSA) informó que las enfermedades gastrointestinales ocasionadas por bacterias o parásitos, ocupaban la decimocuarta causa de fallecimientos en el nivel nacional, y que los estados con mayor incidencia eran: Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla y el Distrito Federal. Tan solo en 2008, el Seguro Social brindó 2 millones 188 consultas por enfermedades gastrointestinales, y los estados con mayor incidencia de estas infecciones fueron: Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Guerrero, y Oaxaca. De acuerdo con estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las infecciones, como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea, cólera y rotavirus representan un severo problema de salud pública en nuestro país (Hernández y col., 2011).

México es una de las naciones que registraban a nivel mundial las tasas de mortalidad más elevadas por estos padecimientos, siendo muy elevados los costos de vidas humanas tanto de recursos médicos destinados a su atención. En México, la mayoría de los cuadros diarreicos son de naturaleza infecciosa, y como factores de gran importancia son los de carácter sanitario, socioeconómico y laboral (González, 2011).

En la Tabla 1 se presentan bacterias que causan ETA´s y se describen sus fuentes típicas y los síntomas de las enfermedades que causan.

Tabla 1. Bacterias causantes de ETA's, fuentes típicas, síntomas e información adicional.

Bacteria	Fuente alimentaria típica	Síntomas	Información adicional
<i>Salmonella spp.</i>	Carnes, pollo, huevo y pescado crudos o mal cocinados; productos agrícolas en especial alimentos crudos; crema de cacahuete, leche no pasteurizada.	Inicio: 12 a 72 h; náuseas, fiebre, cefalea, dolor y vómito; puede ser letal en lactantes, personas de edad avanzada y en individuos con alteración del sistema inmunitario: dura 4 a 7 días	Se calcula que cada año ocurren 1.028 millones de infecciones; las bacterias habitan en el intestino de los animales y seres humanos; los alimentos se contaminan por heces y agua infectada. <i>Salmonella enteritidis</i> infecta huevos; casi 20% de los casos provienen del consumo de huevos mal cocinados.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Carne y pollo crudos o mal cocinados (más de la mitad del pollo crudo en EUA está contaminado). Leche no pasteurizada, agua contaminada.	Inicio: 2 a 5 días, mialgias, dolor abdominal, cólico, diarrea (en ocasiones sanguinolentas), fiebre; dura 2 a 7 días	Se calcula que cada año ocurren 845 024 infecciones; produce una toxina que destruye la superficie mucosa intestinal; puede causar síndrome de Guillain-Barré, un trastorno neurológico poco común que causa parálisis.
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7 y otras cepas)	Carne molida mal cocida; productos agrícolas: lechuga, espinaca, coles; jugo y leche no pasteurizados.	Inicio: 1 a 8 días; diarrea sanguinolenta, dolor abdominal, cólico; en niños menores de 5 años y en personas de edad avanzada, el síndrome hemolítico urémico (HUS) es una complicación grave; hay destrucción de eritrocitos e insuficiencia renal; puede ser letal y tiene una duración de 5 a 10 días.	Principal causa de diarrea sanguinolenta en EUA; se calcula que cada año ocurren 173 800 casos; coloniza el intestino de ganado sano; el ganado y el estiércol del ganado son las principales fuentes de la enfermedad; la enfermedad causada por una toxina potente elaborada por la bacteria; zoológicos donde hay contacto con los animales, lagos y albercas pueden contener <i>E. coli</i> patógena.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Jamón, pollo, ensalada de huevo, pasteles rellenos de crema, natillas	Inicio: 1 a 6 h, diarrea, náuseas, vómito, dolor abdominal tipo cólico; dura 1 a 3 días.	Bacterias presentes en la piel y en las vías nasales de casi 25% de las personas, pueden contaminar alimentos; enfermedad causada por toxina termorresistente que no puede destruirse por cocción, se calculan 24 128 casos por año.

(Byrd-Bredbenner, 2014).

4.3 *Escherichia coli*

Es un bacilo gramnegativo, aerobio facultativo, con flagelo, fimbrias y pilis. Es indol positivo, descarboxilasa de lisina positivo, fermentación de manitol, gas y lactosa positiva. Tiene un pH óptimo de crecimiento de 6 a 8. Es un bacilo muy pequeño que mide 2.5 micrometros de largo y en un medio rico en nutrientes es capaz de reproducirse en aproximadamente cada 20 minutos (Berg, 2004).

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y forma parte de la flora nativa intestinal del hombre y de muchos animales, por lo que se le considera una bacteria indicadora de contaminación fecal cuando está presente en el suelo, alimentos y agua; aunque esto no determina que sea responsable de la etiología de una infección intestinal o de un brote de ETA'S (Tortora y col. 2007).

Escherichia coli, por su especificidad, está considerado como un buen indicador de contaminación fecal. Vive poco tiempo en el ambiente extraentérico, por lo que su presencia en alimentos indica que la contaminación es reciente. *E. coli* puede estar involucrada en problemas gastrointestinales, así como en infecciones urémicas y neonatales. Dentro de las infecciones intestinales, las *E. coli* se han clasificado en seis grupos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Cortés y col., 2001; Pascual, 2005).

E. coli enteropatógeno (EPEC): responsable de la diarrea acuosa de los lactantes. Produce vómitos, fiebre y una diarrea acuosa, con *mucus* pero sin sangre. Coloniza las microvellosidades de todo el intestino produciendo la lesión de “adhesión y erosión” en el ribete en cepillo de la membrana de la vellosidad. Afecta a niños de menos de dos años y a adultos, siendo el principal factor de riesgo de edades inferiores a dos años (Rodríguez y col., 2009).

E. coli enterotoxigénico (ETEC): responsable de la llamada vulgarmente “diarrea del viajero”, causa una diarrea acuosa, como agua de arroz, y poca fiebre. Coloniza la porción proximal del intestino delgado. Afecta a adultos y a niños, siendo el principal factor de riesgo los viajes al extranjero (Rodríguez y col., 2009).

E. coli enteroinvasor (EIEC): origina fiebre y diarrea profusa con heces que contienen *mucus* y estrías sanguinolentas. Coloniza el colon y presenta un plásmido de 120-140 mD, conocido como plásmido invasivo, que lleva todos los genes necesarios para la virulencia. Afecta adultos siendo el principal factor de riesgo los viajes al extranjero (Rodríguez y col., 2009).

E. coli enterohemorrágico (EHEC): origina diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH o SHU) y púrpura trombocitopénica. En este grupo se incluye *E. coli* verotoxigénico (VTEC) serotipos O157, O26 Y O11. Afecta principalmente a niños, siendo el principal factor de riesgo el consumo de carne poco cocida. El término *E. coli* verotoxigénico (VTEC) califica a las cepas de *E. coli* portadoras de al menos un gen (*stx*) que codifica una toxina llamada verotoxina (STX). Estas toxinas pueden provocar lesiones a nivel de colon, riñón y cerebro (Rodríguez y col., 2009).

E. coli enteroagregativo (EAEC), que constituye el grupo de *E. coli* diarreico más recientemente descrito. Origina diarreas acuosas y vómitos. Afecta a todas las edades desconociéndose actualmente los factores de riesgo (Rodríguez y col., 2009).

La sexta categoría de *E. coli* causante de diarrea reconocida hasta la fecha es *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). El nombre proviene del tipo característico de adherencia de estas bacterias a las células HEp-2 en cultivo de tejidos. Es la categoría menos definida de *E. coli* causante de diarrea. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo 0126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas. El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (González, 2011; Heymann, 2005).

En la Tabla 2 se muestran los tipos de *E. coli*, su mecanismo patógeno y los síntomas correspondientes.

Tabla 2. Grupos de *E. coli*, mecanismo patógeno, clínica y epidemiología

Grupo de <i>E. coli</i>	Mecanismo patógeno	Clínica	Epidemiología
<i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC)	Desconocido. Asociado a lesiones de las microvellosidades de los enterocitos	Diarrea líquida con moco, vómitos, fiebre	Frecuente en países desarrollados. Frecuente en niños menores de 2 años.
<i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	Invasión de la mucosa, como <i>Shigella</i>	Diarrea con moco y sangre, dolor abdominal, fiebre.	Frecuente en países subdesarrollados. Generalmente son casos de diarrea de origen alimentario.
<i>E. coli</i> Enterotóxigena (ETEC)	Producción de enterotoxinas: termolábil y termoestable.	Diarrea líquida profusa, náuseas.	Frecuente en países subdesarrollados. Generalmente casos de diarrea del viajero
<i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	Daño a las microvellosidades de los enterocitos y producción de verotoxinas (VT), toxina shiga, asociada frecuentemente al serotipo O157:H7.	Diarrea sanguinolenta, sin fiebre, síndrome urémico hemolítico.	Frecuente en países desarrollados.

(Margall y col., 1997)

El grupo *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) está integrado por varios serogrupos, pero es la O157:H7 la más importante. En los países desarrollados se han identificado distintos alimentos transmisores. La transmisión de la mayoría de las cepas de *E. coli* asociadas con diarrea se produce a partir de comida o agua contaminadas por heces humanas o de animales o de individuos infectados sintomáticos o portadores. El único serotipo que suele causar diarrea en los niños es EHEC, sobre todo O157:H7 que se excreta en las heces de ganado y, con menor frecuencia, de ovejas, ciervos y otros rumiantes. *E. coli* O157:H7 se transmite por carne molida mal cocida, agua contaminada, leche no pasteurizada y una gran cantidad de vehículos contaminados con heces bovinas. Otras formas de transmisión son el contacto con los animales y su

ambiente y la diseminación de persona a persona y por fómites. Las infecciones causadas por *E. coli* O157:H7 se detectan en forma esporádica o durante brotes epidémicos (Emilfork y Hannig, 1999; Baker, 2009).

Escherichia coli O157:H7 causa 73000 casos de enfermedad en los Estados Unidos anualmente. De 1982 a 2002, un total de 350 brotes de *E. coli* O157:H7 fueron reportados en los Estados Unidos a partir de 49 estados. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades ha estimado que *Escherichia coli* O157:H7 causa 2168 hospitalizaciones y 61 muertes por año en los Estados Unidos. *Escherichia coli* O157:H7 ha sido reportada en diversos casos en diversos países como Canadá, Alemania, España, Inglaterra y Escocia (Rangel y col., 2005, Rahal y col., 2012).

4.4 *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* spp. se encuentra distribuido por todo el mundo. Distintas especies habitan en el intestino del hombre y de una amplia variedad de animales domésticos, salvajes, aves, reptiles, anfibios y artrópodos. Se pueden aislar en aguas residuales, aguas frescas contaminadas con aguas residuales o heces, tierras irrigadas con aguas contaminadas o fertilizadas con abonos orgánicos de origen animal y otras fuentes similares (Pascual, 2005).

La salmonelosis producida por *Salmonella* spp es una enfermedad de distribución mundial, siendo frecuentes los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados o por diseminación proveniente de un portador desconocido. La infección por *Salmonella* spp. está asociada con la ingestión de alimentos preparados o manipulados inapropiadamente o previamente contaminados. Las carnes, los productos lácteos y los huevos crudos son las fuentes más probables de infección o de contaminación. La infección por *Salmonella* spp. es un problema importante de salud pública, tanto en países desarrollados como subdesarrollados. (Chávez y col., 2001; Durango y col., 2004; Espinoza y col., 2007).

Salmonella spp. pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. La mayoría de sus miembros se encuentran en el intestino del hombre y de diversos animales como bacterias patógenas o comensales. Son bacilos gramnegativos, no encapsulados, tiene flagelados peritricos, con fimbrias y pilis. Algunos forman una delgada microcápsula y no producen esporas. Pueden ser aerobios o anaerobios facultativos, fermentan la glucosa, maltosa y manitol, pero no fermentan lactosa ni sacarosa. Tres son los tipos principales de antígenos que determinan el serotipo de *Salmonella*. Son viables en diferentes condiciones ambientales, sobreviven a la refrigeración y congelación y pueden resistir el calentamiento. Tiene antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) y antígeno de virulencia (Vi). Los antígenos somáticos (O) son polisacáridos componentes de la pared celular. Los antígenos flagelares (H) son proteínas localizadas en el flagelo móvil. El antígeno de virulencia (Vi) es un polisacárido termolábil localizado en la cápsula. El sistema de clasificación más comúnmente utilizado agrupa a *Salmonella spp* por especies y serotipos. La serotipificación es útil para definir y controlar brotes y epidemias. La mayoría de las infecciones en el humano son resultado de la ingestión de organismos presentes en el agua o alimentos contaminados. La infección puede conducir a varios síndromes clínicos, que incluyen infecciones asintomáticas, gastroenteritis aguda, bacteriemia sin foco aparente de infección, fiebre tifoidea o un estado de portador asintomático (Pascual, 2005; Romero, 2007).

Salmonella spp es un importante patógeno de transmisión alimentaria en todo el mundo. Un estudio reciente estimó que aprox. 93.8 millones de casos de gastroenteritis y 155 000 muertes se producen debido a una infección por *Salmonella spp.* en todo el mundo, cada año. Sólo en los EE.UU. *Salmonella spp* causa un estimado de 1.4 millones de casos, 15 000 hospitalizaciones y más de 400 muertes anualmente. Sin embargo, pocos casos son informados, y en los EE.UU., se estima que sólo el 1-5% de casos se confirman en un laboratorio y se reportan a los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (Hoelzer y col., 2011).

En México, cada año se reportan alrededor de 110 000 casos de salmonelosis asociados al consumo de agua y alimentos contaminados, y pocas veces se identifica el origen de las bacterias. Aunque la mayoría de infecciones por *Salmonella spp.* son autolimitantes y no requieren tratamiento antimicrobiano, los niños, adultos mayores y pacientes con enfermedad severa o inmunocomprometidos pueden experimentar episodios diarreicos y requerir la prescripción de antibióticos (López y col., 2009).

Para prevenir las enfermedades transmitidas por alimentos, principalmente aquellas ocasionadas por una contaminación bacteriana, es indispensable la aplicación de diversos tratamientos, a estos tratamientos se les denomina métodos de conservación de alimentos. Los métodos de conservación de alimentos permiten la inactivación de los microorganismos o bien la inhibición de su crecimiento (Montero, 2004).

4.5 Métodos de conservación de alimentos

La preservación de alimentos puede definirse como el conjunto de tratamientos que prolongan la vida útil de aquellos, manteniendo, en el mayor grado posible, sus atributos de calidad, incluyendo color, textura, sabor y especialmente valor nutritivo. Los métodos de conservación pretenden impedir que los agentes naturales (humedad, aire o calor), los biológicos o los químicos actúen favoreciendo la descomposición del alimento. Conservar los alimentos es lograr mantenerlos durante un largo período de tiempo, bajo ciertas condiciones que permitan consumirlos en cualquier momento, sin que causen daño a la salud. Una conservación efectiva debe eliminar o disminuir todos estos factores de cualquier alimento dado. Existen diversos métodos de control frente a los agentes de deterioro destinados a evitar agentes físicos, a controlar los efectos de los agentes químicos y de los agentes biológicos. (Potter y Hotchkiss, 1999; Andrés y Barrio, 2008; Armada y Ros, 2010, Rodríguez, 2011).

4.5.1 Métodos Físicos de Conservación

Método por aplicación de frío. Consiste en someter a los alimentos a la acción de bajas temperaturas para reducir o eliminar las actividades microbianas y enzimáticas mediante dos tipos de procesos:

- Refrigeración: Manteniendo al alimento sin congelar entre 0 y 6° C.

- Congelación: Sometiendo al alimento a una temperatura inferior a su congelación -30° C para la congelación y entre -18° y -20 °C para su conservación hasta el momento de su consumo. Mientras el alimento se encuentre bajo condiciones de frío, los posibles cambios de aspecto, sabor y deterioro final son lentos (en el caso de los congelados, prácticamente se detienen) (Andrés y Barrio, 2008).

Métodos de conservación por aplicación de calor. La esterilización es la eliminación o la destrucción de todas las formas de vida microbiana. El calor es el método más común para eliminar microbios, incluidas las formas más resistentes, como las endosporas. Un agente que produce esterilización se denomina esterilizante. Se podría pensar que los alimentos enlatados que se encuentran en los supermercados son completamente estériles. En realidad, el tratamiento por calor necesario para asegurar la esterilidad absoluta podría degradar de manera innecesaria la calidad del alimento. Por ende, los alimentos se someten sólo al calor suficiente para destruir las endosporas de *Clostridium botulinum*, el microorganismo que puede producir una toxina mortal. Este tratamiento por calor limitado se denomina esterilización comercial. La pasteurización utiliza temperaturas entre 70 y 90°C durante pocos segundos. Destruye levaduras, mohos y las bacterias que no producen formas de resistencia (esporas), todo ello sin modificar la composición ni el sabor del alimento pasteurizado (Tortora y col., 2007; Andrés y Barrio, 2008).

El envasado o almacenamiento en atmósferas protectoras consiste en sustituir la atmósfera que rodea al producto por otra diferente, generalmente preparada para cada tipo de alimento. Envasado al vacío, es un método que consiste en envasar el alimento en un recipiente, extraer todo el aire y, posteriormente, sellar el envase. Lo que hace la conservación al vacío es detener procesos microbiológicos, teniendo en cuenta que un medio donde no hay oxígeno, aire, estos procesos no pueden producirse. También se puede utilizar el CO_2 para la extracción de gases en hortalizas de consumo en crudo, como la lechuga (Hernández y Sastre, 1999; López, 2007).

Las atmósferas modificadas generadas por el producto son utilizadas para la conservación en tránsito de una serie de productos, incluyendo algunas frutas tropicales. El procedimiento consiste en empaquetar el producto en bolsas plásticas de polietileno de cierto espesor. Al encerrarse el producto en este ambiente, debido al efecto respiratorio, comienza a disminuir la cantidad de oxígeno dentro del empaque y a incrementar el nivel de CO_2 , hasta que se logra una concentración tal de ambos gases que se reduce la respiración, alargándose la vida de almacenamiento (Barreiro y Sandoval, 2006).

4.5.2 Métodos Químicos de Conservación

Estos métodos de conservación se caracterizan por la adición de sustancias que provocan en los alimentos unas modificaciones químicas, basadas en la disminución de la A_w o del pH de los propios alimentos. Estos métodos han sido durante la historia de la humanidad de los más utilizados para la conservación de los alimentos. Entre ellos podemos destacar:

La salazón, consiste en la adición de concentraciones elevadas de cloruro sódico, produciéndose una disminución de la A_w , que inhibe el crecimiento de microorganismos, la actividad enzimática y la velocidad de las reacciones de modificación de los alimentos. Los alimentos en salazón cambian tanto sus propiedades nutritivas (desnaturalización de proteínas, oxidación de lípidos, pardeamiento de la mioglobina), como en las características organolépticas (sabor, aroma, textura, color, etc.) (Montero, 2004).

La adición de azúcar en una elevada concentración, al igual que en el caso de la sal, disminuye la actividad del agua y aumenta la presión osmótica de los tejidos, con lo que se impide la proliferación microbiana. Se aplica fundamentalmente a productos vegetales (mermeladas de frutas) y leche (leche condensada), si bien suele ir acompañada por un tratamiento térmico suave (Hernández y Sastre, 1999).

El curado es un procedimiento muy empleado para terminar una fase de conservación, dejando reposar el alimento con el objeto de alterar la concentración de sales de la

disolución para impedir la acción de enzimas y microorganismos (Andrés y Barrio, 2008).

La adición de compuestos químicos a los alimentos no constituye una innovación reciente sino que ha sido practicada a lo largo de la historia conocida. Los conservadores se definen como “sustancias capaces de inhibir, retardar o detener el crecimiento de microorganismos o de cualquier deterioro resultante de su presencia o capaces de enmascarar la evidencia de cualquiera de estos deterioros”. Los conservadores pueden ser microbicidas y destruir los organismos blanco o pueden ser microbiostáticos, en cuyo caso simplemente impiden que aquellos se multipliquen. Con mucha frecuencia, el hecho de que se comporten de una u otra de estas dos formas es una característica que depende de la dosis; las concentraciones más elevadas de un conservador se muestran letales mientras que las concentraciones más bajas que generalmente están permitidas en los alimentos tienden a ser microbiostáticas. Por esta razón, los conservadores químicos son útiles únicamente para controlar los bajos niveles de contaminación y no son en modo alguno un sustituto de las costumbres higiénicas adecuadas (Adams y Moss, 1997).

El uso de conservadores es una práctica común en la industria de los alimentos, por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente (que en algunos casos han causado daño en la salud de los consumidores, si se utilizan a grandes dosis o como en el caso de los sulfitos), redundando en un rechazo por parte de los consumidores de productos procesados. La preocupación de los consumidores por reducir la ingesta de aditivos sintéticos ha llevado a evaluar la capacidad antimicrobiana de productos naturales como los presentes en hierbas y especias (Vega y López, 2009; Rodríguez, 2011).

4.6 Antimicrobianos de origen natural

Existe una tendencia mundial hacia un mayor consumo de frutas y hortalizas, motivado fundamentalmente por una creciente preocupación por una dieta más equilibrada, con menor proporción de carbohidratos, grasas y aceites y con una mayor participación de la fibra dietaria, vitaminas y minerales. Esto se fundamenta, en parte, en las menores

necesidades calóricas de la vida moderna, caracterizadas por un mayor confort y sedentarismo. Sin embargo, la tendencia es cada vez consumir productos más frescos y sanos, y lo más parecido a su forma original. Esto debido a que se ha asociado el consumo de conservadores químicos con intoxicaciones, cáncer y otras enfermedades degenerativas, como son los benzoatos, nitritos y nitratos, anhídrido sulfuroso (SO_2), entre otros. Esto genera la necesidad de buscar alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y compatibilidad con el alimento (Rodríguez, 2011).

Se han realizado cuantiosos estudios sobre las propiedades antimicrobianas de aquellas plantas que se utilizan como hierbas y como especias para condimentar alimentos. El análisis de sus fracciones volátiles responsables del sabor y del aroma, conocidas como aceites esenciales, con frecuencia ha identificado compuestos tales como la allicina en el ajo, el eugenol de las bayas del pimiento de Jamaica, los clavillos y la canela, el timol del tomillo y del orégano y el aldehído cinámico de la canela y de la casia que tienen una importante actividad antimicrobiana. En consecuencia, tanto las hierbas como las especias pueden cooperar en la estabilidad microbiológica de los alimentos en los cuales se utilizan (Soriano, 2007).

La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos o aceites esenciales, y se ha observado que la grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos. Dadas las características volátiles de los compuestos fenólicos de los aceites esenciales, su aplicación puede ser directa por fumigación (Adams y Moss, 1997; Rodríguez, 2011).

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

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

Consecuentemente algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitor más reducido. Del mismo modo algunos antimicrobianos pueden ser directamente microbicidas, mientras que otros actúan como microbiostáticos. (Rodríguez, 2011).

La mayor parte de los antimicrobianos alimentarios solamente son bacteriostáticos (sistemas de conservación que impiden el desarrollo de gérmenes) o fungistáticos, en lugar de bactericidas (sistemas de conservación que destruyen los gérmenes) o fungicidas, por lo que su efectividad sobre los alimentos es limitada. Por otra parte, debido a que algunos microorganismos pueden no verse inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de antimicrobianos utilizados individualmente, puede ser preferible utilizar una combinación de ellos, ampliando así el espectro de cobertura en la preservación de frutas o alimentos en general (Rodríguez, 2011).

4.7 Aceites esenciales naturales

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. Son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua. Para la extracción de estos compuestos se pueden utilizar distintos solventes (acetato, etanol, y cloruro de etileno). Los aceites esenciales derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos (Rodríguez, 2011).

Muchos de estos aceites esenciales han sido valorados desde la antigüedad por sus olores característicos. Una lista de los aceites esenciales comercialmente importantes supera los 200. Algunas de las fuentes más conocidas son: almendra, anís, clavos, eucalipto, ajo, jazmín, naranja, pimienta, rosa, violeta, albahaca, comino, hierbabuena, tomillo y lavanda, entre otros. Los aceites esenciales son usados por su atractivo sabor, como especias y agentes saborizantes en alimentos. Unos pocos son valorados por su acción antibacterial y fungicida. Los aceites esenciales son una mezcla compleja que contiene de 20 a 60 componentes a diferente concentración. Estos son caracterizados

por dos o tres componentes mayoritarios, usualmente oxigenados, con una concentración entre 20% y 70% comparados con el resto de componentes con mucha menor proporción. Por ejemplo el linalool (36%) y el acetato de linalilo (22%) en la *Lavandula angustifolia* (lavanda), carvacrol (30%) y el timol (27%) son los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Origanum compactum* (orégano) (Anderson y Martínez., 2009).

Los aceites esenciales tienen propiedades antisépticas, se pueden usar en forma líquida o en vaporizaciones. Son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, generalmente son líquidos, pero en algunos casos se solidifica una parte por enfriamiento (Marcano y Hasegawa, 2002; Olaya y Méndez, 2003).

En la Tabla 3, se aprecian a algunos antimicrobianos de origen natural derivados de diversas plantas.

Tabla 3. Componentes de aceites esenciales que presentan actividad antimicrobiana

Nombre de la planta	Nombre científico de la planta	Componente	% máximo presente en el aceite esencial
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalool	26%
		E-2-decanal	20%
Canela	<i>Cinnamomum zaylandicum</i>	Trans-cinamaldehído	65%
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	84%
		Timol	64%
		Terpineno	52%
		Cymeno	52%
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Pineno	25%
		Acetato de bornil	17%
		Canfor	14%
		1,8 Cineolo	89%
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	85%
		Acetato de eugenil	15%
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	64%
		Carvacrol	45%
		Terpineno	31%
		Cimeno	10%

(García y Palou, 2008)

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se ha atribuido a un número de moléculas de compuestos aromáticos sustituidos, tales como el eugenol, cinamaldehído, timol y carvacrol. En la Figura 1 se puede apreciar la estructura de compuestos aromáticos sustituidos como son eugenol, cinamaldehído, carvacrol y timol respectivamente.

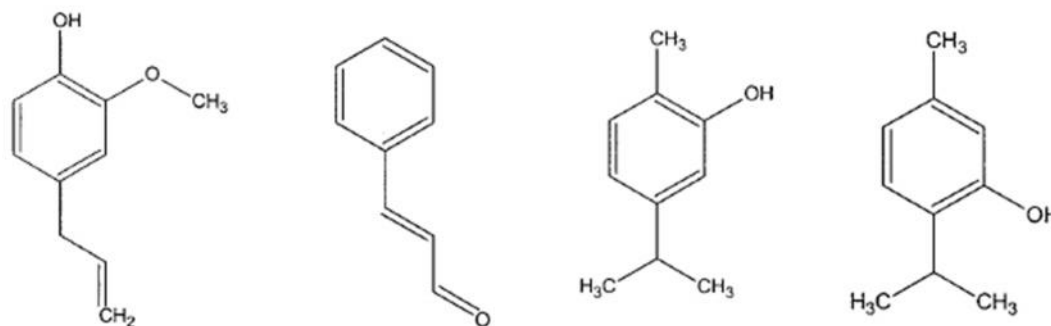


Fig. 1 Estructuras de compuestos aromáticos sustituidos (de izquierda a derecha) eugenol, trans-cinamaldehído, carvacrol y timol (Gill y Holley, 2004).

4.7.1 Carvacrol

Carvacrol (o 2-metil-5-(1-metiletil) fenol) está presente en los aceites esenciales de orégano (en un 84%) y tomillo (en un 45%). Su estructura química está representada por un grupo fenólico (Fig. 1), con un alto poder hidrofóbico. De todos los agentes antimicrobianos naturales el carvacrol es uno de los que más atención ha recibido en su mecanismo de acción, es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram Negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando con ello la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas y disminución de la fuerza motriz del protón.

El carvacrol pertenece a los compuestos fenólicos monoterpénicos y entre sus propiedades se incluye que es antimicrobiano, antimutagénico, analgésico, antiinflamatorio, insecticida y muchas más (García y Palou, 2008, Ardila y col. 2009).

4.7.2 Timol

El timol (o isopropilmetacresol, o 2-isopropil-5-metilfenol) ha sido reportado por varios autores como uno de los agentes antimicrobianos más activo de los constituyentes de los aceites esenciales. Se encuentra presente en el aceite esencial del tomillo (en un 64%), en el aceite esencial del orégano y en otras fuentes naturales como los aceites naturales de mandarina y tangerina. Su estructura química es similar a la del carvacrol cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo (Fig.1). En particular el aceite esencial del tomillo es considerado como GRAS, por lo que el timol no es considerado como nocivo para la salud. El mecanismo de acción del timol es semejante al del carvacrol ya que su estructura química es similar. El timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (García y Palou, 2008).

Al timol se le han atribuido propiedades acaricidas, alergénicas, analgésicas, antiacné, anti bacteriales, anti inflamatorias, anti oxidantes, antisépticas, antiespasmódicas, expectorantes, aromatizantes, fungicidas, insecticidas, larvicidas, pesticidas y vermícidias (Arango y col., 2012).

4.7.3 Eugenol

El eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) se da en el aceite de laurel y se extrae de las hojas de este árbol mediterráneo (*Laurus nobilis*) y de la *Umbellularia californica*, originaria de California. También es un compuesto mayoritario en el aceite esencial de clavo que se obtiene de los brotes de las flores *Eugenia aromatica*. Es de consistencia líquida y aceitosa, de color amarillo claro, con aroma característico, poco soluble en agua y soluble en alcohol. El aceite de clavo ha sido utilizado desde el siglo XVI como antiséptico y anestésico. Entre las muchas propiedades de este aceite se pueden destacar sus propiedades antiácidas antifúngicas, bactericidas, anestésicas, sedativas, aromatizantes e insecticidas. El eugenol actúa como analgésico gracias a su capacidad para bloquear la transmisión de los impulsos nerviosos. (Chaieb y col., 2007; Atkins, 2008; Torabinejad y Walton, 2010).

El eugenol es uno de los componentes antibacterianos de aceites esenciales que se sabe que inhiben una serie de bacterias patógenas Gram-negativas y Gram-positivas. El eugenol destruye a las bacterias por disrupción de la membrana y por lo tanto aumento de la permeabilidad de las células bacterianas. También se sabe que posee actividad inhibidora de la membrana ATPasa en *E. coli*. (Deepak y col., 2013)

4.7.4 Cinamaldehído

El cinamaldehído (3- fenil-2 propenal) es un compuesto fenólico que se caracteriza por ser el aceite esencial obtenido de la corteza del árbol de canela, encontrándose en una proporción de 65%. Este aldehído posee una estructura del tipo $C_6H_5CH=CHCHO$, caracterizada por la presencia de un anillo bencénico monosustituido, un grupo funcional aldehído y un enlace doble conjugado, que es el responsable de proporcionarle al compuesto una geometría plana (Wang, y col., 2005).

El cinamaldehído no solo exhibe actividad antibacterial sino que también inhibe el crecimiento de bacterias, mohos y la producción de micotoxinas, además de que es generalmente admitido como seguro para su uso en alimentos y es usado en muchos alimentos como saborizante (Rodríguez, 2011).

La conservación de alimentos es un aspecto clave en la industria alimentaria, razón por la que se han desarrollado diversos métodos como el empleo de películas protectoras, las cuales han ido evolucionando hasta llegar a ser elaboradas con biopolímeros, generándose un concepto denominado películas comestibles (Caamal-Herrera y col., 2011).

4.8 Películas comestibles

Una película comestible es definida como una capa delgada de material comestible preformada que posteriormente se usará sobre un alimento como recubrimiento, o colocada sobre o entre los componentes alimenticios. Las películas y recubrimientos comestibles y biodegradables representan una alternativa de empaque sin costos ambientales y sin efectos adversos sobre la salud. El carácter comestible, la degradación y el aumento de la seguridad alimentaria son los tres principales

beneficios de las películas comestibles altamente funcionales. La aplicación de películas comestibles preparadas a partir de productos naturales, proporcionan una capa de protección en la superficie del alimento, reducen la pérdida de agua, por lo tanto reducen la pérdida de peso durante su almacenaje, también permiten la respiración natural, amplían la vida útil al retrasar el envejecimiento y mejoran el aspecto de los alimentos (Valderrama, 2000; Vuarant, 2010; Caamal-Herrera y col., 2011).

Las propiedades funcionales básicas de las capas o películas comestibles, dependen de las características de los materiales usados en su preparación. Hasta el momento, los principales materiales manejados para fabricarlas son polisacáridos, proteínas y lípidos. Generalmente, las películas basadas en lípidos, constituyen buenas barreras contra la humedad, pero ellas ofrecen poca resistencia a la transferencia de gases y tienen pobre fuerza mecánica. En cambio, las películas basadas en biopolímeros, a menudo son buenas barreras para el oxígeno y el dióxido de carbono, pero ofrecen poca protección contra la migración de la humedad. Consecuentemente, ha sido una gran oportunidad de investigación la identificación de aditivos que puedan ser usados para mejorar las propiedades funcionales de las películas y recubrimientos comestibles (por ejemplo poliles, gotas de emulsión, micelas de surfactantes o fibras. Muchos reportes informan sobre el descubrimiento de nuevos antimicrobianos naturales que pueden ser incorporados en películas comestibles. Se han propuesto un número de compuestos que tienen actividad antimicrobiana en los alimentos, incluyendo a los ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas y aceites esenciales (Álvarez, 2011; Ávila-Sosa y col., 2012).

Las características más importantes de las películas comestibles son que funcionan como buenas barreras contra gases y humedad, así como acarreadoras de antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes y colorantes. Las películas comestibles más comunes se elaboran a partir de polisacáridos, proteínas y lípidos. Dentro de los polisacáridos más comúnmente utilizados en la elaboración de películas comestibles destacan el almidón, las dextrinas y los derivados de la celulosa. Las películas de proteínas se elaboran con colágeno, gelatina, gluten de trigo y maíz y zeína, mientras

que las de lípidos con ceras naturales y surfactantes. Es importante que las películas comestibles no sean totalmente limitantes en el intercambio de gases ya que ello puede provocar ciertos desordenes fisiológicos. (Ulloa, 2007).

Las películas comestibles se pueden considerar como una tecnología de empaque activo, ya que en éstas se incorporan algunos agentes antimicrobianos al material de empaque o a la película, la cual se puede consumir junto con el producto (Guerrero, 2009).

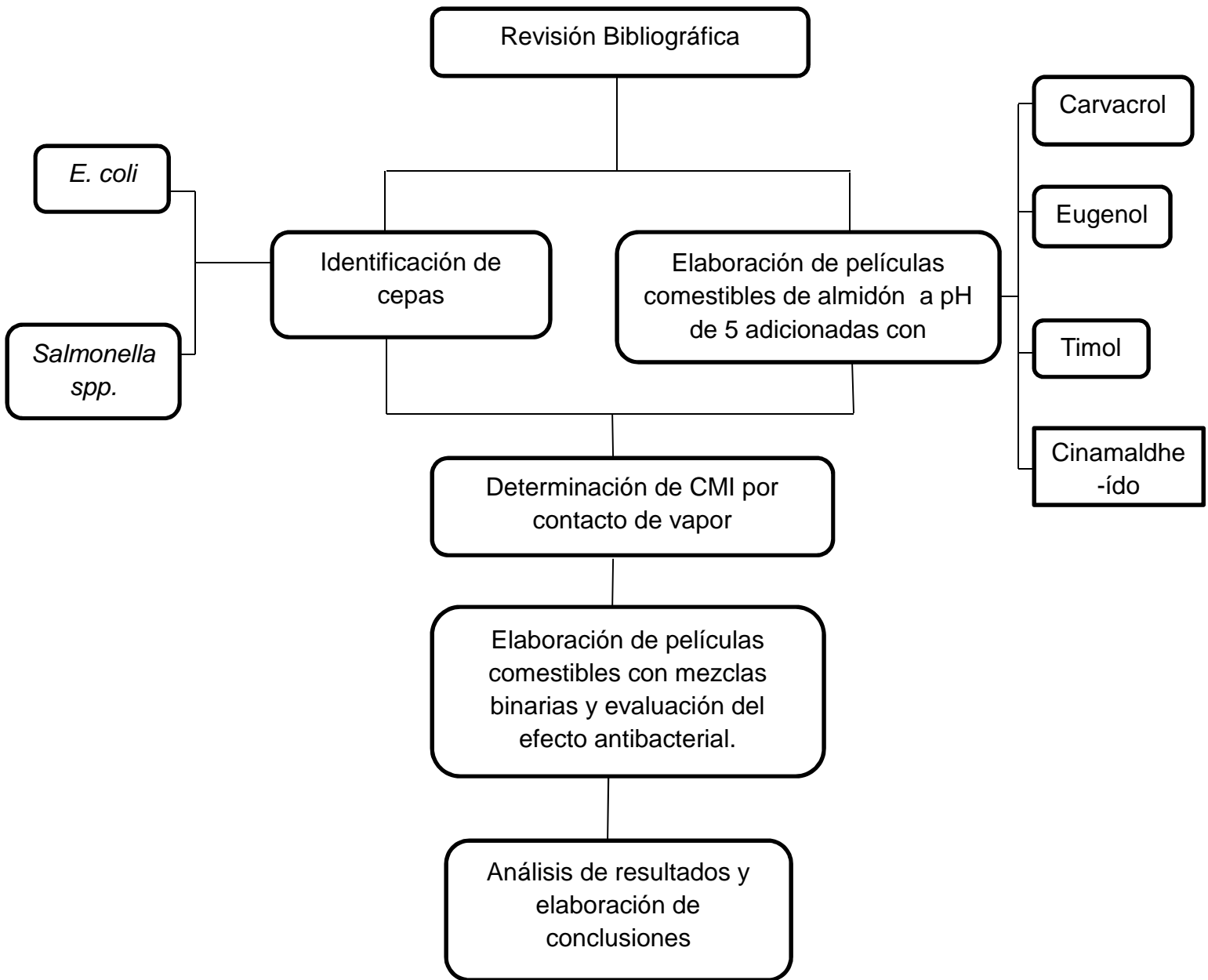
El mecanismo por el cual los recubrimientos o películas comestibles conservan la calidad de frutas y vegetales es debido a que crean una barrera física a los gases, produciendo una atmósfera modificada ya que reducen la disponibilidad de O_2 e incrementan la concentración de CO_2 (Vázquez y Guerrero, 2013).

4.9 Contacto por vapor

Los aceites esenciales son volátiles, arrastrables por vapor y a ello se debe su aroma. La generación de vapores de aceites esenciales se basa en la creación de una atmósfera a una cierta temperatura, o un microambiente dado por los propios aceites. Se han publicado algunos estudios con respecto a la inhibición de varios microorganismos por aceites esenciales por la fase de vapor. Sin embargo hasta ahora, no existe ningún ensayo estándar para evaluar la inhibición microbiana por contacto de vapor de aceites esenciales. Hay muchos métodos reportados por diferentes autores, los más comunes son: 1) el método de sobrepuesto, que es sólo una simple modificación del ensayo de difusión en disco y puede estar relacionado con el contacto directo de las películas sobre superficies de alimentos y 2) el método de fase de vapor, donde los aceites esenciales y microorganismos se colocan por separado en un entorno sellado y pueden ser relacionadas con la inhibición microbiana a distancia sin contacto directo de la película con los alimentos contaminados. Su principio se basa en la rápida volatilización de los vapores los cuales entran en contacto con el microorganismo. Por lo que esta técnica es mayormente utilizada para bacterias, las cuales tienen mayor velocidad de crecimiento en comparación con los mohos (Marcano y Hasegawa, 2002; Ávila-Sosa y col., 2012; Reyes y col., 2012).

Algunas investigaciones han reportado que el uso de vapores generados por aceites esenciales tiene mayor efecto antimicrobiano, en comparación con el contacto directo. Estudios recientes señalan que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en fase de vapor es eficiente en concentraciones altas y en tiempos cortos (Reyes y col., 2012).

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material

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

6.2 Medios de Cultivo

Los necesarios para cada cepa y para realizar cada una de las pruebas.

6.3 Material Biológico

Cepas obtenidas del cepario de la facultad de Ciencias Químicas de la BUAP:

Escherichia coli

Salmonella spp.

6.4 Equipos.

Tabla 4. Equipo utilizado

EQUIPO	MARCA	MODELO
Balanza	Ac ADAM	AQT 600
Autoclave	AESA	CV 30
Microscopio óptico	Carl. Zeiss	1061-030 40X
Estufa del cultivo	BG.	E-41
Estufa de secado	BG.	E-41
Campana de flujo laminar	Eseve	CFI V-102

6.5 Métodos de determinación

Tabla 5. Métodos utilizados y su referencia

Determinación	Método	Referencia
Confirmación de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella spp</i>	Siembra en medio selectivo y diferencial, Tinción de Gram	Forbes y col., 2009
Elaboración de películas comestibles	Vaciado en placa	Ávila-Sosa y col., 2010
Determinación de CMI por contacto de vapor	Mezclas por tablero de ajedrez	Davidson, 2005
Elaboración de mezclas binarias	Técnica de placa invertida	Ávila-Sosa y col., 2012

7. METODOLOGÍA

7.1 Identificación de las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*

Las cepas fueron obtenidas del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas, estas cepas se analizaron individualmente y a cada cepa se les realizó las pruebas de identificación de la siguiente manera:

Como primera prueba se realizó la tinción de Gram donde se observó a los bacilos gram negativos característicos de la especie *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* Después una vez realizada la tinción se procedió a sembrar las bacterias en medios selectivos y diferenciales como son Agar EMB y Mac Conkey para la identificación de *E.coli* y Agar SS para la identificación de *Salmonella sp.*

7.2 Elaboración de películas comestibles de almidón adicionadas con una solución madre de timol, carvacrol, eugenol y cinamaldehído, a pH=5.

Las películas comestibles se realizaron en condiciones estériles, los componentes de la película fueron el agua estéril, hidróxido de sodio estéril, almidón, sorbitol, fueron adicionados y mezclados hasta obtener una mezcla completamente homogénea, después se agregó ácido fosfórico estéril para ajustar el pH a 5, a unas se les agregó una solución madre de timol, eugenol, carvacrol y cinamaldehído en concentraciones previamente definidas, mientras que a otras no se les adiciono ningún antimicrobiano con la finalidad de utilizarlas como control. Se continuó homogenizando y una vez listas se vertieron en las tapas de las cajas petri y posteriormente se dejaron secar en la estufa de vacío a 37°C aproximadamente dos días. Las concentraciones que se realizaron fueron: 100, 200, 250 300, 350 400, 500, 600, 1000, 2000 y 5000 mg/L de cada antimicrobiano.

7.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por contacto de vapor.

La concentración mínima inhibitoria se define como la concentración más baja del antimicrobiano que inhibirá el crecimiento de un organismo (Ashok Garg y col., 2010). Para determinarla como primer paso se inoculó una colonia de cada una de las cepas en un tubo con Agar caldo Todd-Hewitt y se incubaron a 37° C por 24 horas. Después

se midió la turbidez y se estandarizó a 0.5 de la escala de Mc Farland. Se sembraron placas de Agar con los caldos previamente elaborados y estandarizados y posteriormente estas placas se taparon con las placas que contenían las películas de almidón adicionadas con cada uno de los antimicrobianos en concentraciones determinadas y con las placas que tenían las películas control. Posteriormente se hizo una evaluación del crecimiento obtenido comparando las placas con las tapas control, con las placas que tenían las tapas que contenían las películas adicionadas con cada uno de los antimicrobianos. La inhibición de cada una de las bacterias se determinó por aquellas placas donde no hubo crecimiento.

7.4 Elaboración de películas comestibles adicionadas con mezclas binarias y evaluación del efecto antibacterial.

Una vez determinada la concentración mínima inhibitoria se procedió a realizar las películas comestibles de almidón adicionadas con mezclas binarias, las películas se realizaron de la misma manera como se describió en el paso 6.2, mientras que las mezclas binarias se hicieron en base al modelo del tablero de ajedrez como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Modelo del tablero de ajedrez utilizado en la realización de las mezclas binarias.

	Carvacrol			
Timol		1/4	1/2	3/4
	1/4	$\frac{1}{4} + \frac{1}{4}$	$\frac{1}{2} + \frac{1}{4}$	$\frac{3}{4} + \frac{1}{4}$
	1/2	$\frac{1}{4} + \frac{1}{2}$	$\frac{1}{2} + \frac{1}{2}$	$\frac{3}{4} + \frac{1}{2}$
	3/4	$\frac{1}{4} + \frac{3}{4}$	$\frac{1}{2} + \frac{3}{4}$	$\frac{3}{4} + \frac{3}{4}$

Posteriormente el efecto antibacterial se evaluó de la misma forma en la que se realizó en el paso 7.3, es decir, se evaluó el efecto producido por contacto de vapor de cada una de las mezclas en base a la concentración mínima inhibitoria de cada antimicrobiano previamente determinada.

7.5 Cálculo del Índice FIC

Cálculo del índice de FIC: Sirve para determinar si las mezclas binarias de carvacrol, cinamaldehído y timol poseen una acción sinérgica, aditiva o antagónica, utilizando la ecuación de Davidson y Parish (Santiestebán-López y col., 2007)

Concentración Fraccional Inhibitoria

$$FIC_{TIMOL} = CMI_{TIMOL} \text{ en presencia de Carvacrol} / CMI_{TIMOL} \text{ individual} \quad (1)$$

$$FIC_{CARVACROL} = CMI_{CARVACROL} \text{ en presencia de Timol} / CMI_{CARVACROL} \text{ individual} \quad (2)$$

Una vez calculadas las cantidades por separado se calcula el índice de FIC:

$$\text{Índice FIC} = FIC_{TIMOL} + FIC_{CARVACROL} \quad (3)$$

Se realizaron los cálculos correspondientes para cada una de las cepas problemas, y los resultados se compararon con los datos que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Efecto correspondiente de las mezclas binarias para los valores del índice de FIC.

Rango de Índice FIC	EFECTO
< 0.90	Sinérgico
< 0.90 – 1.3	Aditivo
> 1.3	Antagónico

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Identificación de cepas

Las cepas obtenidas del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas, fueron identificadas de la siguiente manera: Como primera prueba se realizó la Tinción de Gram, donde se observaron a los bacilos Gram negativos característicos de *E. coli* y *Salmonella spp.*

Para la identificación de *E. coli* se utilizó agar Mac Conkey, donde se observaron colonias de color rosa, circulares y convexas, y Agar EMB, donde *E. coli* produjo colonias de color verde metálico, circulares, medianas y convexas.

Para la identificación de *Salmonella spp.* se utilizó agar SS, donde se obtuvieron colonias medianas, transparentes y con centro negro (ver anexo 12.1).

8.2 Concentración mínima inhibitoria

Tabla 8. CMI (mg/L) de carvacrol, cinamaldehído, timol y eugenol adicionadas a películas comestibles sobre *E. coli* y *Salmonella spp.* por contacto en fase de vapor.

	CMI (mg/L)	
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Carvacrol	250	600
Cinamaldehído	350	500
Timol	400	600
Eugenol	2000	5000

Los valores obtenidos para la CMI de cada uno de los antimicrobianos frente a *E. coli* y *Salmonella spp.* como se pueden observar en la Tabla 8, concuerdan con lo reportado por Rodríguez (2011) donde establece que los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se han establecido entre 280-1270 mg/L para bacterias, y de 605-1500 mg/L para hongos., sin embargo es importante mencionar que estos valores son por contacto directo, por lo que se observa una gran similitud entre los resultados obtenidos en contacto de vapor y en contacto directo (ver anexos 12.2, Tabla 19).

Las bajas concentraciones obtenidas en la CMI determinada de carvacrol y timol para *E. coli* concuerda con lo reportado por Santiestebán-López y col. (2007) donde mencionan que timol y carvacrol en concentraciones tan bajas como 200 mg/L fueron suficientes para inhibir a *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis*, *estafilococos aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*.

El valor obtenido de CMI de eugenol fue de 2000 mg/L para *E. coli* y 5000 mg/L para *Salmonella spp.* por lo que este antimicrobiano fue descartado para utilizarse en el método de contacto por vapor, ya que es necesaria una gran concentración para inhibir el crecimiento bacteriano por este método. Los valores obtenidos de CMI de carvacrol, cinamaldeído, timol y eugenol para *E. coli* y para *Salmonella spp.* son diferentes a pesar de que son bacterias Gram Negativas, esto se debe a las diferencias estructurales que hay entre *E. coli* y *Salmonella spp.* como lo establecen Vega y López (2009) donde mencionan que el espectro de actividad antimicrobiana depende en gran medida del microorganismo a inhibir, ya que los microorganismos difieren en su resistencia.

De acuerdo a la Tabla 8 se aprecia que la CMI más baja para *E. coli* fue carvacrol con 250 mg/L y cinamaldeído 350 mg/L, mientras que para *Salmonella spp.* fue cinamaldeído con 500 mg/L lo que se confirma por lo establecido por Morten y col., (2012) donde explican que la actividad antimicrobiana de cinamaldeído contra *E. coli* y *Salmonella typhimurium* es tan potente como la de timol y carvacrol.

8.3 Mezclas Binarias

En la Tabla 9 se puede apreciar la mezcla binaria de cinamaldeído y carvacrol, donde se observa que hubo un efecto bactericida en 7 de las 9 mezclas realizadas, siendo la mezcla de 87.5 mg/L de cinamaldeído y 62.5 mg/L de carvacrol, y la de 175 mg/L de cinamaldeído y 62.5 mg/L de carvacrol las mezclas donde no hubo inhibición de *E. coli*. En esta mezcla el efecto inhibitorio se debió principalmente al efecto producido por carvacrol, lo que concuerda con lo reportado por Von. (2012), donde menciona que la adición de carvacrol proveniente del aceite esencial del tomillo incrementa la sensibilidad relativa de *E. coli* y *Salmonella thyphi*.

Tabla 9. Efecto de las mezclas binarias de cinamaldehído y carvacrol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *E. coli* por contacto en fase de vapor.

		Cinamaldehído (mg/L)		
Carvacrol (mg/L)		87.5	175	262.5
62.5		2	2	0
125		0	0	0
187.5		0	0	0

0: Bactericida, 1: Bacteriostático, 2: Crecimiento

La mezcla binaria de cinamaldehído y timol que se aprecia en la Tabla 10, muestra que de las 9 mezclas realizadas solo 5 tuvieron un efecto bactericida, obteniendo en 3 de ellas un efecto bacteriostático, es decir, un efecto donde se inhibe el crecimiento, pero las bacterias no mueren y al disminuir la concentración del agente antimicrobiano se reanuda el crecimiento bacteriano (Montoya, 2008), lo que demuestra que el cinamaldehído combinado con el timol no tiene un buen efecto a concentraciones mínimas.

Tabla 10. Efecto de las mezclas binarias de cinamaldehído y timol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *E. coli* por contacto en fase de vapor.

		Cinamaldehído (mg/L)		
Timol (mg/L)		87.5	175	262.5
100		2	1	0
200		1	1	0
300		0	0	0

0: Bactericida, 1: Bacteriostático, 2: Crecimiento

En la tabla 11, se aprecia la mezcla binaria de carvacrol y timol para *E. coli* donde se observa que en las 9 mezclas realizadas de esta combinación se obtuvo un efecto bactericida, por lo que esta mezcla es la que mejor efecto tuvo frente a *E. coli*, esto concuerda con lo reportado por Santiestebán-López y col. (2007) donde establecen que el antimicrobiano más efectivo para *E. coli* es carvacrol seguido de timol.

Tabla 11. Efecto de las mezclas binarias de carvacrol y timol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *E. coli* por contacto en fase de vapor.

		Carvacrol (mg/L)		
Timol (mg/L)		62.5	125	187.5
100		0	0	0
200		0	0	0
300		0	0	0

0: Bactericida, 1: Bacteriostático, 2: Crecimiento

En la tabla 12 se aprecia la mezcla binaria de cinamaldehído y carvacrol frente a *Salmonella spp*, donde se observa que en las 9 mezclas realizadas en ninguna se obtuvo un efecto bactericida, obteniendo en 6 de las 9 mezclas un efecto bacteriostático predominante.

Tabla 12. Efecto de las mezclas binarias de cinamaldehído y carvacrol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *Salmonella spp* por contacto en fase de vapor.

		Cinamaldehído mg/L		
Carvacrol mg/L		125	250	375
150		2	1	1
300		2	1	1
450		2	1	1

0: Bactericida, 1: Bacteriostático, 2: Crecimiento

En la Tabla 13, se aprecia la mezcla binaria de cinamaldehído y timol, donde en ninguna de las 9 mezclas realizadas se obtuvo un efecto bactericida, obteniendo crecimiento en 5 mezclas y en 4 mezclas un efecto bacteriostático.

Tabla 13. Efecto de las mezclas binarias de cinamaldehído y timol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *Salmonella spp*. por contacto en fase de vapor.

		Cinamaldehído (mg/L)		
Timol (mg/L)		125	250	375
150		2	2	1
300		2	2	1
450		2	1	1

0: Bactericida, 1: Bacteriostático, 2: Crecimiento

La mezcla binaria de carvacrol y timol que se aprecia en la Tabla 14, muestra un efecto bactericida en 5 mezclas de las 9 realizadas, siendo la mezcla más efectiva de las mezclas realizadas frente a *Salmonella spp.*

Tabla 14. Efecto de las mezclas binarias de carvacrol y timol adicionadas a películas comestibles de almidón sobre *Salmonella spp.* por contacto en fase de vapor.

		Carvacrol (mg/L)		
Timol (mg/L)		150	300	450
150		2	2	2
300		2	0	0
450		0	0	0

0: Bactericida, 1: Bacteriostático, 2: Crecimiento

De todas las mezclas realizadas tanto para *E. coli* como para *Salmonella spp.* se observa que la mezcla de carvacrol y timol en ambos casos fue la más efectiva, lo que concuerda con lo reportado por Rodríguez, (2011) donde menciona que los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos.

El efecto de carvacrol y timol sobre *E. coli* y *Salmonella spp.* se debe a que estas moléculas pertenecen al mismo aceite esencial (orégano) además de ser isómeros y su mecanismo de acción es similar como lo menciona García y Palou (2008), donde establecen que el mecanismo de acción del timol es semejante al del carvacrol ya que su estructura química es similar. El carvacrol y el timol son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática.

Los efectos obtenidos en la mezcla binaria de timol y carvacrol frente a *E.coli* y *Salmonella spp.* se deben de igual forma a las concentraciones utilizadas, Burt y col. (2007) señalaron que al exponer a las células a concentraciones subtales de antimicrobianos naturales (como carvacrol y timol), hay cambios en la concentración de los ácidos grasos de la membrana celular, presentándose un aumento de los ácidos grasos insaturados.

8.4 Determinación del Índice FIC

El índice FIC es la concentración de un compuesto necesaria para inhibir el crecimiento (expresada como una fracción de la CMI) cuando se combina con una concentración conocida de un segundo compuesto. Se calcula con la concentración del primer compuesto cuando se combina con un segundo compuesto dividido con la CMI del primer compuesto solo (Davidson y col. 2005).

Para poder determinar si las mezclas binarias poseen un efecto sinérgico, aditivo o antagónico se utilizó el valor obtenido del índice FIC de cada una de las mezclas realizadas y se comparó con los valores de la Tabla y se obtuvieron los siguientes resultados:

- En la mezcla de carvacrol y cinamaldehído para *E. coli* el índice FIC fue 1.1, que corresponde a un efecto aditivo.
- En la mezcla de cinamaldehído y timol para *E. coli* el índice FIC fue 1.2, que corresponde a un efecto aditivo.
- En la mezcla de carvacrol y timol para *E. coli* el índice FIC fue 1, que corresponde a un efecto aditivo.
- En la mezcla de carvacrol y timol para *Salmonella* el índice FIC fue 1.2, que corresponde a un efecto aditivo.

En la Tabla 15 se pueden apreciar los valores del índice FIC para la mezcla binaria de cinamaldehído y carvacrol frente a *E. coli* por contacto en fase de vapor. El índice FIC fue únicamente determinado para aquellas mezclas donde se obtuvo un efecto bactericida, por lo que de las 9 mezclas realizadas, a 7 se les calculó el índice FIC, obteniendo principalmente un efecto aditivo.

Tabla 15. Determinación del índice FIC de la mezcla binaria de carvacrol y cinamaldehído frente a *E. coli* por contacto en fase de vapor.

		Cinamaldehído (mg/L)		
Carvacrol (mg/L)		87.5	175	262.5
62.5		-	-	1
125		0.75	1	1.25
187.5		1	1.25	1.5

(-): Indica que hubo crecimiento o que se obtuvo un efecto bacteriostático, por lo que no se calculó el índice FIC

En la Tabla 16, se aprecian los valores del índice FIC para la mezcla binaria de cinamaldehído y timol frente a *E. coli* por contacto en fase de vapor, donde se observa que el índice FIC fue calculado para 5 de las 9 mezclas realizadas obteniendo un efecto aditivo principalmente.

Tabla 16. Determinación del índice FIC de la mezcla binaria de cinamaldehído y timol frente a *E. coli* por contacto en fase de vapor.

		Cinamaldehído (mg/L)		
Timol (mg/L)		87.5	175	262.5
100		-	-	1
200		-	-	1.25
300		1	1.25	1.5

(-): Indica que hubo crecimiento o que se obtuvo un efecto bacteriostático, por lo que no se calculó el índice FIC

En la Tabla 17, se aprecian los valores del índice FIC para la mezcla binaria de carvacrol y timol frente a *E. coli* por contacto en fase de vapor, donde a las 9 mezclas realizadas se les calculo el índice FIC obteniendo un efecto aditivo predominante.

Tabla 17. Determinación del índice FIC de la mezcla binaria de carvacrol y timol sobre *E. coli* por contacto en fase de vapor

	Carvacrol (mg/L)		
Timol (mg/L)	62.5	125	187.5
100	0.5	0.75	1
200	0.75	1	1.25
300	1	1.25	1.5

(-): Indica que hubo crecimiento o que se obtuvo un efecto bacteriostático, por lo que no se calculó el índice FIC

En la Tabla 18, se aprecian los valores del índice FIC de la mezcla binaria de carvacrol y timol frente a *Salmonella ssp.* Por contacto en fase de vapor, donde de las 9 mezclas realizadas a 5 se les calculó el índice FIC obtenido un efecto aditivo en la mayoría.

Tabla 18. Determinación del índice FIC de la mezcla binaria de carvacrol y timol sobre *Salmonella spp.* por contacto en fase de vapor

	Carvacrol (mg/L)		
Timol (mg/L)	150	300	450
150	-	-	-
300	-	1	1.25
450	1	1.25	1.5

(-): Indica que hubo crecimiento o que se obtuvo un efecto bacteriostático, por lo que no se calculó el índice FIC

Se puede observar que en todos los casos, el efecto obtenido fue un efecto aditivo, es decir, efecto en el cual el efecto combinado es igual a la suma de los efectos observados con los dos agentes probados separadamente o es igual al efecto del agente más activo en la mezcla. Los efectos aditivos ocurren cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto no mejora ni se reduce en presencia de otro agente (García y Palou, 2008), esto concuerda con lo reportado por Davidson y col. (2005) donde propusieron que los resultados aditivos se indican mediante índice FIC entre 0,5 y 2,0 para las pruebas de antimicrobianos.

El efecto aditivo indica que los antimicrobianos utilizados poseen actividad inhibitoria independiente del otro antimicrobiano presente en la mezcla, por esta razón los antimicrobianos como son el carvacrol y timol pueden ser utilizados por contacto en fase de vapor ya sea de manera individual o bien en mezclas, ya que en un efecto aditivo como lo establecen Davidson y col.,(2005) no hay un aumento o reducción de la eficacia global de los antimicrobianos combinados en comparación con los resultados individuales, obteniendo un efecto inhibitorio predominante. *Salmonella spp.* fue menos sensible a la acción de la mezcla binaria de timol y carvacrol en comparación con *Escherichia coli*.

El efecto aditivo encontrado en las mezclas binarias de timol y carvacrol se confirma con lo reportado por Bassolé y Juliani H. (2012), donde establecen que compuestos con estructuras similares poseen un efecto aditivo, en lugar de un efecto sinérgico. El efecto aditivo de algunos aceites esenciales se ha relacionado con sus compuestos fenólicos principales (carvacrol y timol), de igual forma Lambert y col., (2001) encontraron un efecto aditivo de timol y carvacrol contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Lambert y col., (2001) mencionan que el efecto inhibitorio debido a la combinación de timol y carvacrol es suficiente para explicar la inhibición observada con el propio aceite, por lo que el uso de estos antimicrobianos representa una buena alternativa de inhibición de microorganismos, sin la necesidad de utilizar el aceite esencial.

A pesar de que no se tiene información suficiente sobre el efecto combinado de antimicrobianos naturales en alimentos, Santiesteban-López y col. (2007) señalan que los antimicrobianos más efectivos contra *S. aureus*, *L. innocua*, *E. coli* y *S. typhimurium* en medios de cultivo sólidos son carvacrol, y timol en un intervalo de 100 a 3000 ppm; además de combinaciones binarias de sorbato de potasio-carvacrol y sorbato de potasio-timol.

Estudios recientes han demostrado que los vapores generados por aceites esenciales poseen efectos antimicrobianos (López y col., 2005; 2007; Santiesteban-López y col. 2007; Gómez y López, 2009,), aunado a esto algunos investigadores (Ávila Sosa y col.

2012; Wang C. 2003) establecen que el contacto por vapor representa una buena alternativa en el control del crecimiento de microorganismos que alteran alimentos y producen su deterioro.

Goñi y col., (2009) realizaron un estudio en el que evaluaron la actividad antimicrobiana del contacto por vapor de una combinación de aceites esenciales de canela y clavo contra el crecimiento de cuatro bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas* y *Salmonella choleraesuis aeruginosa*) y cuatro bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Enterococcus faecalis*), la actividad del aceite esencial del clavo y canela se evaluó mediante el índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) de la mezcla. La presencia de un efecto sinérgico, aditivo o antagónico dependía del parámetro de referencia utilizado. Se aplicaron las CMI, y los vapores generados por la combinación de los aceites esenciales ejercen un efecto antagónico sobre el crecimiento de *E. coli*, mientras que ejerció un efecto sinérgico para la inhibición de *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *Y. enterocolitica*, cuando se utilizaron las concentraciones de inhibición máxima. Este hecho revela una interacción clara dependiente de la concentración utilizada.

En la misma línea, Nedorostova y col., (2009), realizaron un estudio para identificar las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales en la fase de vapor. Estudiaron la actividad antimicrobiana in vitro contra cinco bacterias transmitidas por alimentos (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*) por el método de volatilización en disco. Los resultados se expresaron como concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en $\mu\text{l}/\text{cm}^3$ de aire. Se analizaron 27 aceites esenciales y de ellos 13 eran activos contra al menos una cepa bacteriana en el rango de concentraciones probadas (0,0083-0,53 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$). Los mejores resultados se muestran por *Armoracia rusticana* (CMI 0,0083 $\mu\text{l}/\text{cm}^3$) contra todas las cepas, seguida de *Allium sativum* > *Origanum vulgare* > *Thymus vulgaris* > *Satureja montana*, *Thymus pulegioides* > *Timo serpyllum* > *Origanum majorana* > *Caryopteris x clandonensis*, *Hyssopus officinalis*, *Mentha villosa*, *Nepeta x faassenii*, *Ocimum basilicum var. grant verte*. En conclusión los aceites esenciales en

fase de vapor son altamente efectivos y podrían utilizarse en el control de bacterias patógenas transmitidas por alimentos.

Krisch y col., (2013), evaluaron la actividad antifúngica en fase de vapor de los aceites esenciales de mejorana y salvia, contra los mohos causantes de la degradación del pan como son *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Rhizopus spp.* Esta investigación fue realizada por el método de placa invertida en extracto de malta y en el trigo, trigo-centeno y rebanadas de pan de centeno que moldean un envase activo. Los cambios observados en el tamaño de las colonias y la tasa de crecimiento de cada una de las colonias fueron evaluados como marcadores para el efecto de inhibición del crecimiento. In vitro el microorganismo más resistente fue *Rhizopus spp.* que no mostro cambios significativos después del tratamiento con EOs en comparación con el control. Sin embargo el crecimiento de todos los moldes investigados se redujo significativamente con el vapor de los EOs tratados en rebanas de pan.

Nikos y Tzortzakis (2007) evaluaron la calidad pos-cosecha de la fresa (*Fragaria ananassa Duch*) y tomate (*Lycopersicon esculentum L.*) después del tratamiento con eucalipto (*Eucalyptus globulus L.*) y canela (*Cinnamomum zeylannicum Blume*) compuestos volátiles del petróleo a un almacenamiento de 13°C durante o después de la exposición al vapor. El deterioro de la fruta disminuyó en la fruta tratada con vapores y transferida al “aire del ambiente” (AA) de petróleo. El tomate tratado con canela, mantuvo la firmeza de la fruta durante la exposición, pero los efectos no fueron persistentes después del almacenamiento a AA. Sin embargo, no se observaron efectos sobre la firmeza de la fruta para el tomate y fresas tratados con vapores de eucalipto y canela. Los vapores estimularon los niveles de sólidos solubles totales durante la exposición pero los efectos fueron persistentes solo para los tomates después de la exposición. Las muestras de la fruta tratada con vapores de cada aceite esencial no difirieron en la pérdida de porcentaje en peso, el contenido de ácido orgánico, la dulzura y el contenido fenólico total durante o después de la exposición al vapor en comparación con la fruta sin tratar. Los resultados sugieren que el vapor del aceite esencial puede mejorar los atributos relacionados con la calidad de la fruta

además de ser una protección antimicrobiana durante el almacenamiento y su final disposición.

Los resultados obtenidos en esta investigación son comparables con el método directo ya que en este las concentraciones obtenidas son menores o iguales a las obtenidas por contacto de vapor, sin embargo, en el contacto directo existe una fuerte tendencia a alterar las propiedades sensoriales de los alimentos, mientras que en el contacto por vapor las características organolépticas de los alimentos no se ven afectadas como lo establecen Laird y Phillips, (2011), donde mencionan que una ventaja es que en fase de vapor los componentes se dispersan y no tienden a afectar las propiedades organolépticas de los alimentos.

Todos los resultados obtenidos en contacto por vapor demuestran que este es tan bueno como lo es el contacto directo, sin embargo, el contacto por vapor proporciona la ventaja de que al no ser aplicado directamente sobre el alimento, no modifica las características organolépticas 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, aspectos de vital importancia en la industria alimenticia.

9. CONCLUSIONES

La evaluación de la técnica por contacto de vapor de antimicrobianos naturales como son carvarol, timol, cinamaldehído y eugenol fue exitosa, destacando a carvacrol con una CMI de 250 mg/L como el mejor antimicrobiano contra *E. coli* y cinamaldehído con una CMI de 500 mg/L como el mejor antimicrobiano contra *Salmonella spp.*

Al realizar las mezclas binarias se determinó que la mezcla de timol y carvacrol, fue la mezcla que mejor efecto tuvo tanto para *E. coli* como para *Salmonella spp.*

Al determinar el índice FIC de las mezclas binarias, se obtuvo un efecto aditivo en las mezclas de carvacrol-cinamaldehído, timol-carvacrol y timol-cinamaldehído para *E. coli* y en la mezcla de timol-carvacrol de igual manera se obtuvo un efecto aditivo para *Salmonella spp.*

La importancia de los resultados obtenidos radica en que las bacterias patógenas como son *E. coli* y *Salmonella spp.*, que son de las bacterias que principalmente contaminan alimentos pueden ser controladas por el uso de antimicrobianos naturales en fase de vapor.

El contacto por vapor es una nueva alternativa de aplicación de antimicrobianos naturales, que suple a los métodos de aplicación directa como lo es el empleo de antimicrobianos sintéticos tradicionales.

10. SUGERENCIAS

- ✓ Realizar un estudio de timol y carvacrol contra el tiempo para determinar la rapidez del efecto bactericida o la duración del efecto bacteriostático de estos agentes antimicrobianos.
- ✓ Evaluar los efectos del contacto por vapor de timol y carvacrol sobre *E.coli* y *Salmonella spp.* in vivo, es decir aplicado a alimentos.
- ✓ Realizar estudios donde se evalúen las características organolépticas de un alimento expuesto a vapores de aceites esenciales, en comparación con aquellos en los que fueron añadidos directamente.
- ✓ Realizar un análisis donde se evalúe la rentabilidad del uso del método por contacto de vapor de antimicrobianos aplicado a alimentos.
- ✓ Evaluar el uso de otras posibles combinaciones de timol y carvacrol con otros compuestos para potencializar su efecto.
- ✓ Realizar por otros métodos la determinación de la CMI de cada antimicrobiano.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adams, M. R., Moss, M. O. (1997). Microbiología de los Alimentos. España: Editorial Acribia S. A.
- 2) Álvarez, B. C. (2011). Nanotecnología y sus posibilidades en la industria de los alimentos. Colombia: Editorial Recitela
- 3) Anderson, G. F., Martínez, Y. P. (2009). Experimentos de Química Orgánica. Colombia: Editorial Elizcom S.A.S.
- 4) Andrés, C. D., Barrio, P. J. (2008). Ciencias para el mundo contemporáneo. (1ª edición) España: Editorial Editex
- 5) Arango, B. O., Bolaños, F., Villota, O., Hurtado, B. A., Toro, I. (2012). Optimización del rendimiento y contenido de Timol del aceite esencial de orégano silvestre obtenido por arrastre de vapor. Biotecnología del sector agropecuario y agroindustrial, 10 (2), 217-226.
- 6) Ardila, Q. M., Vargas, A. A., Pérez, C. J., Mejía, G. L. (2009). Ensayo Preliminar de la actividad antibacteriana de extracto de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. Biosalud, 8(1), 47-57.
- 7) Armada, D. L., Ros, O. C. (2010). Manipulador de Alimentos: La importancia de la higiene en la elaboración y servicio de comidas. (2ª ed.) España: Editorial Ideaspropias S. L.
- 8) Artés, C. F. (2006). El envasado en atmosfera modificada mejora la calidad de consumo de los productos hortofrutícolas intactos y mínimamente procesados en fresco. Revista Iberoamericana de tecnología Postcosecha, 7(002), 61-85.
- 9) Ashok G., Sheppard, D. J., Donnellfeld, D. E., Friedlaender M. (2010). Tratamiento antibiótico y antiinflamatorio en oftalmología. (1ª edición) Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- 10) Atkins, P. (2008). Las moléculas de Atkins. (2ª ed.) España: Editorial AKAL.
- 11) Ávila-Sosa, R., Palou, E., Jiménez, M., Nevárez-Moorillón, G., Navarro Cruz, A., López-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils

- added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 66–72.
- 12) Ávila-Sosa, R., Hernández-Zamorán, E., López-Mendoza, I., Palou, E., Jiménez, M. M., Nevárez-Moorillón, G., López-Malo, A. (2010). Fungal inactivation by Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *Journal of Food Science*, 75(3), 127-133.
 - 13) Baker C. (2009). *Red Book atlas de enfermedades infecciosas en pediatría*. (1ª edición) Argentina: Editorial Médica Panamericana.
 - 14) Barreiro, J. A., Mendoza, S., Sandoval, A. (1994). *Higiene y saneamiento en la preparación y servicios de alimentos*. (2ª ed.) Venezuela: Editorial Equinoccio.
 - 15) Barreiro, M. J., Sandoval, B. A. (2006). *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*. (1ª edición) Venezuela: Editorial Equinoccio.
 - 16) Barreto, A. G., Sedrés, C. M., Rodríguez, T. H., Guevara, V. G. (2010). *Comportamiento de brotes debidos a enfermedades transmitidas por alimentos*. (1ª edición) Colombia: Editorial Recitela.
 - 17) Bassolé I. H., Juliani H. R. (2012). Essential oils combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989-4006.
 - 18) Bello, G. J. (2000). *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*. (1ª edición) España: Editorial Díaz de Santos S. A.
 - 19) Berg, H. C. (2004). *E. coli in motion*. Estados Unidos: Editorial Springer.
 - 20) Burt, S. A., Van der Zee, R., Koets, Ad. P., De Graaff, A. M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H., Veldhuizen, J. A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4484-4490.
 - 21) Byrd, B. C. (2014). *Wardlaw: Perspectivas en Nutrición*. (8ª ed.) México: McGraw Hill
 - 22) Caamal-Herrera, I., Pereira-Pacheco, F., Madera-Santana, T. (2011). Caracterización óptica y mecánica de películas comestibles a base de mezclas binarias de almidones de *Phaseolus lunatus* L, *Manihot esculenta* Crantz y *Zea mays* L. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12(1) ,101-109.

- 23) Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T., Kahla-Nakbi, A., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of cloveessential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae). *Phytother Res.* 21 (6), 501–506.
- 24) Chavéz M., Anjarath L., Higuera I., Huertas M., Báez R., Morales J., Arteaga F., Rangel M., Ponce S. (2001). Brote por *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. *Salud pública de México.* 43(3), 211-216.
- 25) Cortés, O. I., Rodríguez, A. G., Moreno E. E., Tenorio, L. J., Torres, M. B., Montiel, V. E. (2001). Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud pública de México.* 44(4), 297-302.
- 26) Davidson, P. M., Sofos, N. J., Branen, A. L. (2005). *Antimicrobials in food.* (3^a ed.) Estados Unidos: Editorial CRC:Taylor & Francis Group.
- 27) Deepak Surpiya P., Sharma R., Srivastava S., Kumar Navani N., Pathania R., (2013), Down regulation of yidC in *Escherichia coli* by Antisense RNA Expression Results in Sensitization to Antibacterial Essential Oils Eugenol and Carvacrol. *Plos one.* 8(3), e57370.
- 28) Durango J., Arrieta G., Mattar S. (2004). Presencia de *Salmonella spp.* en un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. *Biomedica.* 24, 89-96.
- 29) Espinoza E., Revollo S., Espada A. (2007). Identificación de *Salmonella spp* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimersa anidado (nested PCR) y técnicas convencionales en huevos recolectados en los principales mercados de la ciudad de la paz. *Visión científica.* 1(2), 10-16.
- 30) Emilfork, S. M., Hannig, K. S. (1999). Colitis hemorrágica por *Escherichia coli* enterohemorrágica O157 H7: Comentario en relación a dos casos clínicos. *Revista chilena de pediatría,* 70(3), 221-228.
- 31) Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott: Diagnóstico Microbiológico.* (12^a ed.) Argentina: Editorial Médica Panamericana
- 32) García, G. R., Palou G. E., (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería en alimentos.* 2 (2), 41-51.

- 33) Gil, A. (2010). Tratado de Nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. (2ª ed.) España: Editorial Médica Panamericana.
- 34) Gill, O. A., A. Holley, A. R. (2004). Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. Applied and environmental microbiology. 70 (10), 5750-5755.
- 35) Gómez A., López A. (2009). Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Temas selectos de ingeniería de alimentos, 3 (1), 33-45.
- 36) González E. (2011). Identificación de Escherichia coli diarreogénicas en muestras clínicas (heces) y de alimentos en el estado de Sinaloa. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- 37) Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez, R. L., Becerril, R., Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of combination of cinnamon and clove essential oils. Food chemistry, 116, 982-989.
- 38) Guerrero, I. (2009). Tecnología de productos de origen acuático. (1ª edición) México: Editorial Limusa.
- 39) Herrera, R. C., Bolaños, V. N., Lutz, C. G. (2006). Química de Alimentos. (1ª edición) Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- 40) Hernández, C. C., Aguilera, A. M., Castro, E. G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. Enf. Inf. Microbiol. 31 (4) 137-151.
- 41) Hernández, R. M., Sastre, G. A. (1999). Tratado de Nutrición. (1ª edición). España: Ediciones Díaz de Santos S. A.
- 42) Heymann, D. L. (2005). El control de las enfermedades transmisibles. (18ª ed.) Estados Unidos: Control of communicable diseases manual. Publicación científica y técnica no. 613.
- 43) Hoelzer, K., Moreno, S. A., Wiedmann M. (2011). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. Veterinary Research, 42:34, 1-27.
- 44) Krisch, J., Rentskenhand, T., Horváth, G., Vágvölggyi. Activity of essential oils in vapor phase against bread spoilage fungi. (2013). Acta biologica Szegediensis, 57(1), 9-12.

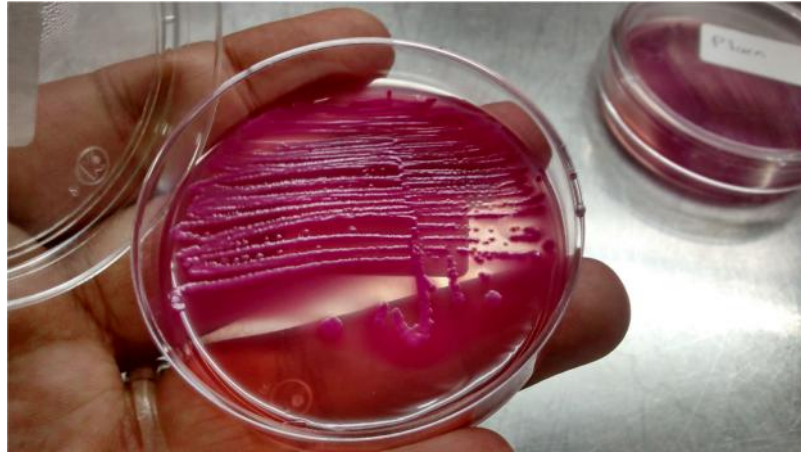
- 45) Laird, K., Phillips, C. (2011). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Letters in Applied Microbiology*, 54, 169-174.
- 46) Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P., Nychas G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.
- 47) López, B. F. (2007). *Preelaboración y conservación de alimentos*. (1ª edición) España: Libros en red.
- 48) López, C. O., León, F. J., Jiménez, E. M., Chaidez, Q. C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32 (2), 119-126.
- 49) López, P., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín C. (2005). Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils:susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food Chem*, 53, 6939-6946.
- 50) López, P., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín C. (2007).Vapor-phase activities of cinnamon, thyme and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4348-4356.
- 51) Marcano D., Hasegawa M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. (2ª ed.) Venezuela: Editorial Torino.
- 52) Margall, N., Domínguez, A., Prats, Guillem, Salleras L. (1997). *Escherichia coli* Enterohenorrágica. *Revista Española de Salud Pública*. 71(5), 437-443.
- 53) Montero C. (2004). *Alimentación y vida saludable: ¿somos lo que comemos?* (1ª edición). España: Univ. Pontifica Comillas.
- 54) Montoya V. H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. (2ª ed.) Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
- 55) Morten, H., Mygind, T., Meyer R. L. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in microbiology*. 3:12. 1-38.
- 56) Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food control*, 20, 157-160.

- 57) Nikos, G., Tzortzakis (2007). Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative food science and emerging technologies*, 8, 11-116.
- 58) Olaya, F., J., Méndez, J. (2003). Guía de plantas y productos medicinales. (1ª edición) Colombia: Editorial Convenio Andrés Bello. Serie ciencia y tecnología no. 116.
- 59) Pascual, A. M. (2005). Enfermedades de origen alimentario: su prevención. (1ª edición). España: Editorial Díaz de Santos S. A.
- 60) Potter, N., Hotchkiss, J. (1999). Ciencia de los Alimentos. (1ª edición). España: Editorial Acribia.
- 61) Rahal, E., Kazzi, N., Nassar, F., Matar G. (2012). *Escherichia coli* O157:H7- Clinical aspects and novel treatment approaches. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2 (138), 1-7.
- 62) Rangel, J., Phyllis ,H., Sparling , Collen C., Griffin, P., Swerdlow D. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging infectious diseases*, 11 (4), 603-609.
- 63) Rodríguez, S. J., Serrano, J. S., Marfil, N. R., Jodral, V. M. (2009). Patógenos emergentes en la línea de sacrificio porcino. (1ª edición) España: Ediciones Díaz de Santos S. A.
- 64) Rodríguez, S. E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7 (1), 153-170.
- 65) Romero, C. R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana.(3ª ed.) México: Editorial Panamericana.
- 66) Reyes, F., Palou, E., López A. (2012). Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6-1 (29-39).
- 67) Santiesteban-López, A., Palou, E., López-Malo A. (2007). Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. *Journal of applied microbiology*, 102 (2), 486-497.
- 68) Salas, S. J., García, L. P., M. Sánchez i Ripollès J. (2005). La alimentación y la nutrición a través de la historia. (1ª edición) España: Editorial Glosa

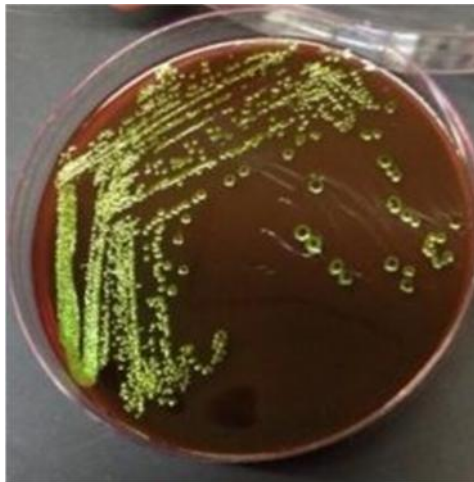
- 69) Soriano Del C. J. (2007). Micotoxinas en Alimentos. (1ª edición) España: Editorial Díaz de Santos S. A.
- 70) Torabinejad, M., Walton, E. R. (2010). Endodoncia: Principios y práctica. (4ª ed.) España: Editorial Elsevier Saunders.
- 71) Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2007). Introducción a la Microbiología. (9ª ed.) Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- 72) Ulloa, J. A. (2007). Frutas auto estabilizadas en el envase por la tecnología de obstáculos. (1ª edición) México: Editorial Universidad Autónoma de Nayarit.
- 73) Valderrama, O. J. (2000). Información tecnológica. Cit, 11 (2), 1-192.
- 74) Varo, G. P., Segura, B. M., (2009). Curso de manipulador de agua de consumo humano. (1ª edición) España: Editorial Universidad de Alicante.
- 75) Vásquez, B., Guerrero, B. J. (2013). Temas selectos de Ingeniería en Alimentos. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y ambiental, 2, 5-14.
- 76) Vásquez, M., Alvarado, P., Rodríguez, I., Saldaña, W., Reyes, W., Vargas A., (2014). Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonell thypi*, *Salmonella parathypi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. Revista científica de la Facultad de Ciencias Biológicas, 34 (1), 57-68.
- 77) Vega, E., López, A. (2009). Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 3 (1), 85-95.
- 78) Von, M. B. (2012). La relación hombre- naturaleza. (1ª edición) México: Editorial Siglo XXI.
- 79) Vuarant, C. O. (2010). Arándanos: Avances Científicos-Tecnológicos. (1ª edición) Argentina: Editorial Universidad Nacional de Entre Ríos.
- 80) Wang, C. (2003). Maintaining postharvest quality of raspberries with natural volatile compounds. International Journal of food science and technology, 38, 869-875.
- 81) Wang, S., Chen, P., Chang, S. (2005). Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). Bioresource Technology, 96, 813-818.

12. ANEXOS

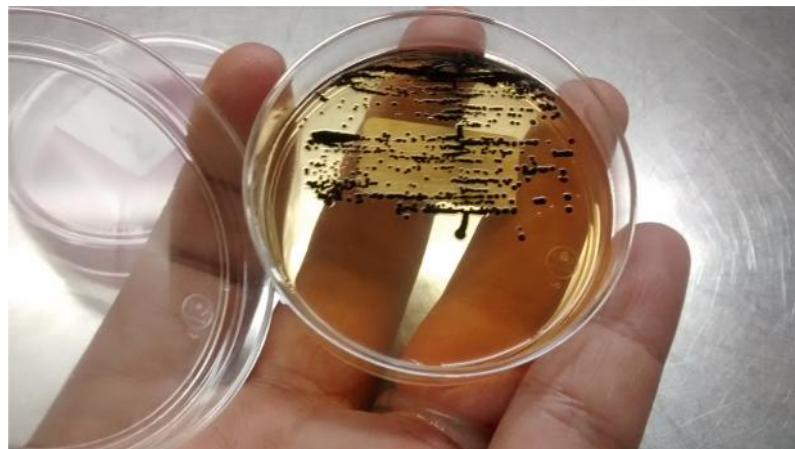
12.1 Identificación de cepas de *E. coli* y *Salmonella spp.*



Agar Mac Conkey, colonias de *E. coli*.



Agar EMB, colonias de *E. coli*.



Agar SS, colonias de *Salmonella spp.*

12.2 Tabla 19. Concentración Mínima Inhibitoria reportada para bacterias y para hongos en contacto directo.

Microorganismo	Método utilizado	CMI mg/L (aceite esencial)
Bacterias	Contacto directo	280-1270
Hongos	Contacto directo	605-1500

12.3 Películas sin antimicrobiano (control)

E. coli



Salmonella spp.



12.4 Película adicionada con antimicrobiano en donde hubo inhibición.

