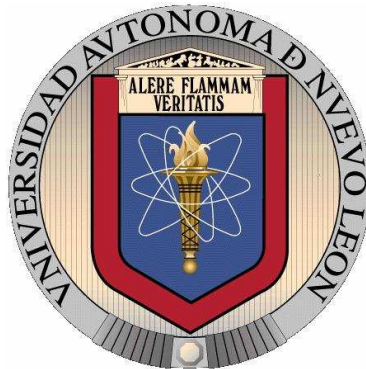


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFEECTO DE EXTRACTOS DE PRODUCTOS NATURALES PARA  
CONTROLAR LA PRESENCIA DE *Campylobacter jejuni* y  
*Salmonella* spp. EN CARNE MOLIDA DE POLLO**

**Por**

**Q.F.B. MAYELA DE SAN JUAN ROBLES HUÍZAR**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación  
en Microbiología.**

**Julio 2010**

Comité de Tesis

---

Director de Tesis: Dra. Norma Laura Heredia Rojas.

---

Secretario: Dr. José Santos García Alvarado.

---

Vocal: M. en C. Luisa Yolanda Solís Soto

El Presente Trabajo se Realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, la coordinación del Dr. José Santos García Alvarado y la asesoría de la M. en C. Luisa Yolanda Solís Soto. Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León(Proyecto 104751).

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme brindado el apoyo económico para poder ver realizada esta meta.

Te doy Gracias Señor por haberme permitido superar esta meta y por haberme dado las fuerzas para no sentirme lejos de casa poniendo en mi camino a personas que me apoyaron en todo a pesar de las adversidades y me permitieron ser parte de su vida.

Agradezco también a la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y al Dr. Santos García Alvarado por haberme dado la oportunidad de ser parte de este laboratorio, y por todas sus enseñanzas, ya que sin su apoyo esta meta no se hubiera podido realizar.

A mis papás por haberme apoyado en todo este tiempo, por haber estado en los momentos más difíciles y recordarme que lo que en realidad vale la pena requiere de sacrificios y fe. Porque a pesar de la distancia siempre me sentí como si estuviera en casa.

A mi hermana Kenia, a mi cuñado Gabriel y a mi sobrino Rubén que me abrieron las puertas de su casa y me hicieron pasar momentos maravillosos en estos dos años que nunca voy a olvidar.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico primeramente a mi madrina la Virgencita de San Juan de los Lagos por darme fortaleza, serenidad, humildad y fe para salir adelante.

A mis papás que en estos dos años hicieron sacrificios junto conmigo, sin sus enseñanzas y su apoyo yo no sería nadie en la vida, ¡los quiero mucho!

A mi hermana Kenia, que siempre has sido mi mejor amiga, apoyándome en todo, dándome consejos, etc. Tú sabes que significas mucho para mí y que siempre has sido mi modelo a seguir.

A mi sobrino Rubén que ha sido lo mejor que me ha pasado en la vida, tu hiciste más sacrificios que nadie, perdón por no haber pasado más tiempo contigo como hubieras querido, y espero que el tiempo que si pasamos juntos lo hayas disfrutado como yo. Te quiero mucho enano.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Aziel, Nydia, Macario, Juan, Armandito, Kiki, La Maestra Sandra y al Maestro Eduardo, quienes formamos un magnífico equipo de trabajo, apoyándonos, compartiendo conocimientos, investigación, tristezas, alegrías, pero sobretodo compañerismo y una hermosa amistad, muchas gracias por todos aquellos momentos que pasamos juntos en estos dos maravillosos años, nunca los voy a olvidar.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
LISTA DE TABLAS .....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN .....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS .....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	6

4.2 Microorganismos patógenos relacionados a ETAs .....	12
4.2.1 <i>Salmonella</i> .....	12
4.2.1.1 Patogénesis .....	14
4.2.2 <i>Campylobacter jejuni</i> .....	16
4.2.2.1 Generalidades.....	16
4.2.2.2 Patogénesis .....	18
4.3 Vías de contaminación de <i>Salmonella</i> y <i>Campylobacter</i> en animales de granja.....	21
4.4 Prácticas para la prevención y reducción de <i>Salmonella</i> y <i>Campylobacter</i> en animales de granja como materia prima.....	24
4.4.1 Métodos mecánicos.....	24
4.4.2 Métodos químicos .....	25
4.5 Estrategias de reducción de patógenos en alimentos procesados .....	26
4.5.1 Proceso de Irradiación.....	27
4.5.2 Uso de antimicrobianos de origen natural .....	29
4.6 Uso de extractos de plantas .....	30
4.6.1 Generalidades .....	30
4.6.2 Extractos de plantas como antimicrobianos naturales.....	31
4.6.3 Principales compuestos antimicrobianos provenientes de plantas .....	32
4.6.3.1 Alcaloides .....	32
4.6.3.2 Flavonas, Flavonoides y Flavonoles.....	32
4.6.3.3 Aceites esenciales y terpenoides .....	33
4.6.3.4 Lecitinas y polipéptidos.....	33
4.6.3.5 Polifenoles y fenoles .....	34
4.6.3.6 Taninos .....	34
4.6.4 Extractos de plantas contra microorganismos enteropatógenos .....	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
5.1 Cepas usadas.....	42
5.1.1 Condiciones de Activación de <i>C. jejuni</i> .....	43
5.1.2 Condiciones de Activación de <i>S. Tyhpi</i> y <i>S. Typhimurium</i> .....	44



5.2 Plantas usadas .....	44
5.3 Obtención de extractos.....	46
5.4 Determinación de peso seco del extracto .....	47
5.5 Ensayo preliminar de susceptibilidad antimicrobiana.....	47
5.6 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) .....	48
5.7 Determinación de la CMB de una mezcla comercial Citrol K-Ultra .....	51
5.8 Determinación de combinaciones efectivas de extractos .....	51
5.9 Efecto de extractos de plantas contra <i>C. jejuni</i> , <i>S. Typhi</i> Y <i>S. Typhimurium</i> en carne molida de pollo.....	54
5.9.1 Proceso de molienda y preparación de la carne .....	54
5.9.2 Preparación del inoculo de <i>C. jejuni</i> .....	55
5.9.3 Preparación del inoculo de las cepas de <i>Salmonella</i> . .....	55
5.9.4 Inoculación y tratamiento de la carne molida de pollo.....	55
5.9.5 Sobrevivencia de <i>C. jejuni</i> , <i>S. Typhi</i> y <i>S. Typhimurium</i> en la carne molida de pollo.....	58
5.10 Determinación colorimétrica de grupos químicos presentes en los extractos.....	60
5.10.1 Hidrocarburos insaturados.....	60
5.10.2 Saponinas .....	60
5.10.3 Flavonoides .....	60
5.10.4 Sesquiterpenlactonas.....	61
5.10.5 Carbohidratos .....	61
5.10.6 p-benzoquinonas.....	61
5.10.7 Alcaloides.....	62
5.10.8 Cumarinas .....	62
5.10.9 Aldehídos y cetonas.....	62
5.10.10 Cloruros .....	63
5.10.11 Taninos.....	63
5.11 Análisis estadístico.....	64
6. RESULTADOS.....	65
6.1 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana .....	65
6.2 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).....	68

6.3 Determinación de combinaciones efectivas de los extractos .....	70
6.4 Efecto de extractos de plantas contra el crecimiento de <i>Campylobacter</i> y <i>Salmonella</i> en carne molida de pollo .....	72
6.5 Determinación colorimétrica de grupos químicos presentes en los extractos de plantas activos .....	82
7. DISCUSIÓN .....	84
8. CONCLUSIONES .....	93
LITERATURA CITADA.....	95
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	116

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Patógenos más frecuentes relacionados con enfermedad diarreica en Estados Unidos y en países en vías de desarrollo .....	8
2. Radiorresistencia en distintas matrices alimentarias de diversas bacterias de interés sanitario .....	29
3. Nombre común, científico y partes usadas de las plantas utilizadas en este estudio mediante extracción etanólica .....	45
4. Tratamientos correspondientes al modelo alimenticio .....	57
5. Tratamientos correspondientes al modelo alimenticio con las mezclas de los extractos probados (jugo de limón:tamarindo y jugo de limón:tomillo).....	58
6. Efecto de extractos de plantas etanólicos resuspendidos en agua, sobre el crecimiento de cepas de <i>Campylobacter</i> y <i>Salmonella</i> .....	66
7. Efecto de extractos de plantas etanólicos resuspendidos en etanol, sobre el crecimiento de cepas de <i>Campylobacter</i> y <i>Salmonella</i> .....	67
8. Concentración mínima bactericida (CMB) de extractos seleccionados con actividad antimicrobiana.....	69
9. Concentración Fraccionada Bactericida (CFB) obtenidas de la mezcla del extracto de jugo de limón más tomillo contra <i>C. jejuni</i> NADC 5653 .....	71

10. Concentración Fraccionada Bactericida (CFB) obtenidas de la mezcla del extracto de jugo de limón más tamarindo contra <i>C. jejuni</i> NADC 5653.....	72
11. Caracterización parcial de compuestos químicos presentes en el extracto de tomillo.....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Rangos relativos de casos confirmados por laboratorio de infecciones por <i>Campylobacter</i> , <i>E. Coli</i> O157:H7, <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Vibrio</i> comparado con las tasas de 1996-1998 por año .....	11
2. Distribución de extractos en microplaca de 96 pozos .....	50
3. Método del tablero usado para la combinación de extractos .....	53
4. Recuento celular de <i>C. jejuni</i> por medio de la técnica de goteo .....	59
5. Recuento celular de las cepas de <i>Salmonella</i> por medio de la técnica de goteo .....	59
6. Efecto del extracto de tomillo a una concentración de 3X aplicado a la carne molida de pollo contaminada artificialmente con <i>C. jejuni</i> .....	75
7. Efecto del extracto de jugo de limón a una concentración de 3X aplicado a la carne molida de pollo contaminada artificialmente con <i>C. jejuni</i> .....	77
8. Efecto del extracto de tamarindo a una concentración de 3X aplicado a la carne molida de pollo contaminada artificialmente con <i>C. jejuni</i> .....	78
9. Efecto del extracto de tomillo a una concentración de 3X aplicado a la carne molida de pollo contaminada artificialmente con <i>S. Typhi</i> .....	80

10. Efecto del extracto de tomillo a una concentración de 3X aplicado a la carne molida de pollo contaminada artificialmente con <i>S. Typhimurium</i> .....	81
--	----

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ETAs	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
OMS	Organización Mundial de la Salud
FDA	Food and Drugs Administration
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
GRAS	Generalmente Reconocidos como Seguros
EUA	Estados Unidos de Norteamérica
CDC	Center for Disease Control and Prevention
AESA	Agencia Española de Seguridad Alimentaria
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ORAC	Capacidad de Absorción de Radicales libres de Oxígeno
OIEA	Organización Internacional de Energía Atómica
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CFB	Concentración Fraccionada Bactericida
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
log UFC/ml	Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
spp.	Especie
m. o	Microorganismo
log	Logaritmo
DS	Desviación Estándar
Co	Cobalto
Cs	Cesio
<i>et al.</i>	Y colaboradores

nm	Nanómetro
° C	Grados Celsius
g	Gramo (s)
h	Hora (s)
<	Menor que
>	Mayor que
≤	Menor o igual que
≥	Mayor o igual que
±	Más/Menos
∑	Sumatoria
#	Número
%	Por ciento
(-)	Negativo
+	Positivo
p/v	Peso/Volumen
μl	Microlitro (s)
mg	Miligramo (s)
ml	Mililitro (s)
mg/ml	Miligramo por mililitro (s)
mg/L	Miligramo por litro (s)
l	Litro (s)
mM	miliMolar
mm	Milímetro (s)
cm	Centímetro (s)
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones Por Minuto
min	Minuto (s)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
NaCl	Cloruro de Sodio



pH	Potencial de Hidrógeno
EtOH	Etanol
H <sub>2</sub> O	Agua
ICC	Infusión Cerebro Corazón
TSB	Caldo Soya Tripticasa
XLD	Xilosa Lisina Desoxicolato
1X	Concentración simple
3X	Concentración triple

## RESUMEN

*Salmonella* y *Campylobacter* son microorganismos enteropatógenos relacionados con ETAs causando gastroenteritis cuya principal fuente de infección es el consumo de alimentos de productos avícolas como la carne de pollo contaminada.

Anualmente en los Estados Unidos se registran 1.4 millones de casos de infecciones por *Salmonella* y 2.4 millones de infecciones por *Campylobacter*, lo que los convierte en microorganismos potencialmente peligrosos para la salud. Es por esto que se han desarrollado estrategias como el uso de tratamientos químicos, físicos o biológicos que permiten reducir o eliminar la carga bacteriana presente en los alimentos. Investigaciones recientes han demostrado que algunos extractos de plantas tienen actividad antioxidante así como antimicrobiana y podrían ser de gran utilidad como aditivos en los alimentos.

En este trabajo, se observó que extractos como el de jugo de limón, tamarindo y tomillo tienen actividad antibacteriana presentando inhibición del crecimiento de *S. Typhi*, *S. Typhimurium* y *C. jejuni in vitro* mostrando halos de inhibición mayores a 1 cm. Dichos extractos al ser mezclados *in vitro* presentaron un efecto sinérgico para la inhibición de *C. jejuni*. Sin embargo, al ser añadidos a la carne molida de pollo contaminada artificialmente, se observó que el tomillo fue el más efectivo contra *C. jejuni* reduciendo la población cerca de 3.5 log en los primeros 5 días de almacenamiento de la carne a 4°C mientras que para ambas cepas de *Salmonella* no se obtuvo el mismo efecto.

## ABSTRACT

*Salmonella* and *Campylobacter* are enteric microorganisms associated with foodborne diseases, such as gastroenteritis, where the principal source of infection is the consumption of contaminated poultry products and poultry meat.

Annually in the United States is reported 1.4 million cases of *Salmonella* infections and 2.4 million *Campylobacter* infections, which makes these bacteria potentially dangerous microorganisms to health.

As control strategies of these microorganisms have been developed different technologies such as chemical substances, physical and biological interventions. Recently have been reported that some plant extracts have antioxidant and antimicrobial activity, and could be used as additives and preservatives in foods.

In this study, we observed that extracts such as lemon juice, tamarind and thyme had antimicrobial activity against growth of *S. Typhi*, *S. Typhimurium* and *C. jejuni*. *In vitro* assays, showed growth inhibition zones larger than 1 cm. Mixtures of these plants, showed a synergistic effect against *C. jejuni*. When they were applied in a food model (ground chicken beef), thyme was the most effective against *C. jejuni* arising 3.5 log population reduction in 5 days of storage at 4° C. However this effect not was observed with the *Salmonella* strains tested.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) se definen como aquéllas que se presentan cuando se lleva a cabo la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos (hongos, virus o bacterias) o sus toxinas en cantidades suficientes para causar la enfermedad (OMS, 2002).

Se estima que las bacterias son responsables del 30% de todas las ETAs, siendo las más importantes las del género *Salmonella* y *Campylobacter* (CDC, 2010), ya que tan solo en los Estados Unidos se reportan al año 1.4 millones de casos de infecciones por *Salmonella* y 2.4 millones de casos de infecciones por *Campylobacter* (Mead *et al*, 1999).

Investigaciones epidemiológicas han identificado los factores de riesgo asociados con las infecciones por estos enteropatógenos, como el consumo de carne de pollo o huevo mal cocidos así como el contacto con animales de granja que sean portadores del microorganismo. (Friedman *et al*, 2004; Vieira *et al*, 2001; Kimura *et al*, 2004). Por lo que se han propuesto medidas de control para evitar el incremento de casos y reducir la presencia de estos patógenos en los alimentos.

Entre las técnicas de desinfección de productos avícolas se encuentran el uso de productos de origen natural como aceites esenciales y extractos de plantas cuyos componentes orgánicos incluyen terpenoides, fenoles aromáticos, éteres, aldehídos y cetonas (Batish *et al*, 2008) y se ha observado que sirven como agentes antimicrobianos siendo algunos de ellos reconocidos como sustancias GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros por sus siglas en inglés) (Ponce *et al*, 2003). Lo anterior resulta de gran importancia para la industria de alimentos, debido al aumento en la demanda de los consumidores por productos que sean más nutritivos, con menos conservadores químicos, de mejor calidad y que estén libres de patógenos.

El uso de agentes antimicrobianos de origen natural ha sido muy estudiado en modelos *in vitro* demostrando que diversos extractos de plantas tienen la capacidad de ejercer un efecto biológico sobre el crecimiento y/o producción de factores de virulencia de diferentes microorganismos. Sin embargo, son pocos los estudios realizados del efecto del extracto en un modelo alimenticio, por lo que en este trabajo se pretende probar el efecto antimicrobiano de algunos extractos de plantas comestibles contra *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni* tanto *in vitro* como en carne molida de pollo contaminada artificialmente con estas cepas.

## 2. HIPÓTESIS

El uso de extractos de plantas comestibles y sus mezclas poseen actividad antimicrobiana contra *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni in vitro* así como en carne molida de pollo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas comestibles *in vitro* sobre *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni* y probar su eficacia en carne molida de pollo contaminada artificialmente.

### 3.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas comestibles *in vitro* contra *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni*.
2. Preparar una mezcla con los extractos que posean actividad antimicrobiana y determinar si existe algún efecto sinérgico o antagónico entre ellos sobre el crecimiento de *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni*.
3. Determinar el efecto del extracto seleccionado sobre el crecimiento de *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni* en carne molida de pollo inoculada artificialmente.
4. Semi-caracterizar los principales grupos químicos presentes en los extractos que mostraron actividad biológica contra los microorganismos estudiados.



## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son aquéllas que se originan por la ingestión de alimentos contaminados con agentes microbianos y/o sus toxinas en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor (OMS, 2002).

Una de las ETAs más conocida, es la enfermedad diarreica o gastroenteritis infecciosa, la cual se manifiesta básicamente por evacuaciones líquidas o acuosas, siendo responsables diversos microorganismos como virus, parásitos y diversas bacterias como *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Escherichia coli*, *Listeria* spp, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens* y *Staphylococcus aureus*, entre otras (OMS, 2002).

En las pasadas dos o tres décadas, autoridades de seguridad pública de países industrializados han enfrentado un gran número de problemas de seguridad en alimentos. En 1983 la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) concluyeron que las

enfermedades relacionadas al consumo de alimentos contaminados fue, quizá, el problema de salud más grande del mundo contemporáneo y una causa importante en la reducción de productividad, afectando a la industria, servicios de salud y a la misma sociedad (Käferstein *et al*, 1997).

En Estados Unidos la contaminación de alimentos por organismos patógenos como *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Clostridium*, *Campylobacter* y *Listeria monocytogenes* son responsables de más de 76 millones de casos de ETAs, 5000 muertes y 323 mil hospitalizaciones, ocasionando pérdidas de entre 7 a 10 billones de dólares anualmente (Mead *et al*, 1999).

En México la situación es diferente con respecto a los Estados Unidos, de acuerdo con los datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) en el año 2007 se reportaron 4,616,080 casos de infecciones intestinales, de los cuales 44,076 fueron ocasionados por *Salmonella* Typhi, y 36,121 casos por otro tipo de organismos (SINAVE, 2007).

Estos datos reflejan un gran incremento de casos en comparación con los datos del año 2005, en el cual se reportaron 40,599 casos por consumo de alimentos contaminados, de los cuales, 31,790 casos fueron provocados por *Salmonella* (SINAVE, 2005).

De acuerdo con un estudio de la OMS, la incidencia de las ETAs en países en vías de desarrollo es menos comprendida, pero se estima que la enfermedad diarreica o gastroenteritis causada por el consumo de alimentos y agua es la tercera causa de muerte en estos países y depende de diversos factores como la pobreza, falta de conocimiento, problemas de higiene, alimentos o agua contaminados, utensilios de cocina así como el contacto con animales o aves que pueden ser una fuente de contaminación (Black and Lanata 1995; OMS 1999).

En países desarrollados el riesgo a contraer la enfermedad depende de factores como el tipo de alimento que se consume, contaminación cruzada, el incremento del consumo de alimentos crudos como las frutas y vegetales, así como el estado de salud de la persona, ya sea por enfermedades crónicas, inmunosuprimidas, embarazadas o personas muy jóvenes como los niños (Bender *et al*, 1999). En la tabla 1 se muestran los patógenos más frecuentes relacionados a ETAs en EUA así como en países en vías de desarrollo.

**Tabla 1.**

Patógenos más frecuentes relacionados con enfermedad diarreica en Estados Unidos y en Países en vías de desarrollo (> 50 % de casos). Fuente: Foodborne Illnesses and Nutritional Status. (King *et al*, 2000).

Estados Unidos	Países en Vías de Desarrollo
<i>Campylobacter spp.</i>	<i>Escherichia coli</i> - Enterotoxigénica
<i>Salmonella spp.</i>	<i>Campylobacter spp.</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Salmonella spp.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> -Enteroagregativa y Enteroadherente
<i>Shigella</i>	

La industrialización del suministro de alimentos también ha permitido la diseminación de patógenos a través de la población de una manera más rápida de lo que ocurría cuando el alimento se hacía y distribuía de manera local, por lo que nuevos patógenos han emergido llegando al consumidor a través de una gran variedad de alimentos (Allos *et al*, 2004).

Por algunos años, epidemiólogos del Centro para el Control de Enfermedades Infecciosas (CDC, por sus siglas en inglés) propusieron un sistema de vigilancia activo de ETAs en EUA pero el financiamiento no estaba disponible. Entonces, entre noviembre de 1992 y febrero de 1993 se presentó un brote de *E. coli* O157:H7 en diferentes estados del oeste de EUA causando más de 700 infecciones y 4 muertes que posteriormente se relacionaron al consumo de carne para hamburguesas mal cocida de un restaurante de comida rápida, lo que llevó a la formación de sistemas de regulación de seguridad de alimentos (Tuttle *et al*, 1999, USDA 1996)

Dichas regulaciones, se implementaron en 1997 y permitieron obtener una reducción de contaminación del alimento durante el proceso de manufactura.

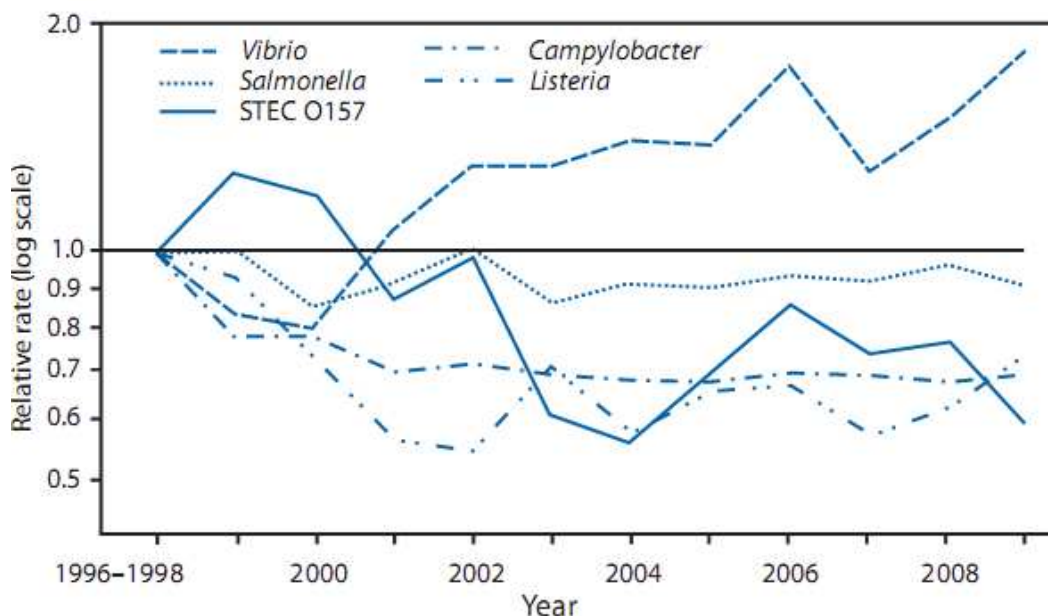
Antes de esto, se estimaba que en los EUA *Salmonella* spp. causaba 1,400,000 de casos de infecciones al año, de las cuales 16,000 eran hospitalizados y cerca de 600

fallecían. En el caso de *Campylobacter*, se estimaban al año 2.4 millones de casos, de los cuales 244,800 requerían hospitalización y 2,400 finalmente morían (Mead *et al*, 1999).

Ya para diciembre del 2009 en EUA la CDC reportó 17,468 casos de ETAs, de los cuáles, 7,039 fueron atribuidas a *Salmonella*; 6,033 a *Campylobacter*; 1,849 a *Shigella*; 1,325 a *Cryptosporidium*; 459 a *E. coli* O157:H7; 264 a *E. coli* no enterohemorrágica; 160 a *Vibrio*; 158 a *Listeria*; 150 a *Yersinia* y 31 a *Cyclospora*. (CDC, 2010).

En este reporte la CDC describió datos de sobrevivencia de estos patógenos y su incidencia desde 1996 (Figura 1). Comparando los datos obtenidos del 2009, la incidencia de infecciones causadas por dichos patógenos disminuyó en comparación con los datos reportados de 1996 a 1998, sin embargo, de las 4 infecciones que se tienen como principal objetivo (causadas por *Campylobacter*, *Listeria*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7) solamente se cumplió el objetivo planteado ( $\leq 1.0$  casos por 100,000 habitantes) para *E. coli* O157:H7 (CDC, 2010)

La tasa de infección por *Salmonella* disminuyó ligeramente en el 2009, así como para *Campylobacter*, y se observó que la incidencia de infección por *Listeria* continúa substancialmente más baja con respecto a los datos de 1996. Por otro lado, la tasa de infección por *Vibrio* sigue en aumento por lo que en este caso se necesitan mejores medidas de prevención (Figura 1). (CDC, 2010).



\*Toxina Shiga producida por *E. coli*

†La posición de cada línea indica el cambio relativo en la incidencia del patógeno, comparada en 1996-1998. Las incidencias absolutas de estas infecciones no pueden ser determinadas de esta gráfica. Los datos del 2009 son preliminares.

**Figura.1** Rangos relativos de casos confirmados por laboratorio, de infecciones por *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *Listeria*, *Salmonella*, y *Vibrio* comparado con las tasas de 1996-1998 por año. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), United States, 1996-2009† (CDC, 2010).

Aunque se haya logrado una reducción importante en los casos reportados por ETAs, se siguen haciendo esfuerzos para reducir la contaminación de alimentos entendiendo mejor las rutas de exposición a éstos y tomando medidas que sean eficaces para su prevención (CDC, 2010).

## 4.2 Microorganismos Patógenos Relacionados a ETAs

Desde que se reportaron casos de brotes de enfermedades transmitidos por alimentos relacionados a productos cárnicos, los patógenos entéricos en ganado y aves de corral han sido de gran importancia.

Entre los microorganismos que se encuentran más relacionados a estas enfermedades se pueden mencionar a *Salmonella* y *C. jejuni* como los principales causantes de ETAs a nivel mundial, seguido de patógenos como *E. coli* O157:H7, *Listeria*, *Yersinia* y *Vibrio*. Estos microorganismos pueden estar presentes como comensales en ganado vacuno, cerdos y aves de corral en los que rara vez se manifiesta la enfermedad considerándose portadores de los patógenos causando enfermedades en el hombre (Mead *et al*, 1999; Mandell *et al*, 2005).

### 4.2.1 *Salmonella*

El género *Salmonella* es un miembro típico de la familia *Enterobacteriaceae* y comprende bacilos Gram negativos, móviles, aerobios, no formadores de esporas (Mandell GL *et al*, 2005). Éste género consta de dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*, y se subdivide en seis subespecies: *entericae*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Uzzau S *et al*, 2000), consta de tres diferentes tipos de antígenos como son el somático O, flagelar H y capsular Vi que son usados para diferenciar entre los más de 2500 serotipos distintos de *Salmonella* (Popoff, 2001).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 35-43° C, sin embargo puede crecer en un rango de 5.2° C a 46.2° C. Es una bacteria que se desarrolla en un pH de 3.8 a 9.5, siendo su pH óptimo de 7-7.5 (Popoff, 2001).

El hábitat natural de las especies de *Salmonella* es el intestino de animales de granjas como las aves de corral y sus derivados como el huevo, por lo que la ingesta de estos alimentos mal cocinados puede llevar a una infección en el hombre (Mandell *Get al*, 2005). La modernización de granjas de pollo y la globalización en la crianza de aves ha permitido la diseminación de este patógeno (Holt, 2003).

Ésta bacteria es el agente causal de la salmonelosis que comprende un conjunto de cuadros clínicos cuya principal manifestación es la gastroenteritis aguda causada por la ingesta de agua o alimentos contaminados con este microorganismo. Estudios en voluntarios, han demostrado que la dosis infecciosa de este patógeno va de  $10^3$ - $10^6$  células (Kumate *et al*, 2004).

Este estado de la infección, que puede durar 2 a 3 semanas, se caracteriza por una tos seca, fiebre alta, e intenso dolor de cabeza. La fiebre puede ser cíclica, es decir, la temperatura puede incrementarse por las tardes, acompañada de escalofríos, convulsiones y delirio (Kumate, 2004)



Anualmente se registran 17 millones de casos con casi 600,000 muertes en el mundo. En México, la incidencia es 10 por cada 100,000 habitantes. Ciertamente, las diferencias en incidencia y en grupos de edad afectados son problemas de interés para la epidemiología, cuya resolución involucra la mejor comprensión de los modos de transmisión y sobrevivencia de la bacteria en el ambiente, el conocimiento más profundo de la respuesta inmunológica del huésped y de las posibles variaciones genéticas entre los aislados clínicos de *Salmonella* (Zaidi *et al*, 2006).

#### **4.2.1.1 Patogénesis**

Para poder establecer los sitios de colonización, *Salmonella* debe ser capaz de sobrevivir a las características fisicoquímicas del estómago, incluyendo el pH bajo y la presencia de diferentes ácidos orgánicos, por lo que ha desarrollado mecanismos que le permiten sobrevivir ante estas condiciones como lo es la síntesis de proteínas de choque ácido que están asociadas a la respuesta de tolerancia ácida (Foster, 1991).

Una vez que *Salmonella* es capaz de estar en diferentes sitios del intestino, colon y recto, se adhiere a las paredes del mismo mediante fimbrias o pilis presentes en la superficie de la célula, como la fimbria tipo 1 (Fim), fimbria larga polar (Lpf, la que parece tener especificidad por su tejido blanco uniéndose a la superficie de las placas de Peyer y células M), la fimbria delgada agregativa (se une al intestino delgado), y fimbria codificadora de plásmido (Pef, que se une a las vellosidades del intestino), las cuáles

juegan un papel importante en este proceso. (Darwin and Miller, 1999; Baumler *et al*, 1996a,b; Sukupolvi *et al*, 1997; Althouse *et al*, 2003).

Posteriormente *Salmonella* invade las células huésped seguida de un ataque al tejido mediante la expresión de sistemas de secreción tipo III (T3SS) los cuáles facilitan la captación endotelial y la invasión celular, ya que permite la transferencia de factores de virulencia directamente a la célula huésped y está asociado con por lo menos 20 proteínas estructurales y regulatorias de invasión celular (Lostroh and Lee, 2001; Marlovitz *et al*, 2004; Galán and Wolf-Watz, 2006).

Mediante el mecanismo descrito se lleva a cabo la atracción de neutrófilos a los sitios de infección, mismos que incrementan el proceso de inflamación generando la secreción de fluidos en el tracto intestinal produciendo diarrea (Wallis and Galyov, 2000).

Una vez que *Salmonella* se internaliza, la bacteria reside en la membrana unida a la vacuola contenedora de *Salmonella* (SCV) la cual madura y migra del borde luminal de la célula a la membrana basal donde *Salmonella* interactúa con los macrófagos de las placas de Peyer en el espacio submucoso produciendo con ello una infección invasiva. (Knodler and Steele-Mortimer, 2003; Ohl and Miller, 2001; Tierrez and García-del Portillo, 2005)

El periodo de incubación de esta bacteria oscila entre los 10 a 14 días y su cuadro clínico aparece de manera insidiosa, el paciente presenta malestar general, astenia, anorexia, cefalea y poco después, náusea y vómito. Las manifestaciones del aparato digestivo son muy notables ya que suele haber diarrea moderada y se presenta dolor abdominal (Kumate *et al*, 2004).

Sin tratamiento antibiótico, cerca del 90 % de los pacientes se curan espontáneamente a la cuarta semana de haberse presentado los síntomas, sin embargo, el ataque al estado general, la pérdida de peso y sensación de debilidad pueden prolongarse más tiempo. En el 10 % restante se pueden presentar complicaciones graves que pueden llevar a la muerte (Kumate *et al*, 2004).

## **4.2.2 *Campylobacter jejuni***

### **4.2.2.1 Generalidades**

*C. jejuni* se aisló por primera vez en el año de 1970 y hoy en día es uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis bacteriana en humanos a nivel mundial siendo el 90% de los casos, generados por esta bacteria (Nachamkin *et al*, 2000).

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteriaceae* que incluye bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, tiene forma espiral, miden entre 0.2-0.8  $\mu\text{m}$  de ancho y 0.5-5  $\mu\text{m}$  de largo, además de poseer un flagelo polar en uno o

ambos extremos confiriéndole la característica de movilidad tipo sacacorchos (Garrity, 2005). Es de naturaleza microaerofílica por lo que tolera concentraciones bajas de oxígeno y ~10% CO<sub>2</sub>. Su temperatura de crecimiento es 37°C, sin embargo las especies termotolerantes lo hacen a 42°C (Moore *et al*, 2005).

Este género está conformado por las especies *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, y *C. upsaliensis* (Lawson *et al*, 1999). Aunque más del 90 % de los casos de gastroenteritis son causados por las especies de *C. jejuni* y *C. coli* (Samuel *et al*, 2004).

Es un patógeno que coloniza una gran variedad de animales salvajes y domésticos. Se considera a las aves de corral como los pavos y pollo, el principal reservorio de *Campylobacter* capaz de ser transmitido a humanos, aunque también está relacionado con el consumo de leche fresca, agua y contacto con animales domésticos (Peterson M 2003, Hanninen *et al*, 1998, García *et al*, 1985).

*Campylobacter* forma parte de la flora intestinal normal de aves y la infección es usualmente autolimitante, se estima que la verdadera incidencia en la población es de 8 a 30 veces mayor que los casos confirmados, dependiendo del país. Anualmente ocurren cerca de 400 millones de casos de gastroenteritis asociados a *Campylobacter* a nivel mundial, con 2.5 millones de casos en los Estados Unidos (Samuel *et al*, 2004; Van Pelt *et al*, 2003; Wheeler *et al*, 1999).

Por lo que el control de *Campylobacter* en la cadena de producción de los alimentos se ha vuelto un blanco importante de las agencias de seguridad alimentaria a nivel mundial (OIE, 2008).

#### 4.2.2.2 Patogénesis

El proceso de desarrollo de la enfermedad, comienza con la ingesta de alimentos contaminados con *Campylobacter*. Este patógeno es altamente infeccioso y su dosis efectiva más baja varía entre 500 a 800 UFC, que durante el pasaje a través del ambiente ácido del estómago, una gran proporción puede ser eliminada mientras que las bacterias que sobreviven, son capaces de adherirse a las células del epitelio intestinal dando como resultado un estado de colonización asintomático o producir la enfermedad (Cawthraw *et al*, 2000; Christenson *et al*, 1983).

La enfermedad que este microorganismo causa se conoce como campilobacteriosis siendo ésta una enteritis inflamatoria que afecta inicialmente en el intestino delgado y posteriormente el colon y el recto (Black, 1988; Cawthraw *et al*, 2002).

Existen dos mecanismos por los cuáles *Campylobacter* puede inducir la enfermedad, el primero es mediante la adhesión de *Campylobacter* al intestino y la producción de toxinas como la tipo Shiga, hemolisinas, toxina citoletal distensora (CDT) y la toxina tipo cólera la cual se une a receptores celulares del enterocito, estimulando el sistema

AMP cíclico de las células epiteliales alterando la capacidad de reabsorción del fluido intestinal provocando la diarrea (Ketley, 1997).

El segundo, es mediante la invasión y replicación dentro de la mucosa intestinal acompañada por una respuesta inflamatoria resultando una diarrea sanguinolenta o diarrea inflamatoria. Esta última sugiere que la infección puede provocar un fuerte daño intestinal y es resultado directo de la presencia de dichas toxinas bacterianas (Wassenaar, 1997).

En el 30 % de los pacientes, la enfermedad no comienza con diarrea, sino presentando un cuadro clínico parecido al virus de la influenza como fiebre, dolor de cabeza, mareos y mialgias, indicando que existe algún mediador inmune que está provocando la infección (Skirrow and Blaser, 2000). Usualmente la diarrea comienza a disminuir al tercer o cuarto día, aunque el microorganismo puede ser encontrado en las heces por varias semanas (Kapperud *et al*, 1992).

Aunque la enteritis por *Campylobacter* es limitante y la enfermedad se quita en una semana, algunos individuos desarrollan secuelas después de la fase aguda, aproximadamente 1 en 1000 individuos infectados, desarrolla el síndrome de Guillain-Barré (GBS) que es un desorden neurológico autoinmune causando síntomas como

debilidad de las extremidades hasta producir parálisis completa e insuficiencia respiratoria desde las extremidades (Nachamkin *et al*, 2000).

Existen reportes de algunos casos de síndrome urémico hemolítico asociado a *Campylobacter*, el cual es una secuela conocida de infección por verotoxinas (Toxinas Shiga) producida por cepas de *E. coli* (Skirrow and Blaser, 2000).

*Campylobacter* también ha sido aislada de pacientes con enfermedad del intestino inflamatorio como la enfermedad de Crohn's aunque el vínculo entre ambas aún sigue en debate (Berberian *et al*, 1994; Weber *et al*, 1992; Geboes K, 2001).

Debido a lo anterior, se recomienda para su control garantizar la salud de los animales mediante la prevención y medicina veterinaria, mantener una buena higiene y saneamiento del alimento así como evitar que se produzca una contaminación cruzada con otros alimentos (Galanis E, 2007).

### **4.3 Vías de Contaminación de *Salmonella* y *Campylobacter* en animales de granja**

La presencia de patógenos en el ganado y aves de corral genera el riesgo de contaminación directa e indirecta de los productos alimentarios (Elder *et al*, 2000). En el ganado y aves, la contaminación fecal de la piel o plumas es a menudo implicada como una fuente importante de contaminación microbiológica de las canales (Arthur *et al*, 2002).

El hecho de que haya materia fecal cerca de las canales, el uso de agua contaminada o el estiércol como enmienda del suelo incrementa las probabilidades de que se produzca la contaminación (Islam *et al*, 2004a).

En estos casos se recomienda descartar las canales o eliminar las partes que han estado en contacto directo con las heces, dando como resultado la pérdida de producto y el incremento en el costo de la producción, sin mencionar el gran impacto de los patógenos en la salud pública (Doyle and Erickson, 2006).

Los patógenos entéricos pueden ser diseminados al ganado y aves de corral a través de una gran variedad de fuentes como el agua que representa un importante vehículo para *E. coli*O157:H7, o las especies de *Campylobacter* (Kemp *et al*, 2005) así como las especies de *Salmonella* que pueden sobrevivir por un largo periodo en piensos o con un bajo nivel de actividad acuosa (Williams and Benson, 1978).



La fauna y plagas se consideran también como una fuente de patógenos en la granja. Adhikari *et al*, aislaron de una granja en Nueva Zelanda cepas de *C. jejuni*, provenientes de moscas, roedores y heces de pájaros de una zona urbana que se encuentra en los alrededores de la granja, implicando una fuente común de infección (Adhikari *et al*, 2004)

En el caso de las granjas de engorda, la prevalencia de *Campylobacter* aumenta cuando otros animales están presentes (Katsma *et al*, 2005). Un estudio demostró que la transmisión de *C. jejuni* entre cerdos, ganado y aves de corral mezclados en la producción ocurría con mayor frecuencia que en las líneas de producción de animales separados (Boes *et al*, 2005).

La transmisión vertical de patógenos entéricos de madres a la progenie ha sido demostrada para *Salmonella* (Methner *et al*, 1995) y *Campylobacter* (Cox *et al*, 2002b), así también, un punto de contaminación puede ser la recolección de semen de gallos que puede sufrir contaminación fecal, trayendo como consecuencia que la inseminación pueda llegar a infectar a las gallinas y a sus huevos (Donoghue *et al*, 2004).

Durante su transporte, el ganado es confinado para prevenir movimiento excesivo, lo que provoca un contacto físico cercano entre los animales, permitiendo con ello, que los microorganismos sean transferidos de un animal a otro. Además, la presencia de materia fecal derramada en los camiones incrementa el riesgo que poblaciones de patógenos

puedan afectar a otros animales transportados en el mismo camión (Gebreyes *et al*, 1999).

Una vez que los animales llegan al lugar del sacrificio los colocan en un mismo corral, por lo que al mezclar a los animales se incrementa la posibilidad de propagación de patógenos humanos entre animales de diferentes fuentes, ya que no es raro encontrar posibles patógenos después de que han sido lavados y desinfectados (Gebreyes *et al*, 1999).

Por otra parte, cuando los animales están listos para el sacrificio se supone que están libres de microorganismos, sin embargo, se conoce la existencia de microorganismos en tejidos de animales sanos presentes en el tracto gastrointestinal, nódulos linfáticos y superficies externas de la piel, entre otros (Lowry and Stone, 2000).

Durante el sacrificio y preparación de canales se llevan a cabo procesos como el escaldado y eliminación de la piel, disminuyendo con ello significativamente la población bacteriana de la canal. Sin embargo, procesos como la evisceración permite la contaminación cruzada (Lowry and Stone, 2000).

Posteriormente, en el proceso de fabricación (cuando las canales refrigeradas son desmanteladas) los microorganismos pueden ser transferidos de la superficie de una canal a otra parte de la misma; y de una canal a otra por contacto con superficies en común, dando lugar a otra fuente de contaminación (Lowry and Stone, 2000).

#### **4.4 Prácticas para la Prevención y Reducción de *Salmonella* y *Campylobacter* en Animales de Granja como Materia Prima**

Debido a la alta incidencia de ETAs que ocurren anualmente, en el 2000 se adoptó una resolución en la cual, se reconoce el papel fundamental de la inocuidad alimentaria para la salud pública (OMS, 2002). Dicha resolución engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos, abarcando desde la producción de alimento hasta su consumo, lo que se conoce como “desde la granja a la mesa” (OMS, 2009).

En el caso de la materia prima como las aves de corral se emplean aditivos o prácticas que permiten la reducción de microorganismos patógenos, siendo los más comunes:

##### **4.4.1 Métodos mecánicos**

Se han propuesto diferentes métodos para la descontaminación de las canales, por ejemplo, Cox *et al*, (1974b) reportaron la reducción de 1-log en la piel de pollo de canales que habían sido sumergidas en agua a 60° C por 1 min, la reducción de 2-log usando el agua a 71° C y 0.5-log usando agua por debajo de los 60° C. Sin embargo, las canales que recibieron el tratamiento a temperaturas mayores de 60° C mostraron una apariencia de cocción (Cox *et al*, 1974b). Posteriormente Morrison and Fleet (1985) encontraron que al sumergir las canales en agua a 60° C por 10 min, disminuía 100 veces la contaminación con *Salmonella*, y al combinar este tratamiento con un método químico

(200 ppm de cloro o 2.5 % de sorbato de potasio) observaron una disminución mayor en comparación con el tratamiento lavado únicamente con agua (Morrison and Fleet, 1985).

#### 4.4.2 Métodos químicos

Los tratamientos más comunes son el uso de cloro (solución de 500-200 ppm), mezclas de ácidos cítricos (100-200 ppm), fosfato trisódico (solución entre 8-12 %), ozono, Parabenos (0.05 % a 1%) entre otros, los cuáles han demostrado ser efectivos en la reducción de patógenos y aprobados por la USDA a dichas concentraciones (Ransom *et al*, 2003).

El uso de ácidos orgánicos también han demostrado ser eficaces en la reducción de patógenos en la piel de pollo. Por ejemplo, Cox *et al* (1981) reportaron la reducción de 1.21-log de bacterias en la piel de pollo al ser sumergidas en 5 % de ácido succínico a 60° C por 3 min, mientras que al ser usado en 24° C por 3 min sólo se observó una reducción de 0.78-log, sin embargo, el ácido succínico provocó la decoloración y deterioro de las canales.

En estudios posteriores Hwang and Beuchat (1995) reportaron que la mezcla de ácido láctico (0.5 %) y el benzoato de sodio (0.05 %) aumentan el rango de inactivación de *Salmonella*, *C. jejuni* y *E. coli* O157:H7 en piel de pollo durante su almacenamiento en refrigeración a 4° C, sin embargo, algunos de estos ácidos orgánicos no son considerados

sustancias GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros por sus siglas en inglés) y por lo tanto no pueden ser aplicados comercialmente. (Hwang and Beuchat, 1995).

#### **4.5 Estrategias de Reducción de Patógenos en Alimentos Procesados**

Los alimentos que se encuentran ya procesados están expuestos a reacciones físicas, químicas, enzimáticas y/o microbiológicas que pueden llevar a cabo el deterioro del producto o intoxicaciones alimentarias al humano. Por lo que se requieren técnicas que permitan prevenir o disminuir el crecimiento bacteriano (Peshin *et al*, 2002).

Las técnicas de conservación de los alimentos tienen como objetivo: 1) la prevención de acceso de patógenos a los alimentos, 2) la inactivación de los microorganismos en caso de que hayan tenido acceso al mismo y 3) prevención o disminución de su crecimiento en caso de que los dos primeros objetivos no se cumplan (Gould, 2000a).

Existe una gran variedad de tratamientos para la conservación de los alimentos, entre los cuales incluyen el uso de calor que es uno de los más comunes. Desafortunadamente, este proceso induce cambios físicos y químicos en el alimento, por lo que se emplea una combinación de técnicas de conservación, como la refrigeración, vacío, o reducción de tratamiento de calor por la acidificación del alimento, entre otros (Gould, 2000b).

#### 4.5.1 Proceso de Irradiación

El proceso de irradiación o pasteurización fría (nombrada así ya que no genera calor) del alimento es una manera efectiva de preservar el mismo. Se introdujo al mercado en los años 60's, usando radiación ionizante para descontaminar, desinfectar y evitar la maduración de algunos alimentos. Esta se genera a partir de rayos gama producidos por isótopos radiactivos como  $^{60}\text{Co}$  (cobalto) o  $^{137}\text{Cs}$  (cesio), lo que permite reducir los niveles de patógenos en los alimentos, retrasar el deterioro de los alimentos, y prolongar el tiempo de vida en anaquel de los productos frescos al disminuir los cambios biológicos asociados con el proceso de maduración (Farkas, 1998)

Es importante mencionar que varios organismos internacionales como la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), y la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinaron como segura una dosis máxima de 10 kGy en cualquier producto alimenticio. En la tabla 2, se muestran algunos ejemplos de dosis analizadas para la eliminación de bacterias de interés sanitario (Pereda *et al*, 2004).

**Tabla 2.**

Radiorresistencia en distintas matrices alimentarias de diversas bacterias de interés sanitario.

<b>Bacteria</b>	<b>Medio</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Dosis (kGy)</b>
<i>C. botulinum</i>	Pollo	-30° C	3.36
<i>L. monocytogenes</i>	Pollo	2-4° C	0.77
	Pollo	12° C	0.49
	Carne picada de vaca	12° C	0.5-1.0
<i>S. aureus</i>	Carne de pollo	0° C	0.36
	Aves de abasto	10° C	0.42
<i>C. jejuni</i>	Carne picada de pavo	0.5° C vacío	0.19
	Carne de vaca	2-4° C	0.18
<i>E. coli</i> O157:H7	Carne picada de vaca	-17° C	0.307
<i>Salmonella</i>	Carne de vaca asada	3° C <i>S. Typhimurium</i>	0.567
	Carne picada de vaca	20° C <i>S. Typhimurium</i>	0.55
	Pollo deshuesado	-40° C <i>S. Typhimurium</i>	0.497
	Pollo deshuesado	-40° C <i>S. Enteritidis</i>	0.534
	Pollo deshuesado	-40° C <i>S. newport</i>	0.436
	Pollo deshuesado	40° C <i>S. anatum</i>	0.542

Fuente: Revista del comité Científico de la AESA (Pereda *et al*, 2004)

Desafortunadamente al igual que otros tratamientos como la congelación y calentamiento, la irradiación causa alteraciones químicas y sensoriales al alimento, afectando carbohidratos, proteínas, lípidos y vitaminas, aunándole la posibilidad de crear patógenos mutantes que lleguen a ser altamente virulentos, así como disminuir la microflora acompañante que pudiera competir por los nutrientes permitiendo el crecimiento descontrolado del patógeno (Arthur *et al*, 2002).

#### **4.5.2 Uso de Antimicrobianos de Origen Natural**

Muchos productos derivados de plantas como especias, preparaciones de frutas, vegetales o extractos se han usados por siglos para la preservación de alimentos y la extensión del tiempo de anaquel (Draughon, 2004).

La mayoría de la actividad antioxidante asociada a frutas o vegetales está relacionada a su contenido de fenoles y grupos hidroxilo, como por ejemplo las catequinas, ácido gálico, antocianinas, carotenoides y flavonoides (Stacewickz-Sapuntzakis *et al*, 2001), siendo reconocidas como seguros para su uso como aditivos en los alimentos ya que algunos de estos compuestos también otorgan beneficios a la dieta. En un estudio que se realizó en Boston en el Centro de Nutrición Humana Jean Mayer se concluyó que los alimentos con una alta capacidad de absorción de radicales libres y tóxicos de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) puede reducir el riesgo de enfermedades como aterosclerosis, diabetes y cáncer (Cao *et al*, 1995).



Las fuentes naturales de antioxidantes también han demostrado tener un efecto antimicrobiano siendo esto de gran importancia en la industria de alimentos, aunque no sea del todo eficaz como para reducir la cantidad de microorganismos al estándar de cero tolerancia de patógenos (Nam and Ahn, 2003). Sin embargo en conjunción con otras intervenciones no solo se puede ser más efectivo para la reducción de patógenos sino también, para disminuir el impacto negativo en la calidad de productos obteniendo una mejor calidad del mismo (Ricke *et al*, 2005).

## **4.6 Uso de Extractos de Plantas**

### **4.6.1 Generalidades**

Se estima que existen cerca de 250,000 a 500,000 especies de plantas en la Tierra, de las cuales, sólo entre el 1-10 % son usadas como alimento o medicina por el hombre. Se calcula que 300 de estas plantas se han comercializado por su sabor, estructura y olor (Simpson and Orgozaly, 2001). Mientras que la OMS ha catalogado más de 20,000 especies de plantas con propiedades medicinales que pueden ser empleadas en el tratamiento para enfermedades como neumonía, úlcera, bronquitis, resfriados, diarrea entre otras (Flávia *et al*, 2008).

México tiene una gran variedad de plantas siendo el 4º país más rico en este sentido a nivel mundial, con 25,000 especies registradas y un estimado de 30,000 aún sin describir (Adame and Adame, 2000).

La mayoría de las plantas medicinales tienen la habilidad de poseer sustancias aromáticas como los fenoles o sus derivados (Geissman, 1963), entre los que se pueden mencionar los taninos, catequinas, alcaloides y ácidos polifenólicos (Deininger, 1984).

Muchas de estas sustancias son metabolitos secundarios que sirven a la planta como mecanismo de defensa contra la invasión de microorganismos, insectos y herbívoros. Su actividad es muy variada, como por ejemplo los terpenoides son responsables del olor, las quinonas y taninos para la pigmentación, la capsaicina terpenoide que confiere sabor a la planta, etc. (Ramar and Ponnampalam, 2008).

#### **4.6.2 Extractos de Plantas como Antimicrobianos Naturales**

De manera particular, la actividad antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales de las plantas ha sido la base para muchas aplicaciones, entre las que se encuentran la medicina alternativa, terapias naturales y farmacéutica, las cuáles, están siendo ampliamente reconocidas por científicos como un método alternativo para la producción de antibióticos que no están disponibles para mucha gente por su alto costo (Vieira *et al*, 2001).

Su actividad biológica depende de la composición química de la planta, la cual es determinada por su genotipo, origen geográfico, medioambiente y la concentración de los aceites esenciales presentes (Cowan, 1999).

El uso de moléculas antimicrobianas para matar microorganismos patógenos ha recibido mucha atención, en especial los aceites esenciales como el de la canela cuyo

compuesto principal es el *Trans*-cinamaldehído que posee actividad antimicrobiana contra un amplio rango de patógenos causantes de ETAs como *L. monocytogenes*, *V. cholerae*, *Salmonella*, *E. coli*, entre otros (Bowles and Miller, 1993; Friedman *et al*, 2002).

### **4.6.3 Principales Compuestos Antimicrobianos Provenientes de Plantas**

Algunos compuestos presentes en las plantas tienen efectos bactericidas o bacteriostáticos, y son fuertemente activos dependiendo de su capacidad de disolverse en agua (Gill and Holley, 2006). Dentro de los grupos fitoquímicos con mayor uso se encuentran los siguientes:

#### **4.6.3.1 Alcaloides**

Son metabolitos de plantas sintetizados a partir de aminoácidos y se ha encontrado que tienen efecto antibacterial contra microorganismos como *Candida albicans*, *Giardia duodenale*, Tripanosomas, *Plasmodium* por mencionar algunos (Fessenden and Fessenden, 1982; Cowan, 1999). Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la topoisomerasa I y II (Ramsewak *et al*, 1999).

#### **4.6.3.2 Flavonas, Flavonoides y Flavonoles**

Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo, los flavonoides son sintetizados por plantas en respuesta a una infección microbiana (Dixon *et al*, 1983) teniendo un amplio espectro contra microorganismos. La actividad

podiera estar ligada a su habilidad de formar un complejo con proteínas solubles que se unen a la pared celular bacteriana (Tsuchiya *et al*, 1996).

#### **4.6.3.3 Aceites esenciales y Terpenoides**

Los aceites esenciales han sido usados desde la antigüedad como agentes saborizantes, y poseen una gran actividad antimicrobiana la cual se atribuye a su alto contenido de derivados fenólicos como el carvacrol y timol. Los aceites esenciales son metabolitos secundarios ricos en compuestos basados en la estructura isopreno, por lo que son mejor conocidos como terpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, hemiterpenos y sesquiterpenos. Su mecanismo de acción aún no está muy bien comprendido, sin embargo se cree que rompen la membrana celular por sus componentes lipofílicos (Manohar *et al*, 2001).

#### **4.6.3.4 Lecitinas y Polipéptidos**

Se encuentran generalmente en las células de las capas externas del tejido de las plantas, sugiriendo que son la primera línea de defensa contra el ataque de patógenos. Un ejemplo de este grupo son las cumarinas y su mecanismo de acción se cree que es la formación de un canal de iones en la membrana microbiana o la inhibición competitiva de la adhesión de proteínas microbianas en los receptores de polisacáridos del huésped (Sharon y Ofek, 1986).

#### **4.6.3.5 Polifenoles y Fenoles**

Están formados por un anillo fenólico y pueden ser usados en alimentos o preservación de los mismos, son tóxicos para los microorganismos por su contenido de grupos hidroxilo en los fenoles (Urs and Dunleavy, 1975). Los polifenoles se pueden conjuntar con los mecanismos de adhesión bacteriana lo que evita que se una a la superficie celular del receptor evitando con ello el daño al mismo (Mason and Wasserman, 1987).

#### **4.6.3.6 Taninos**

Son un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se encuentran en casi todas las partes de la planta: corteza, hojas, raíces, madera y fruta (Nizet *et al*, 2001). Las propiedades antimicrobianas de los taninos (ácido tánico) le han permitido ser usados en los alimentos para incrementar su vida de anaquel. Otros compuestos como la epicatequina y catequina también poseen actividad antibacteriana y antifúngica (Ho *et al*, 2001). Su mecanismo de acción está ligado a su habilidad para inactivar adhesinas microbianas, transporte de enzimas y proteínas de envoltura celular (Ramar y Ponnampalam, 2008).

#### **4.6.4 Extractos de Plantas contra Microorganismos Enteropatógenos**

Como se mencionó anteriormente, las ETAs son un gran problema de salud a nivel mundial lo que conlleva a buscar maneras de reducir la alta incidencia de las mismas, siendo un área importante de investigación el desarrollo de nuevos métodos de

preservación de alimentos así como la eliminación de los patógenos presentes en ellos (Smith-Palmer *et al*, 1998).

Existen una gran cantidad de investigaciones relacionadas a la actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra enteropatógenos. Algunos ejemplos se muestran a continuación:

Smith-Palmer (1998) *et al* analizaron la actividad de 21 extractos de plantas contra *C. jejuni*, *Salmonella* Enteritidis, *E. coli*, *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* encontrando que los extractos de orégano, clavo, tomillo y laurel presentaron mayor inhibición contra dichos microorganismos (Smith-Palmer *et al*, 1998).

En el año de 1999, Hammer y su grupo de investigación probaron la actividad de 52 extractos y aceites esenciales de plantas como limón, orégano, tomillo, calabaza, durazno y almendras, entre otras, contra microorganismos como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*. De todos los extractos probados, únicamente el orégano, limón y laurel inhibieron a todos los microorganismos en cuestión (Hammer *et al*, 1999)

En ese mismo año, se comparó el efecto antimicrobiano de extractos de clavo y ajo contra *S. epidermidis*, y *S. Typhi*, observándose actividad inhibitoria por parte de estas

dos especias contra dichas bacterias, siendo más efectivo el ajo, sugiriendo así el gran potencial como agentes antimicrobianos (Arora and Kaur, 1999).

En años recientes, se ha reportado también que el concentrado de jugo de limón, lima ácida, limón agrio y de arándano inactivan a *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, y *Salmonella* spp (Enache and Chen, 2007; Nogueira *et al*, 2003)

En el año 2006 se observó que el jugo de col inhibió el crecimiento de *S. Enteritidis*, *E. coli* O175:H7, *E. coli* HB productora de toxina termolábil, *E. coli* no toxigénica y *Listeria monocytogenes* (Brandiet *al*, 2006).

El té de hojas de guayaba ha sido usado comúnmente como remedio contra diarrea infantil y gastroenteritis en Sao Paulo, Brasil y se ha demostrado que tiene actividad antimicrobiana contra diferentes familias de bacterias como *Vibrionaceae*, *Micrococcaceae* y *Propionibacteriaceae*, por lo que Flávia *et al* (2008) probaron el efecto antimicrobiano de extractos obtenidos con metanol, hexano y acetato de etilo de las hojas de esta fruta contra bacterias como *S. aureus*, *Salmonella* spp y *E. coli*, encontrando como resultados que el extracto metanólico fue el que presentó mayor efecto sobre *S. aureus* (Flávia *et al*, 2008)

También se ha probado la actividad antibacteriana del extracto de Jamaica contra microorganismos como *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* siendo *Salmonella* y *Listeria* las más susceptibles a éste (Du *et al*, 2009).

Con respecto al efecto antimicrobiano de los aceites esenciales y sus componentes se han realizado diversos estudios. Tal es el caso de los aceites esenciales de lima, naranja, limón, d-limoneno, terpineol y geraniol los cuales presentaron inhibición sobre el crecimiento de *S. Senftenber*, *E. coli*, *S. aureus* y *Pseudomona* spp (Dabbah *et al*, 1970).

En años posteriores Kim *et al*(1995a) encontraron que los compuestos aislados como carvacrol (presente en el orégano), citral y geraniol (presentes en algunos cítricos)son altamente efectivos contra el crecimiento de *S. Typhimurium* (Kim *et al*, 1995a).

También se ha observado que el aceite esencial de tomillo inhibió a *C. albicans* y *E. coli*, en un estudio realizado por Hammer *et al* (1999) concluyendo con esto que los aceites esenciales y extractos de plantas pudieran jugar un papel importante en la industria farmacéutica así como conservadores de alimentos (Hammer *et al*, 1999).

Posteriormente Dorman and Deans (2000) probaron el efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano contra *E. coli* observando actividad inhibitoria contra ésta, tiempo



después Burt (2004) determinaron que el mayor componente antibacterial de dicho extracto es el carvacrol (Dorman and Deans, 2000; Burt, 2004)

En un estudio realizado por Flávia *et al* (2008) se probó el efecto antimicrobiano del aceite esencial obtenido de la hoja de guayaba, contra microorganismos como *Salmonella* spp y *S. aureus* los cuales fueron inhibidos por dicho aceite concluyendo que se pudieran usar como una nueva fuente de compuestos antimicrobianos (Flávia *et al*, 2008).

Kollanoor *et al*, en un estudio que realizaron usando *Trans*-cinamaldehído (mayor componente de la canela), concluyeron que éste posee un efecto desinfectante y antimicrobiano contra *S. Enteritidis* y *C. jejuni* al añadirse al agua de beber de pollos a una temperatura entre 12.5 y 25° C, siendo *C. jejuni* la bacteria más susceptible. (Kollanoor *et al*, 2008).

Posteriormente O'Bryan *et al* probaron algunos componentes de la naranja contra 11 serotipos de *Salmonella* de los cuáles los terpenos, el d-limoneno y terpenos de la esencia de naranja tuvieron efecto contra este patógeno (O'Bryan *et al*, 2008).

Sin embargo, la mayoría de las investigaciones se hacen en modelos *in vitro* y en raras ocasiones se extrapolan a modelos alimenticios, por lo que hoy en día se están realizando dichas investigaciones con el objetivo de garantizar la seguridad microbiológica del alimento hacia el consumidor (Fisher and Phillips, 2006).

En un estudio reciente se usó el extracto etanólico de romero y chile ancho en un batido cárnico contaminado artificialmente con *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *S. Typhi* obteniendo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los tres patógenos (Vazquez, 2009).

También se ha probado el efecto antimicrobiano del aceite esencial de cilantro en carne molida de pollo y res contra *C. jejuni* a 4° C y 32° C observándose una reducción de 2 log, y cuyo efecto dependió de la concentración agregada a la carne (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010)

Con el objetivo de incrementar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas o aceites esenciales, dichos componentes se han usado en combinación con otros agentes antibacterianos y una gran variedad de tratamientos. Karatzas *et al* (2000) reportaron que el efecto de la combinación de carvacrol, cinamaldehído y timol con tratamiento de calor redujo la viabilidad de *L. monocytogenes* (Karatzas *et al*, 2000).

Ettayebi *et al* (2000) encontraron que la combinación de nisina y timol puede ser efectiva para el control de bacterias responsables de ETAs, ya que las concentraciones de nisina y timol serían menores que aquellas requeridas cuando se utilizan solas (Ettayebi *et al*, 2000).

Recientemente Rui-Song *et al* (2009) evaluaron la actividad antibacterial del eugenol, cinamaldehído, timol, carvacrol y sus combinaciones contra *E. coli* encontrando que las

concentraciones de dichos compuestos al ser combinados se necesitan en menor cantidad (400, 100, 100 y 100 mg/L respectivamente) para inhibir *E. coli* que por sí solos (1600, 400, 400 y 400 mg/L respectivamente). Además, observaron una disminución en el olor característico de los cuatro componentes haciéndolos candidatos para usarlos como aditivos en la conservación de alimentos (Rui-Song *et al*, 2009)

En un estudio reciente Vijay *et al* (2009) evaluaron la resistencia al calor de *E. coli* O157:H7 en carne molida de res en ausencia y presencia de carvacrol y cinamaldehído a temperaturas de 55 a 62.5° C concluyendo que al agregar estos dos compuestos se incrementó la sensibilidad de dicha bacteria al calor (Vijay *et al*, 2009).

Como antecedente directo de este trabajo, Valtierra-Rodriguez *et al* (2010), evaluaron la actividad antimicrobiana de mezclas de extractos de plantas contra *C. jejuni/coli* en piel de pollo inoculada artificialmente, observando que con los extractos de limón, ciruela y cáscara de naranja no se detectaron cuentas de estos patógenos después de 48 h a 4° C (Valtierra-Rodriguez *et al*, 2010).

Vijay *et al*(2010) evaluaron la resistencia al calor de *Salmonella* en carne molida de res en presencia y ausencia de lactato de sodio, aceite de orégano y la combinación de ambos, y se determinó su actividad bactericida o bacteriostática durante tratamientos post-térmicos almacenado a 15°C, encontrando que los niveles de *Salmonella* en la carne disminuyeron 6.66 log UFC/ml (1.5 % NaL y 0.5 % de orégano) en 15 min a 60° C, y 6.77 log UFC/ml (1.5 % NaL y 1 % de orégano) en 10 min a 60° C. Estos resultados

indican que el lactato de sodio y el aceite esencial de orégano pueden ser usados para hacer más susceptible al calor a *Salmonella* spp (Vijay *et al*, 2010).

En un estudio reciente, Birk *et al* (2010) probaron el efecto de marinado de carne de pollo con distintos ingredientes añadidos al alimento, en el que encontraron que usando soluciones de ácido tartárico se reducía la población de *C. jejuni* entre 0.5-2 log, en tanto que algunos ingredientes acídicos (vinagre, jugo de limón, jarabe de granada y salsa de soya) redujeron hasta 0.8 log de este patógeno en la carne, mientras que el marinado preparado compuesto por jarabe de granada, jugo de limón y vinagre de vino blanco (pH < 3) reducía aproximadamente 1.2 log después de tres días de almacenamiento a 4° C (Birk *et al*, 2010).

Debido a lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto antibacteriano de algunos extractos de plantas como el tomillo, jugo de limón, tamarindo y sus mezclas en ensayos *in vitro*, así como en carne molida de pollo contaminada artificialmente con *S. Typhi*, *S. Typhimurium* y *C. jejuni* con el objetivo de determinar su actividad contra dichos microorganismos en un modelo alimenticio.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas usadas

Para este trabajo se emplearon las cepas de *Campylobacter jejuni* NADC 5356 donada por la Dra. Irene Wesley del Centro Nacional de Enfermedades de Animales (USDA, Ames Iowa), *Salmonella* Typhi ATCC 19430 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 donadas por la Compañía Becton-Dickinson de México.

Los cultivos de *C. jejuni* NADC 5653 se mantuvieron en ultra congelación a -80°C en caldo ICC (BD) adicionado con el 0.6% de extracto de levadura y glicerol (20% v/v) como crioprotector (García and Uruburu, 2000). Para la activación de la cepa se tomó una asada del medio de reserva y se sembró por estría en placas de Agar Mueller-Hinton (Bioxon) suplementado con 5% de sangre hemolizada. Las placas se incubaron a 42°C por 48 h bajo condiciones de microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>) (Ravishankar *et al*, 2008).

Para mantener el cultivo, se tomó una asada del cultivo de placa a un tubo con caldo ICC (BD) adicionado con 0.6% de extracto de levadura y se incubó a 42°C bajo condiciones de microaerofilia, realizando resiembras semanalmente.

Los cultivos de *S. Typhi* ATCC 19430 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 se mantuvieron en ultra congelación a -80°C en caldo Mueller-Hinton y glicerol (20% v/v) como crioprotector (García and Uruburu, 2000).

Para la activación de la cepa, se tomó una asada del medio de reserva y se sembró en placas de Agar Mueller-Hinton (Bioxon) incubándose a 37° C por 24 h en condiciones aeróbicas. Posteriormente se pasó una asada del cultivo anterior a tubos con agar ICC en pico de flauta y se incubó a 37°C por 24 h en condiciones aeróbicas, finalmente se mantuvieron a 4°C haciendo resiembras cada 3 meses.

### **5.1.1 Condiciones de Activación de *C. jejuni***

Para la activación de la cepa se tomó una asada del caldo ICC (BD) con extracto de levadura previamente crecido y se sembró por estría en cuatro cuadrantes en placas de Agar Mueller-Hinton (Bioxon) suplementado con el 5 % de sangre hemolizada y se incubaron a 42° C por 48 h bajo condiciones de microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>). Pasado el tiempo de incubación, se tomaron asadas de la cepa y se colocaron en un tubo con 5 ml de caldo ICC con 0.6% de extracto de levadura y se ajustó en un espectrofotómetro (Sequoia Turner) a 610 nm hasta alcanzar una absorbancia de 0.5 que corresponde

aproximadamente a  $10^8$  UFC/ml, para realizar los ensayos *in vitro* (Ravishankar *et al*, 2008).

### **5.1.2 Condiciones de Activación de *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Typhimurium**

Para realizar los ensayos *in vitro*, se activó la cepa tomando una asada del tubo en pico de flauta, y se inoculó en caldo ICC, se incubó a 37° C por 24 h. Posteriormente se tomaron asadas de la cepa y se colocaron en un tubo con 5 ml de caldo ICC y se ajustó la cepa en un espectrofotómetro (Sequoia Turner) a 610 nm hasta alcanzar una absorbancia de 0.5 que corresponde aproximadamente a  $10^8$  UFC/ml.

## **5.2 Plantas usadas**

En la Tabla 3, se muestran las plantas y frutos que fueron usadas para obtener los extractos. Se colectaron en diferentes centros comerciales del área metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León.

**Tabla 3.**

Nombre común, científico y partes usadas de las plantas utilizadas en este estudio, mediante una extracción etanólica (EtOH).

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Tipo de Extracción</b>
<b>Betabel</b>	<i>Beta vulgaris</i> var. Conditiva	Cáscara y pulpa	EtOH
<b>Brócoli</b>	<i>Brassica oleracea</i>	Tallo y hoja	EtOH
<b>Cebolla</b>	<i>Allium cepa</i>	Bulbo	EtOH
<b>Cebolla cambray</b>	<i>Allium schoenoprasum</i>	Hoja y bulbo	EtOH
<b>Cebolla morada</b>	<i>Allium cepa</i>	Bulbo	EtOH
<b>Jamaica</b>	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Flor	EtOH
<b>Jícama</b>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Cáscara y fruto	EtOH
<b>Limón</b>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Cáscara, pulpa y jugo	EtOH
<b>Mejorana</b>	<i>Origanum majorana</i>	Hoja	EtOH
<b>Mostaza</b>	<i>Brassica juncea</i>	Semilla	EtOH
<b>Naranja valencia</b>	<i>Citrus sinensis</i>	Cáscara y fruto	EtOH
<b>Orégano</b>	<i>Poliomintha longiflora</i>	Tallo y hoja	EtOH
<b>Papaya</b>	<i>Corica papaya</i>	Cáscara y fruto	EtOH
<b>Pimienta gorda</b>	<i>Piper nigrum</i>	Fruto	EtOH
<b>Pimiento rojo</b>	<i>Capsicum annuum</i>	Fruto	EtOH
<b>Piña</b>	<i>Anana comosus</i>	Fruto	EtOH
<b>Rábano</b>	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>sativus</i>	Fruto	EtOH
<b>Romero</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Hojas	EtOH
<b>Tamarindo</b>	<i>Tamarindus indica</i>	Cáscara y fruto	EtOH
<b>Té negro</b>	<i>Camellia sinensis</i>	Hojas	EtOH
<b>Té verde</b>	<i>Camellia sinensis</i>	Hojas	EtOH
<b>Tomillo</b>	<i>Thymus vulgaris</i>	Hojas	EtOH
<b>Zacate Limón</b>	<i>Cymbopogun citratus</i>	Hoja	EtOH



### 5.3 Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos, se secaron 300g de la planta y se trituraron en una licuadora (Osterizer mod. Classic) con 200 ml de etanol al 96% (CTR). Posteriormente, se pasaron a matraces Erlenmeyer de 1l y se agregaron aproximadamente 400 ml de etanol al 96% para dejar macerando la planta durante 48 h a temperatura ambiente (Cho *et al.*, 2008).

Pasado este tiempo, el extracto obtenido se filtró con papel filtro Whatman No. 1 y se dejó evaporar a temperatura ambiente. A los extractos ya secos se les agregó agua destilada hasta que se disolvieron por completo y se filtraron nuevamente con papel filtro Whatman No. 1 y se colocaron en frascos estériles forrados con papel aluminio y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Para los extractos etanólicos, se pesaron 1 g del extracto seco y se resuspendieron en 5ml de etanol a diferentes concentraciones comenzando por 96 %, 90 % y gradientes de 10 en 10 hasta 30 % de etanol. Dichas alícuotas fueron usadas para determinar la actividad antimicrobiana del extracto y determinar si el etanol influía de alguna manera en el efecto antimicrobiano del extracto.

Una vez que se seleccionó la concentración de etanol (40% para jugo de limón, y 50 % para pulpa de tamarindo), se resuspendió el extracto seco y se volvió a filtrar con un papel filtro Whatman No. 1. Posteriormente se colocó el filtrado en frascos limpios

forrados con papel aluminio y se almacenó a 4°C hasta su uso. Los extractos se mantuvieron almacenados por un tiempo no mayor a 6 meses.

#### **5.4 Determinación de peso seco del extracto**

Para determinar la concentración del extracto obtenido, se tomó 1 ml del extracto y se colocó en un tubo de ensayo previamente tarado, posteriormente se colocaron en una estufa a 50°C hasta obtener un peso constante y se restó el peso del tubo antes de colocar el extracto correspondiendo este dato a la concentración del extracto (Alarcón, 2002).

#### **5.5 Ensayo preliminar de susceptibilidad antimicrobiana**

Se colocaron 100 µl de cultivo de *C. jejuni* previamente ajustados a  $10^8$  UFC/ml en placas con agar Mueller-Hinton suplementado con sangre hemolizada (5%) y se sembraron por extensión usando un asa de Driglalsky. Posteriormente, se realizaron pozos en el agar, utilizando un tubo de Durham estéril invertido (5 mm de diámetro). A dichos pozos se les agregó 100 µl de los extractos a probar. Como control se utilizó el solvente usado para obtener el extracto. El sistema fue incubado a 42° C por 48 h en condiciones de microaerofilia (10 % CO<sub>2</sub>). Finalmente se observó el efecto del extracto sobre la bacteria mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición y en los casos positivos, se midió el halo. Este ensayo se realizó tres veces con su duplicado (García *et al*, 2005).

En el caso de las cepas de *Salmonella*, el ensayo se realizó de la misma manera que lo anterior, sin embargo el agar usado fue Mueller-Hinton (Bioxon) sin suplemento de sangre y las condiciones de incubación fueron de 37° C por 24 h en aerobiosis.

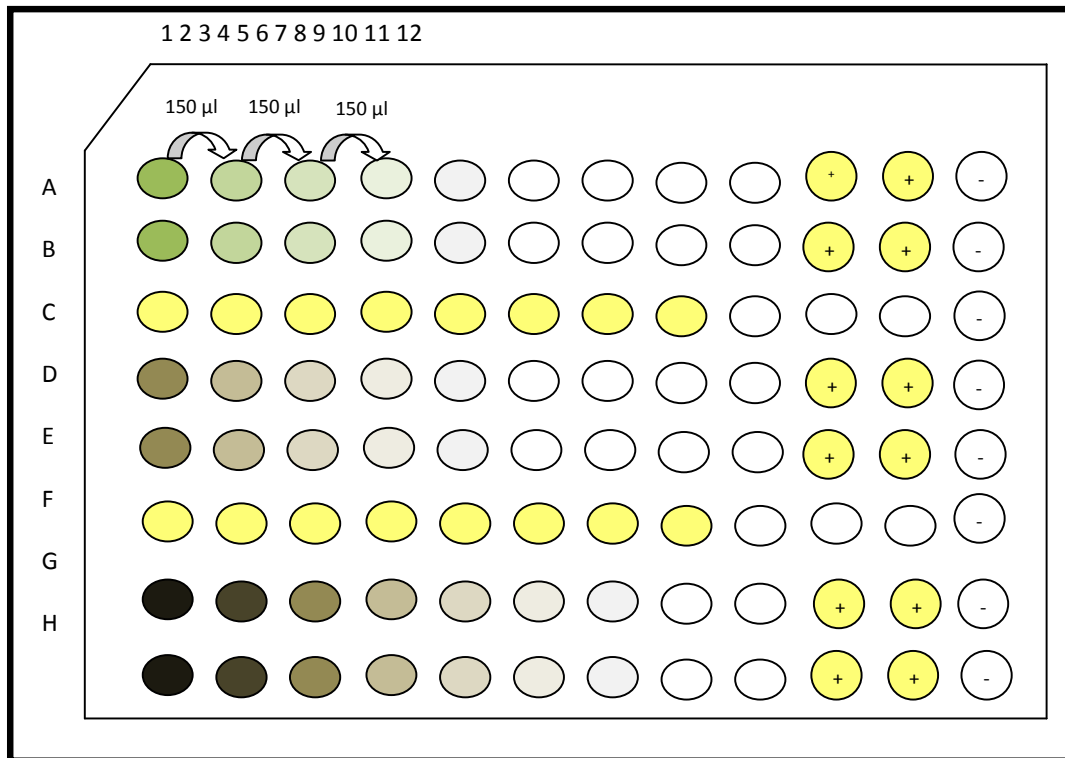
### **5.6 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

La determinación de la CMB se realizó a los extractos que mostraron actividad antimicrobiana en el ensayo preliminar. Para esto se siguió el método de microdilución de acuerdo al PROY-NOM-059-PESC-2004, el cual está basado en los estándares establecidos por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards); con algunas modificaciones. Dicho análisis se realizó usando microplacas estériles de 96 pozos marca Falcon de poliestireno con fondo transparente.

A cada uno de los pozos se agregaron 150 µl de caldo Mueller-Hinton (BD) preparado al doble de concentración (2X) en cada pozo, y después se agregaron 150 µl del extracto y se hicieron diluciones decimales seriadas de 150 µl de un pozo a otro (Figura 2).

Una vez realizadas las diluciones se inoculó la cepa al 1 % v/v previamente ajustada y se incubaron las microplacas a 37° C por 24 h en condiciones de aerobiosis para *Salmonella* y a 42° C por 48 h en microaerofilia (10 % CO<sub>2</sub>) para *C. jejuni*.

Pasado el tiempo de incubación se plaquearon 25  $\mu$ l de cada pocillo por el método de goteo (Miles and Mishra, 1932) en agar Mueller-Hinton (Bioxon) para *Salmonella* y en agar Mueller-Hinton (Bioxon) suplementado con el 5 % de sangre hemolizada para *C. jejuni* incubándose bajo sus respectivas condiciones. Posteriormente se observó el rango más pequeño entre el cual la cepa no creció. Una vez estimado este rango se repitió el procedimiento hasta determinar la concentración exacta, siendo ese dato la CMB. Lo anterior se realizó por duplicado con tres repeticiones.



**Figura 2.** Distribución de extractos en microplaca de 96 pocillos.

Pozo A1: 150 µl de extracto + 150 µl de medio Mueller-Hinton 2X + 3 µl de cepa

Pozo A2-A8: Diluciones del extracto + 3 µl de cepa

Pozo B1-B8: Repetición

Pozo C1: Solvente del extracto (150 µl de etanol (40% y 50%) + 150 µl de medio + 3 µl de cepa)

Pozo C2-C8: Diluciones del solvente del extracto + 3 µl de cepa

Pozo A11-A12(+): Control positivo (150 µl de medio + 1.5 µl de cepa)

Pozo C11-C12(-): Control negativo (150 µl de medio).

### **5.7 Determinación de la concentración mínima bactericida de una mezcla comercial (Citrol K-Ultra).**

Se determinó la CMB del Citrol K-Ultra (CorpoCitrik) donado por el Dr. Juan Carlos Luna con la técnica de microdilución descrita anteriormente. Las concentraciones que se probaron para *Salmonella* fueron de 200, 100 y 50 ppm. La ficha técnica del Citrol-K-Ultra indica que una concentración de 200 ppm es suficiente para inhibir *Salmonella* por lo que se quiso verificar éste dato incluyéndose rangos menores.

Para el caso de *C. jejuni* se realizaron más diluciones hasta obtener una concentración de 0.095 ppm. Cabe mencionar que este dato no está en la ficha del producto y no existen reportes de CMB para este producto contra este microorganismo.

### **5.8 Determinación de combinaciones efectivas de los extractos**

Para determinar si la combinación de los extractos mostraban ya sea un efecto sinérgico o antagónico, se utilizó el método del tablero descrito por Orhan *et al* (2005) con algunas modificaciones realizándose de la siguiente manera:

Se usaron microplacas de 96 pozos marca Falcon de poliestireno con fondo transparente para este procedimiento(Figura 3). Se realizaron mezclas del extracto de jugo de limón con tamarindo (ambos resuspendidos en etanol), y extracto de jugo de

limón con tomillo (el tomillo resuspendido en agua destilada) ya que fueron los que presentaron la CMB menor. Además, se tomó en cuenta que los extractos utilizados fueran compatibles con el alimento en cuestión y pudieran no afectar el sabor al aplicarse en modelo alimenticio.

Para realizar las mezclas, primero se colocó el 100% de la CMB del extracto de jugo de limón en los pocillos A1-A8. Para el 100% de la CMB del extracto de tamarindo se usaron los pocillos A8-H8.

Posteriormente se colocaron en los pocillos centrales 150  $\mu$ l de caldo Mueller-Hinton 2X (BD) y se procedió a realizar diluciones seriadas de arriba hacia abajo (comenzado por el pocillo A1→H1, A2→H2 hasta llegar al pocillo A7→H7) seguida de diluciones de derecha a izquierda (comenzando por el pocillo B8→B1, C8→C1 hasta llegar al pocillo H8→H1).

Una vez realizadas las mezclas de los extractos se inoculó el 1% v/v de la cepa previamente ajustada y se incubó de acuerdo a las condiciones de las cepas que se ha descrito anteriormente.

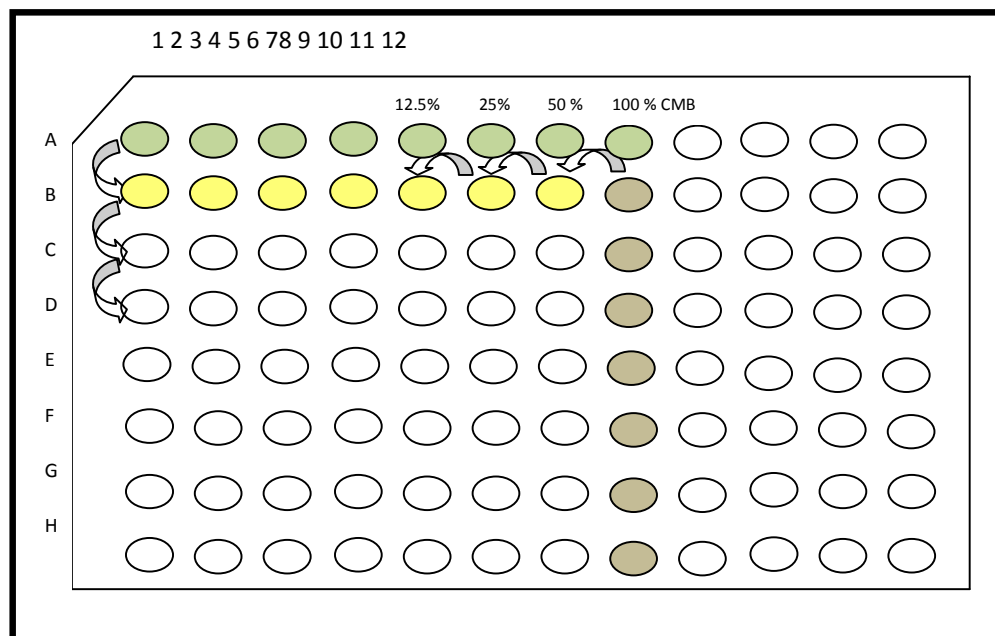
El efecto de las combinaciones se determinó con el cálculo de la concentración fraccionaria bactericida (FBC) mediante la siguiente fórmula:

FBC A= CMB A en combinación / CMB A solo

FBC B= CMB B en combinación / CMB B solo

$$\Sigma\text{FBC} = \text{FBC A} + \text{FBC B}$$

Los índices FBC se interpretaron de la siguiente forma: cuando la  $\Sigma\text{FBC}$  fue cercana a 1 implicó aditividad;  $\Sigma\text{FBC} < 1$  implicó sinergismo y  $\Sigma\text{FBC} > 1$  implicó antagonismo (López-Malo *et al.*, 2005b).



**Figura 3.** Método del tablero usado para la mezcla de extractos. Control (+): caldo de cultivo + cepa, Control (-): caldo de cultivo solo, Control: caldo de cultivo + etanol o agua + cepa. Las flechas indican la dirección de las diluciones.



## **5.9 Efecto de extractos de plantas contra *C. jejuni*, *S. Typhi* y *S.Typhimurium* en carne molida de pollo.**

Para este ensayo se usaron pechugas de pollo estilo mariposa, despellejadas y deshuesadas marca AYVI que se mantuvieron en congelación a -20° C hasta su uso.

### **5.9.1 Proceso de molienda y preparación de la carne**

Para el proceso de molienda de la carne, se descongelaron mediante el pasaje a 4°C una a dos pechugas de pollo 18 h antes de ser molida. Todos los recipientes y utensilios empleados fueron esterilizados previamente (121° C/ 15 min).

Posteriormente, una vez descongelada la carne, se cortó en trozos con un cuchillo y tenedor y se colocaron en un refractario de vidrio. El molino (molino manual para carne marca ROTTER # 32) fue esterilizado previamente con etanol al 70% por aspersion y se dejó secar cerca del mechero para mantener las condiciones de esterilidad. Después de esto, los trozos de carne se molieron y la carne fue recibida en un plato de vidrio estéril. De allí se pesaron 10g y se colocaron en bolsas de plástico las cuáles posteriormente fueron inoculadas y a las que se les determinó la cuenta bacteriana a diferentes días (0, 1, 3, 5 y 7). Se prepararon un total de 40 bolsas para todos los tratamientos.

### **5.9.2 Preparación del inóculo de *C. jejuni***

Se activó la cepa tomando una asada del caldo ICC con extracto de levadura y se estrió en placas de agar Mueller-Hinton (Bioxon) suplementado con el 5% de sangre hemolizada y se incubaron a 42° C por 48 h en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se tomaron asadas de la cepa y se inocularon en un matraz que contenía 40 ml de agua peptonada (Peptona Bioxon) al 0.1% hasta ajustar la concentración celular al 0.5 de McFarland con una densidad óptica a 600 nm en Absorbancia (Bhaduri and Cottrell, 2004).

### **5.9.3 Preparación del inóculo de las cepas de *Salmonella***

Para dicho procedimiento, se activó cada cepa tomando una asada del medio ICC en pico de flauta y se inoculó en 10 ml de TSB (BD) incubándose a 37° C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación, el cultivo se pasó a tubos eppendorf de 15 ml y se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el precipitado fue resuspendido en agua peptonada estéril obteniéndose una concentración de aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml. Se prepararon 4 tubos de la misma manera para obtener un volumen total de 40 ml.

### **5.9.4 Inoculación y tratamiento de la carne molida de pollo**

Para este procedimiento, se realizó la metodología descrita por Bhaduri and Cottrell (2004) con algunas modificaciones:

De las 40 bolsas con carne preparadas anteriormente se separaron en lotes de 10 para los tratamientos de la tabla 4. El primer lote no recibe tratamiento alguno, esto con el objetivo de determinar la presencia de microflora acompañante en la carne.

Posteriormente cada bolsa de los tres lotes restantes fue inoculada con 1 ml de la cepa respectiva (ya sea *C. jejuni* o *Salmonella* spp, resultando una concentración aproximada de  $10^7$  UFC/g) y se homogenizó manualmente por 1 minuto. Posteriormente se separaron en tres lotes de 10, para los diferentes tratamientos. El primer lote correspondió a la carne inoculada sin ningún tratamiento.

Al segundo lote (que correspondieron al extracto con la cepa), se agregó el volumen de extracto necesario (p/v) para que en 10g de carne quedara ajustada a la concentración deseada (100% de la CMB) y después de esto se homogenizó manualmente por 1 min.

Al último lote de 10 bolsas se agregó el solvente en el cual el extracto seleccionado fue resuspendido (agua o EtOH) y se homogenizó manualmente por 1 min.

Al finalizar los tratamientos las bolsas se cerraron tratando de dejar la mínima cantidad de oxígeno posible en el caso de *C. jejuni* y se almacenaron a 4° C, realizando un conteo de células a los días 0, 1, 3, 5 y 7.

**Tabla 4.**

Tratamientos correspondientes al modelo alimenticio

<b>Tratamiento</b>	<b>Cepa (ml)</b>	<b>Extracto (ml)</b>	<b>Solvente (ml)</b>
<b>Carne Sola</b>	-	-	-
<b>Carne + Cepa</b>	1	-	-
<b>Carne + Cepa + Extracto</b>	1	Correspondiente al peso/volumen	-
<b>Carne + Cepa + Solvente</b>	1	-	Correspondiente al peso/volumen

Se realizó el mismo procedimiento para las mezclas, la única diferencia para este ensayo es que se prepararon “stocks” de las mezclas (jugo de limón:tamarindo y jugo de limón:tomillo) para un volumen final de 12 ml y se agregaron 1 ml de la mezcla a cada bolsa con 10g de carne. De la misma manera se preparó un “stock” de la mezcla de los solventes y se agregó 1 ml a la carne (etanol:etanol para la mezcla jugo de limón:tamarindo y el etanol:agua, correspondiente a la mezcla jugo de limón:tomillo) (Tabla 5).

**Tabla 5.**

Tratamientos correspondientes al modelo alimenticio con las mezclas de los extractos probados (jugo delimón:tamarindo y jugo delimón:tomillo)

<b>Tratamiento</b>	<b>Cepa (ml)</b>	<b>Stock Mezclas (ml)</b>	<b>Mezcla Solventes (ml)</b>
<b>Carne Sola</b>	-	-	-
<b>Carne + Ceba</b>	1	-	-
<b>Carne + Ceba + Extracto</b>	1	1	-
<b>Carne + Ceba + Solvente</b>	1	-	1

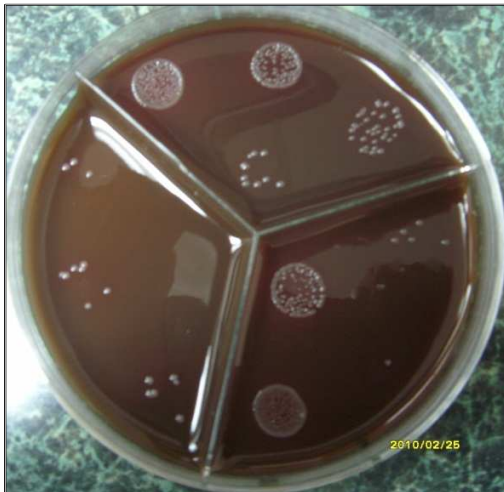
#### **5.9.5 Sobrevivencia de *C. jejuni*, *S. Typhi* y *S. Typhimurium* en la carne molida de pollo.**

A todos los tratamientos anteriores al día 0, 1, 3, 5 y 7 de incubación a 4° C se les agregaron 90 ml de agua peptonada al 0.1 % homogenizándose perfectamente. Se tomaron 200 µl del homogenizado y se realizaron hasta 6 diluciones decimales seriadas en tubos con solución salina fisiológica estéril (0.85% p/v).

De cada tubo se tomaron 25 µl y se inocularon por la técnica de goteo (Miles y Mishra) en placas de agar Brucella (Difco) con sangre hemolizada al 5% y se incubaron a 42° C por 48 h en el caso de *C. jejuni* y posteriormente se contaron las colonias

características de dicha cepa, las cuáles se observan planas, con bordes irregulares, de aspecto acuoso y de un color grisáceo (Figura 4).

Para el conteo de las cepas de *Salmonella* se repite el procedimiento anterior pero se plaqueó en agar XLD (Difco) y se incubó a 37° C por 24 h, pasado este tiempo se contaron las colonias de color transparente con o sin centro negro características de *Salmonella* (Figura 5).



**Figura 4.** Recuento celular de *C. jejuni* por medio de la técnica de goteo en agar Brucella.



**Figura 5.** Recuento celular de las cepas de *Salmonella* por medio de la técnica de goteo en agar XLD.

## **5.10 Determinación colorimétrica de grupos químicos presentes en los extractos**

A los extractos de plantas que mostraron tener actividad biológica se les realizaron ensayos químicos con las metodologías reportadas por Domínguez (1988), para determinar en forma general los grupos químicos que poseen.

### **5.10.1 Hidrocarburos insaturados**

Para determinar insaturaciones se utilizó la prueba de Bayer en donde se colocaron 2 gotas del extracto en una placa de porcelana y se agregaron 1-2ml de acetona (CTR Scientific), posteriormente se le agregó gota a gota una solución acuosa de permanganato de potasio (Fermont) al 1%. La aparición de un precipitado café indicó la presencia de hidrocarburos insaturados (Domínguez, 1988).

### **5.10.2 Saponinas**

Se colocó un mililitro del extracto concentrado en una placa de porcelana, posteriormente se agitó vigorosamente con un vórtex (5 s). La aparición de abundante espuma indicó la presencia de saponinas (Domínguez, 1988).

### **5.10.3 Flavonoides**

Para esto se utilizó la Prueba de Shinoda donde dos gotas del extracto fue mezclado con un fragmento de limadura de magnesio (CTR Scientific) y cuatro gotas de ácido clorhídrico concentrado (CTR Scientific). La prueba fue positiva cuando se presentaron

coloraciones: naranja (flavonas), roja (flavonas), roja azulosa (flavonoles) o violeta (xantanas o flavonoles) (Domínguez, 1988).

#### **5.10.4 Sesquiterpenlactonas**

Se utilizó la prueba de Legal. En este caso, se colocaron 2 gotas del extracto en una placa de porcelana, se agregaron 3 gotas de piridina (Baker) y una gota de nitroprusiato de sodio (CTR Scientific) al 0.5%. Después se añadieron gota a gota, 4 gotas de hidróxido de potasio 2N. Una coloración rosa fue indicio de lactonas  $\alpha$  y  $\beta$  insaturadas (Domínguez, 1988)

#### **5.10.5 Carbohidratos**

Se determinaron carbohidratos mediante la prueba de la Antrona. Se colocó una gota del extracto disuelto en agua con 1 gota de antrona (Fermont) al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado (EM Science) sobre una placa de porcelana. La prueba se consideró positiva al formarse un anillo-verdoso en la interfase (Domínguez, 1988).

#### **5.10.6 p-benzoquinonas**

Para esta determinación se mezcló una gota del extracto sobre una placa de porcelana, con una gota de solución etanólica al 0.2% de p-nitrofenilacetnitrilo (ALFA AESAR) y 1 gota de hidróxido de sodio al 0.1 N (CTR Scientific). La prueba fue positiva al observarse una coloración azul o violeta (Domínguez, 1988).



### **5.10.7 Alcaloides**

Se utilizó la prueba de Dragendorff para determinar alcaloides, para lo cual se realizaron dos soluciones. La solución A se preparó mezclando 8 g de nitrato de bismuto (Fermont) con 20 ml de ácido nítrico (CTR Scientific) al 30%, y la solución B mezclando 27.2g de yoduro de potasio (Técnica química) en 50ml de agua. Se mezclaron las soluciones A y B y se dejaron reposar 24 h. Esta mezcla se filtró y se aforó a 100 ml con agua bidestilada. Se agregaron unas cuantas gotas de este reactivo a una gota de extracto que había sido previamente colocado en una placa de porcelana. La prueba fue positiva cuando se presentó un precipitado de color naranja-marrón (Domínguez, 1988).

### **5.10.8 Cumarinas**

Este compuesto se determinó con la prueba de Emerson. Se mezclaron 0.5% de carbonato de calcio (Merck), 0.9% de 4-aminoantipirina (Spectrum), 5.4% de ferrocianuro de potasio (CTR Scientific) en agua, una gota de esta mezcla se agregó a una gota del extracto sobre una placa de porcelana. La prueba fue positiva al observarse una coloración amarilla. Por otro lado, como confirmación se mezcló una gota del extracto con una gota de hidróxido de sodio (CTR Scientific) al 10% y una coloración amarilla indicó la presencia de cumarinas (Domínguez, 1988).

### **5.10.9 Aldehídos y cetonas**

Para la determinación de aldehídos y cetonas, sobre una placa de porcelana, a una gota del extracto se le agregaron 2 gotas de etanolal 96 % (DEQ) y 1 gota de 2,4-dinitrofenilhidracina (Spectrum), para lo cual se disolvió en caliente 5 gr de 2.4-

dinitrofenilhidracina en 60 ml de ácido fosfórico (CTR Scientific) al 85%, se diluyeron con 39.5 ml de etanol al 96 % y después se filtró. La presencia de un precipitado rojo indicó la presencia de carbonilos aromáticos, un precipitado naranja indicó carbonilos  $\alpha$  y  $\beta$  insaturados y/o un precipitado amarillo fue positivo para carbonilos saturados (Domínguez, 1988).

#### **5.10.10Cloruros**

Para esta determinación, en una placa de porcelana se colocó una gota del extracto y se disolvió en 3 ml de agua bidestilada, se le añadieron 2 ó 3 gotas de una solución de nitrato de plata, la cual se preparó disolviendo 10 mg de nitrato de plata (CTR Scientific) con 20 ml de agua bidestilada. La presencia de cloruros se manifestó con precipitado blanco (Domínguez, 1988).

#### **5.10.11Taninos**

En la determinación de taninos, se disolvió 1 ml de la muestra en 1 ml de agua y 1 ml de etanol (96 %) (DEQ), se añadieron dos gotas de cloruro férrico (CTR Scientific) en 5% etanol (p/v); una coloración verde oscuro o negra fue indicativo de hidroxilos fenólicos (Domínguez, 1988).

### **5.11 Análisis estadístico**

La evaluación de los experimentos *in vitro* se hicieron con tres repeticiones y por duplicado. Se realizó la determinación de la media y desviación estándar ( $\pm$  DS). Los resultados obtenidos en el modelo alimenticio se analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 17.0 mediante un Análisis de Varianza Múltiple (ANOVA) seguida de comparación de medias de Tukey.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana

Se probaron un total de 45 extractos, de los cuales 24 fueron resuspendidos en agua y 21 en etanol al 96 %. En la tabla 6 se puede observar que algunos de los extractos etanólicos resuspendidos en agua mostraron inhibición (I) como el de cáscara de piña, piña, tamarindo y tomillo para *C. jejuni*. Mientras que para ambas cepas de *Salmonella* el tomillo fue el único que presentó inhibición y los extractos de cáscara de piña, col, jícama, pimienta, piña y tamarindo sólo mostraron reducción (R) del crecimiento del microorganismo.

En cuanto a los extractos etanólicos resuspendidos en etanol se observó que los extractos de cebolla, jugo de limón y tamarindo fueron efectivos contra las tres cepas probadas presentando inhibición en su crecimiento. Mientras que el extracto de té verde, a diferencia de los anteriores sólo fue efectivo contra *C. jejuni*, al igual que el extracto de té negro resuspendido en metanol (Tabla 7).

Tabla 6.

Efecto de extractos de plantas etanólicas resuspendidos en agua, sobre el crecimiento de cepas de *Campylobacter* y *Salmonella* (cm,  $\pm$  DS).

Nombre Común	Cepa		
	<i>Salmonella Typi</i> ATCC 19430	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Campylobacter jejuni</i> NADC 5653
Ajo	NI	NI	NI
Betabel	NI	NI	NI
Brócoli	NI	NI	NI
Cáscara de Betabel	NI	NI	NI
Cáscara de Jícama	NI	NI	NI
Cáscara de Melón	NI	NI	NI
Cáscara de Papaya	NI	NI	NI
Cáscara de Piña	R (30%)	R (30%)	I $0.85 \pm 0.07$
Cáscara de Tamarindo	NI	NI	NI
Cebolla	NI	NI	NI
Cebollita	NI	NI	NI
Col	R (30%)	R (30%)	NI
Jícama	R (50%)	R(50%)	R (60%)
Jugo de Piña	NI	NI	NI
Melón	NI	NI	NI
Mostaza	NI	NI	NI
Papaya	NI	NI	NI
Pimienta	R (20%)	R(20%)	NI
Piña	R (60%)	R (60%)	I $1.05 \pm 0.10$
Rábano	NI	NI	NI
Semilla de Melón	NI	NI	NI
Semilla de Papaya	NI	NI	NI
Semilla de Tamarindo	NI	NI	NI
Tamarindo	R (70%)	R (70%)	I $0.83 \pm 0.24$
Té Negro	NI	NI	NI
Té verde	NI	NI	NI
Tomillo	I ( $1.5 \pm 0.2$ )	I( $1.8 \pm 0.1$ )	I( $1.9 \pm 0.09$ )

NI: No Inhibición, R: % de Reducción, I: Inhibición

**Tabla 7.**

Efecto de extractos de plantas etanólicos resuspendidos en etanol, sobre el crecimiento de cepas de *Campylobacter* y *Salmonella* (cm,  $\pm$  DS).

Nombre Común	Cepa		
	<i>Salmonella</i> Typi ATCC 19430	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	<i>Campylobacter jejuni</i> NADC 5653
Ajo	NI	NI	NI
Betabel	NI	NI	NI
Brócoli	NI	NI	NI
Cáscara de Betabel	NI	NI	NI
Cáscara de Jícama	NI	NI	NI
Cáscara de Melón	NI	NI	NI
Cáscara de Papaya	NI	NI	NI
Cáscara de Piña	NI	NI	NI
Cáscara de Tamarindo	NI	NI	NI
Cebolla	I (1.6 $\pm$ 0.15)	I (1.3 $\pm$ 0.16)	I (0.35 $\pm$ 0.07)
Cebolla Morada	NI	NI	NI
Cebollita	NI	NI	NI
Cilantro	NI	NI	NI
Col	NI	NI	NI
Jamaica	NI	NI	I (1.5 $\pm$ 0.21)
Jícama	NI	NI	R
Jugo de Piña	NI	NI	NI
Jugo de Limón	I (1.4 $\pm$ 0.10)	I (1.2 $\pm$ 0.27)	I (1.3 $\pm$ 0.14)
Melón	NI	NI	NI
Mostaza	NI	NI	NI
Papaya	NI	NI	NI
Pimienta	NI	NI	NI
Pimiento Morrón	NI	NI	NI
Piña	NI	NI	NI
Rábano	NI	NI	NI
Semilla de Melón	NI	NI	NI
Semilla de Papaya	NI	NI	NI
Semilla de Tamarindo	NI	NI	NI
Tamarindo	I (1.2 $\pm$ 0.15)	I (1.4 $\pm$ 0.26)	I (1.6 $\pm$ 0.08)
Té Verde	NI	NI	I 0.68 $\pm$ 0.25
Té Negro	NI	NI	I 0.7 $\pm$ 0.12

NI: No Inhibición, R: % de Reducción, I: Inhibición

Los extractos que presentaron un halo de inhibición  $> 1\text{cm}$  de diámetro fueron seleccionados para ensayos posteriores. Estos fueron: los extractos etanólicos de jugo de limón, tamarindo y el extracto acuoso de tomillo ya que fueron los más efectivos para las tres cepas analizadas.

En el caso del extracto de piña resuspendido en agua se observó una reducción (R) de aproximadamente el 40 % del crecimiento bacteriano de ambas cepas de *Salmonella*, razón por la cual se descartó, debido a que en este trabajo se buscaba que el mismo extracto fuera efectivo contra las tres cepas.

Por lo tanto los extractos seleccionados para realizar la CMB fueron los extractos de jugo de limón, tamarindo, y tomillo.

Sin embargo antes de determinar la CMB, probamos el efecto de diferentes concentraciones de etanol en los extractos de jugo de limón y tamarindo sobre el crecimiento de las bacterias con la finalidad de agregarlo al alimento, encontrando que la concentración de etanol no alteró el efecto antibacteriano del extracto.

## **6.2 Determinación de Concentración Mínima Bactericida (CMB).**

De los extractos anteriores, se seleccionaron el de jugo de limón, tamarindo y tomillo y se les determinó la CMB para las tres cepas de estudio.

Las CMBs obtenidas de los extractos oscilaron entre 2 y 5 mg/ml dependiendo de la cepa y el extracto, sin embargo se observó que la CMB del tamarindo contra las cepas de *Salmonella* sobrepasó por mucho estos valores, siendo de 20 mg/ml (Tabla 8), razón por la cual se descartó para ser probado en el modelo alimenticio.

También se determinó la CMB del producto comercial derivado de extractos cítricos Citrol-K-Ultra. Según la ficha técnica del producto se indica que bastan 0.2 mg/ml (200 ppm) para inhibir *Salmonella* lo cual coincide con nuestros resultados. Para el caso de *C. jejuni* no está determinada la CMB en la ficha técnica, sin embargo la obtenida por nosotros (0.019 ppm) es mucho menor a la determinada para *Salmonella* (Tabla 8)

**Tabla 8.**

Concentración mínima bactericida de extractos seleccionados con actividad antimicrobiana ( $\pm 0.5$  DS)

Extracto	Cepa		
	<i>Salmonella Typhi</i> ATCC 19430	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Campylobacter jejuni</i> NADC(5653)
Jugo de Limón	4 mg/ ml	3 mg/ ml	2 mg/ ml
Tamarindo	20 mg/ ml	20 mg/ ml	3 mg/ ml
Tomillo	5 mg/ ml	5 mg/ ml	3 mg/ ml
Citrol K Ultra	0.2 mg/ml	0.2 mg/ml	0.000019 mg/ml



### 6.3 Determinación de combinaciones efectivas de los extractos

Las mezclas de extractos probadas contra *C. jejuni* mostraron varios puntos de CFB con valores  $<1$ , los cuáles según la literatura indicaron la existencia de efecto sinérgico de los extractos (López-Malo *et al*, 2005b).

Sin embargo se observó que el extracto de jugo de limón:tomillo tiene más combinaciones efectivas contra las cepas (Tabla 9) que la mezcla del extracto de jugo de limón:tamarindo (Tabla 10).

Lo contrario ocurrió cuando probamos las mismas mezclas de extractos contra *Salmonella* ya que los CFB encontrados fueron  $\geq 1$  lo que refirió existencia de antagonismo (López-Malo *et al*, 2005).

**Tabla 9.**

Concentración Fraccionada Bactericida (CFB) obtenidas en la mezcla del extractos de jugo delimón más tomillo contra *C. jejuni* NADC 5653.

		<b>TOMILLO</b>								
<b>LIMÓN (JUGO)</b>	<b>CMB</b>	<b>%</b>	<b>0,75%</b>	<b>1,5%</b>	<b>3,1%</b>	<b>6,25%</b>	<b>12,5%</b>	<b>25%</b>	<b>50%</b>	
		<b>%</b>	<b>[mg]</b>	<b>0,022</b>	<b>0,045</b>	<b>0,09</b>	<b>0,187</b>	<b>0,375</b>	<b>0,75</b>	<b>1,5</b>
	<b>50%</b>	<b>2</b>	NE	0,5156	0,531	0,5625	0,625	0,75	1	
	<b>25%</b>	<b>1</b>	NE	0,2656	0,281	0,312	0,375	0,5	0,75	
	<b>12,5%</b>	<b>0,5</b>	NE	NE	NE	NE	NE	0,3750	0,625	
	<b>6,25%</b>	<b>0,25</b>	NE	NE	NE	NE	NE	0,3125	0,5625	
	<b>3,1%</b>	<b>0,125</b>	NE	NE	NE	NE	NE	0,2812	0,5312	
	<b>1,5%</b>	<b>0,0625</b>	NE	NE	NE	NE	NE	0,2656	0,5156	
	<b>0,75%</b>	<b>0,0312</b>	NE	NE	NE	NE	NE	0,2578	0,5078	

NE: Mezcla No Efectiva para inhibir el crecimiento de *C. jejuni*

En la tabla anterior se puede observar que hay 21 mezclas posibles del jugo delimón:tomillo con efecto sinérgico contra *C. jejuni* mientras que para la mezcla de tamarindo:jugo delimón (Tabla 10) solo se observaron 8 mezclas con efecto sinérgico.

Tabla 10.

Concentración Fraccionada Bactericida (CFB) obtenidas en la mezcla de los extractos de jugo delimón más tamarindo contra *C. jejuni* NADC 5653

		TAMARINDO								
LIMÓN (JUGO)	CMB	%	0,75%	1,5%	3,1%	6,25%	12,5%	25%	50%	
		%	[mg]	0,022	0,045	0,09	0,187	0,375	0,75	1,5
	50%	2	0,5076	0,515	0,53	0,562	0,625	0,75	1	
	25%	1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0,75	
	12,5%	0,5	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0,625	
	6,25%	0,25	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	
	3,1%	0,125	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	
	1,5%	0,063	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	
	0,75%	0,031	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	

NE: Mezcla No Efectiva para inhibir el crecimiento de *C. jejuni*

De acuerdo a los resultados anteriores, para los ensayos en el modelo alimenticio se seleccionaron la mezcla tomillo:jugo delimón (25 %: 0.75 % CMB) y la mezcla tamarindo:jugo delimón (0.75 %:50 % CMB).

#### 6.4 Efecto de extractos de plantas contra el crecimiento de *Salmonella* y

##### *Campylobacter* en carne molida de pollo

Con el objetivo de probar la actividad antibacteriana de las mezclas obtenidas en el ensayo *in vitro*, se seleccionaron las que presentaron un FIC menor con la finalidad de saber si dichas concentraciones ejercían un efecto antibacteriano en el alimento,

inoculado previamente. Para lo cual, se aplicaron diferentes tratamientos a la carne, los cuáles fueron: 1) carne inoculada únicamente con *C. jejuni* para monitorear la sobrevivencia durante su almacenamiento a 4°C, 2) carne inoculada con *C. jejuni* expuesta al extracto (o sus mezclas) por 7 días a 4°C y ver el efecto antibacteriano del extracto y 3) la carne inoculada expuesta al solvente (EtOH 40 y 50 %, o agua), éste último para verificar que el solvente no tuviera algún efecto antibacteriano.

Al aplicar las mezclas seleccionadas en la carne molida de pollo inoculada artificialmente con *C. jejuni* no se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en la reducción de la población con respecto a los diferentes tratamientos, por lo que se probó el efecto antibacteriano de los extractos de tomillo, tamarindo y jugo de limón aplicados de manera individual.

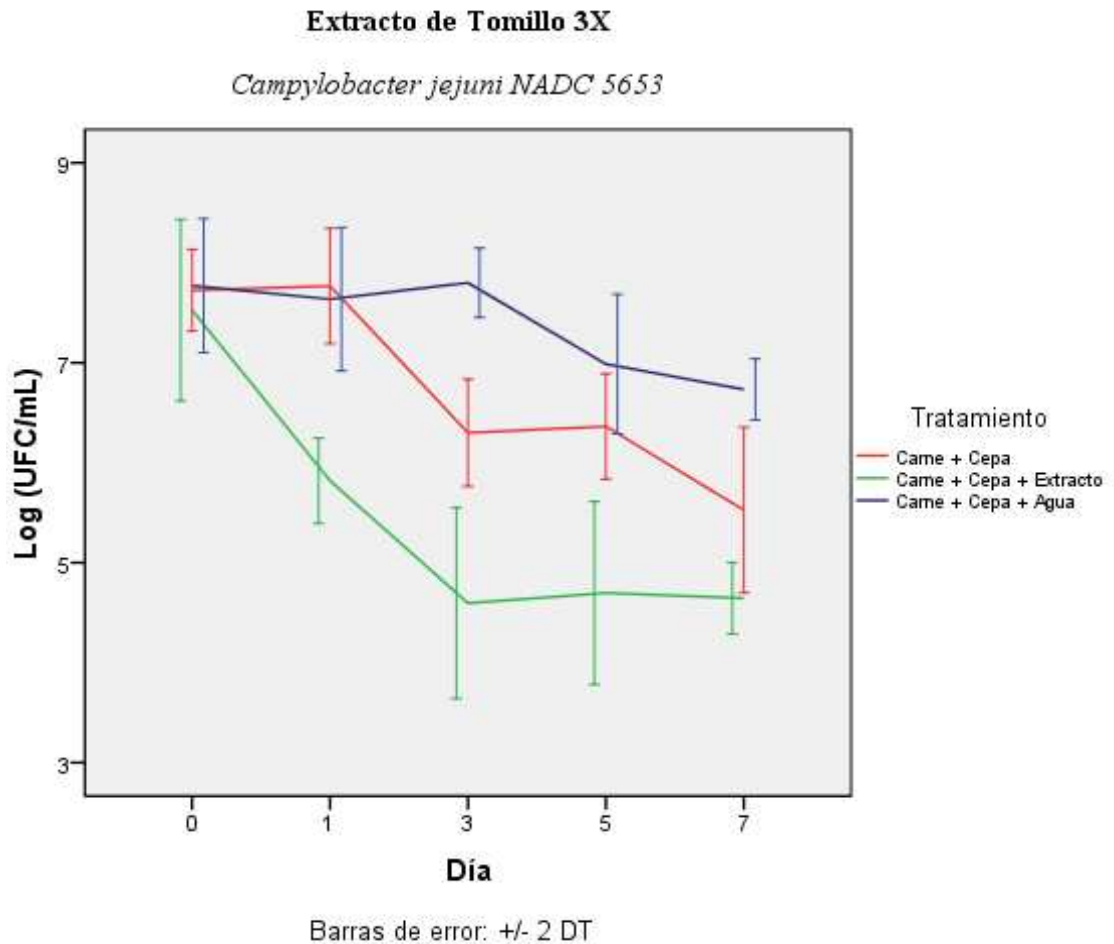
Primeramente se probó el efecto de los extractos a la concentración de 1X de la CMB en el alimento, sin embargo esta concentración no afectó la sobrevivencia de las tres cepas, por lo que se probó el extracto a mayor concentración (3X) ya que en un estudio realizado por Pandit and Shelef (1994) observaron que el efecto antibacteriano del extracto de romero sobre *Listeria monocitogenes* dependía de la concentración.

Al probar el efecto del extracto de tomillo a una concentración de 3X agregado a la carne molida de pollo inoculada con *C. jejuni* (Figura 6) se observó que sí existía diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la reducción (de 3.5 log UFC/ml) de la población

bacteriana en los tres primeros días a 4°C en comparación con la carne inoculada noexpuesta al extracto y la carne inoculada tratada con agua como solvente.

Con respecto a la carne inoculada sin adición de extracto se observó que la población de *C. jejuni* disminuyó al tercer día de incubación a 4°C, esta reducción se mantuvo para el día 5, sin embargo al día 7 disminuyó aun mas. Esto probablemente es debido a que la temperatura afecta el desarrollo de *C. jejuni* (Blankenship and Craven, 1982)

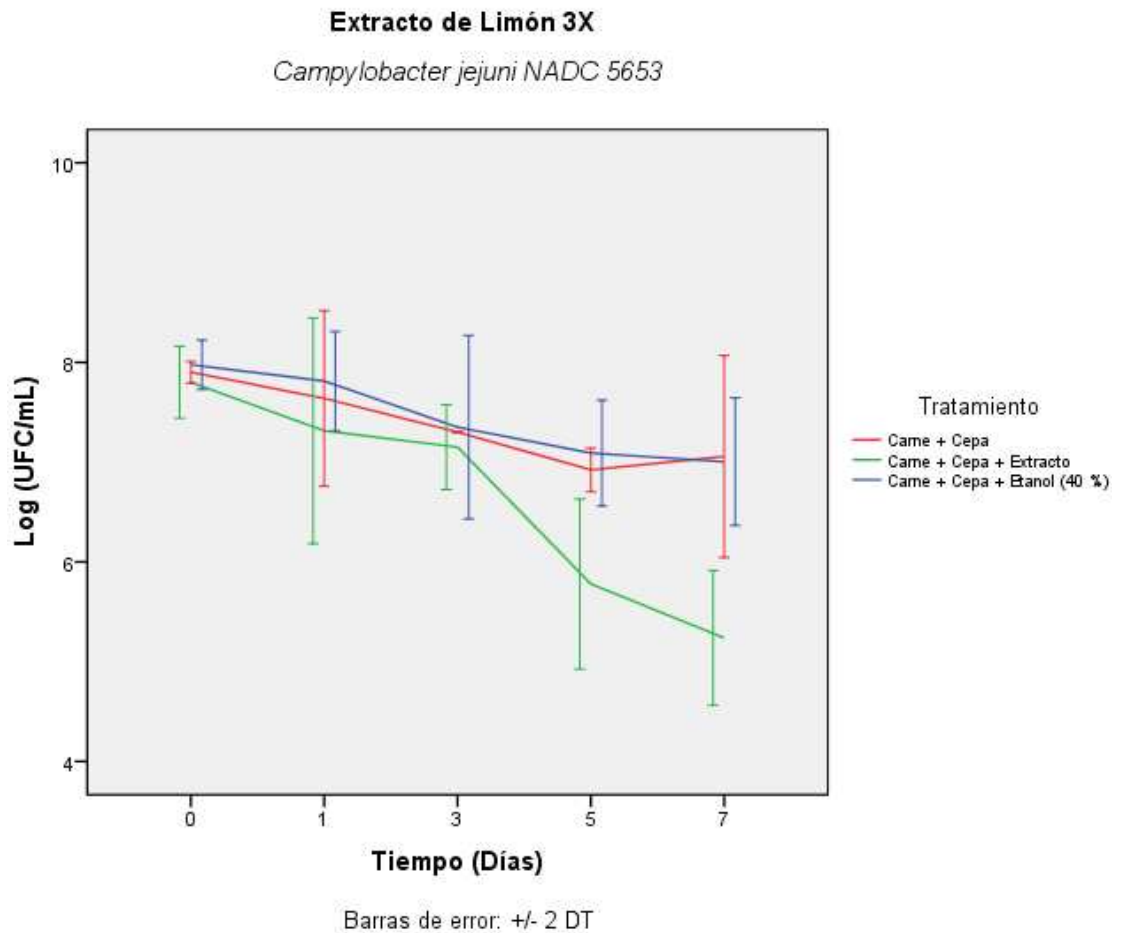
Sin embargo, aunque se presente esta tendencia, el tratamiento de la carne inoculada expuesta al extracto siguió mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la reducción de la población hasta el tercer día. Al comparar el día 5 y 7, tanto la carne inoculada tratada con el extracto y la carne inoculada sin tratar no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre ambos, por lo que se puede decir que para estos días el extracto ya perdió su efecto antimicrobiano. Por otro lado, la población de *C. jejuni* en la carne inoculada tratada con agua destilada (solvente) se mantuvo constante los primeros tres días en comparación con la carne inoculada sin tratar y posteriormente disminuyó.



**Figura 6.** Efecto del extracto de tomillo ( $DS \pm 2$ ,  $p < 0.05$ ) a una concentración de 3X aplicado a la carne molida de pollo contaminado artificialmente con *C. jejuni*. Carne + Cepa: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *C. jejuni*; Carne + Cepa + Extracto: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *C. jejuni* más la CMB del extracto de tomillo al 3X (p/v); Carne + Cepa + Agua: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *C. jejuni* más agua destilada estéril.

En el caso del extracto de jugo de limón a la concentración de 3X (Figura 7), se observó que durante los primeros 3 días de almacenamiento a 4° C, no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en la reducción de la población de *C. jejuni*, ya que la carne sometida a los diferentes tratamientos, siguió la misma tendencia en la disminución de la población bacteriana.

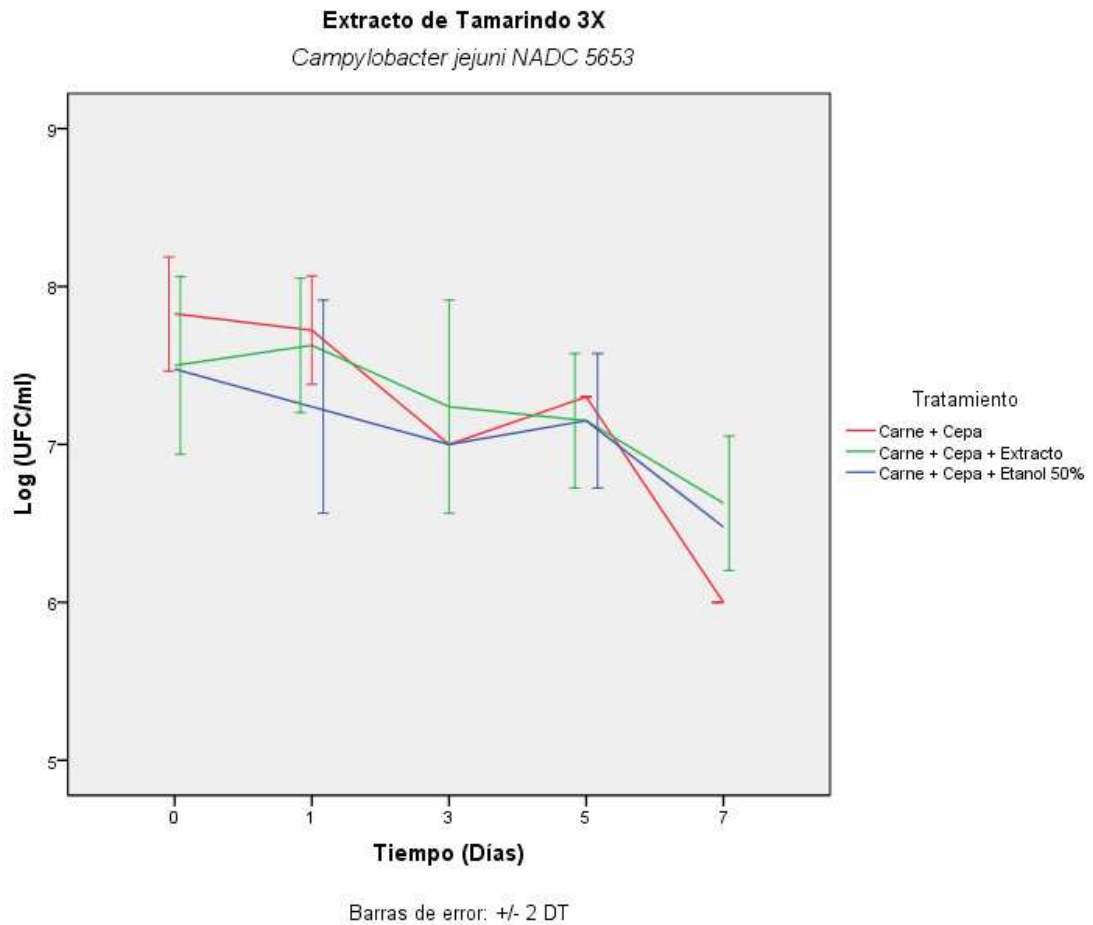
Sin embargo, se observó que a partir del 5to día de almacenamiento hubo una reducción de  $\sim 2.8$  log (UFC/ml) en la población de *C. jejuni* presente en la carne a la que se agregó extracto, en comparación con la carne a la que no se le agregó, y con la carne tratada con el solvente (EtOH al 40%), observándose que la población de estos dos últimos tratamientos permaneció casi igual en los días 5 y 7 por lo que se podría pensar que el extracto tuvo actividad antibacteriana aun para estos días de almacenamiento de la carne.



**Figura 7.** Efecto del extracto de jugo de limón ( $DS \pm 2$ ,  $p < 0.05$ ) a una concentración de 3X aplicado a la carne molida de pollo contaminado artificialmente con *C. jejuni*. Carne + Cepa: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *C. jejuni*; Carne + Cepa + Extracto: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *C. jejuni* más la CMB del extracto de jugo de limón al 3X (p/v); Carne + Cepa + Etanol (40%): Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *C. jejuni* más etanol al 40%.



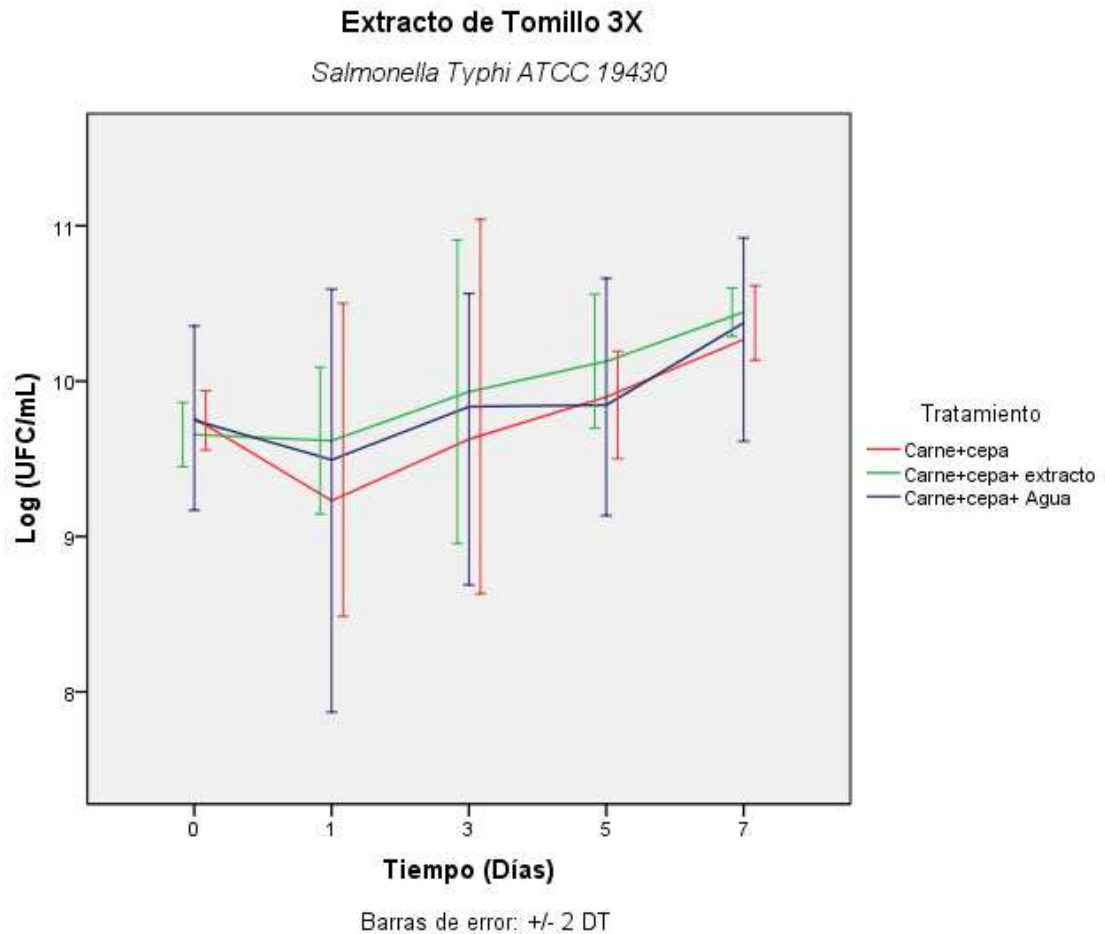
Por otro lado, la carne inoculada con *C. jejuni* expuesta al extracto de tamarindo no presentó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en la reducción de la población con respecto a la carne que no fue tratada ni con la que tenía el solvente (EtOH 50%) (Figura 8).



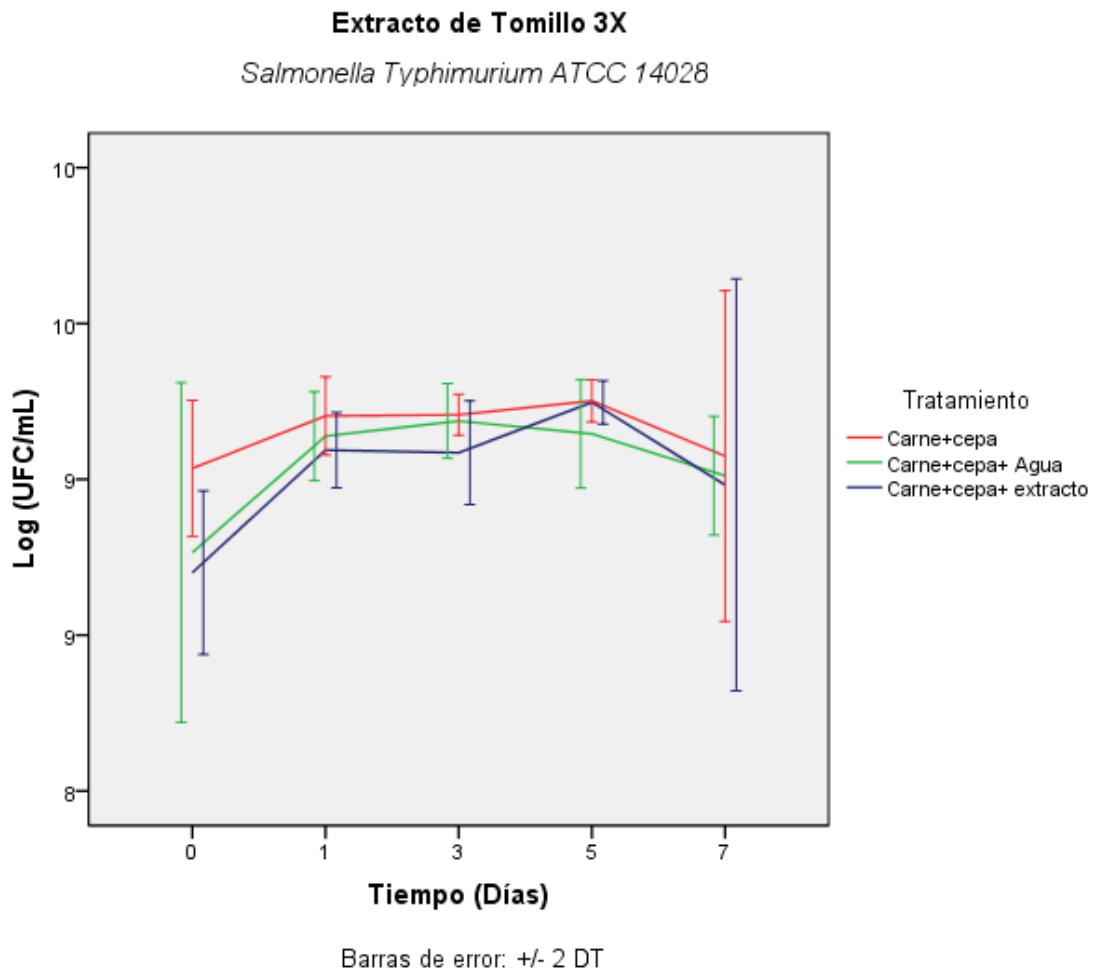
**Figura 8.** Efecto del extracto de tamarindo ( $DS \pm 2$ ,  $p > 0.05$ ) a una concentración de 3X aplicado a la carne molida de pollo contaminado artificialmente con *C. jejuni*. Carne + Cepa: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *C. jejuni*; Carne + Cepa + Extracto: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *C. jejuni* más la CMB del extracto de tamarindo al 3X (p/v); Carne + Cepa + Etanol (50%): Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *C. jejuni* más etanol al 50%.

Debido a que el extracto de tomillo fue el más efectivo contra el crecimiento de *C. jejuni* inoculada en la carne molida de pollo durante los primeros 5 días, se probó el efecto del mismo contra *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Typhimurium inoculados a una concentración de  $10^9$  UFC/ml.

El análisis estadístico indicó que no existió diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en la reducción de la población de *Salmonella* entre los diferentes tratamientos usando el extracto de tomillo (Fig 9 y 10).



**Figura 9.** Efecto del extracto de tomillo ( $DS \pm 2$ ,  $p > 0.05$ ) a una concentración de 3X aplicado a la carne molida de pollo contaminada artificialmente *S. Typhi*. Carne + Ceba: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *S. Typhi*; Carne + Ceba + Extracto: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *S. Typhi* más la CMB del extracto de tomillo 3X (p/v); Carne + Ceba + agua: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *S. Typhi* más agua destilada estéril.



**Figura 10.** Efecto del extracto de tomillo ( $DS \pm 2$ ,  $p > 0.05$ ) a una concentración de 3X aplicado a la carne molida de pollo contaminado artificialmente con *S. Typhimurium*. Carne + Cepa: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *S. Typhimurium*; Carne + Cepa + Extracto: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *S. Typhimurium* más el triple de la concentración de CMB de extracto de tomillo (p/v); Carne + Cepa + agua: Carne molida de pollo inoculada artificialmente con 1ml de *S. Typhimurium* más agua destilada estéril.

### **6.5 Determinación colorimétrica de grupos químicos presentes en los extractos de plantas activos.**

Se determinó la presencia grupos químicos que pudieran estar involucrados en la actividad antimicrobiana del extracto de tomillo que fue el más efectivo en el modelo alimenticio obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 11.

**Tabla 11.**

Caracterización parcial de compuestos químicos presentes en el extracto de tomillo.

<b>Compuesto</b>	<b>Extracto de Tomillo</b>	<b>Extracto de Jugo de Limón</b>
Hidrocarburos	-	+
Saponinas	-	-
Flavonoides	+	+
Sesquiterpenlactonas	+	+
Carbohidratos	+	-
p-benzoquinona	+	-
Alcaloides	+	+
Cumarinas	+	-
Aldehídos y Cetonas	+	+
Cloruros	-	+
Taninos	+	+

+: Presencia del compuesto, -: Ausencia del compuesto

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se probó el efecto antimicrobiano de 45 extractos contra *C. jejuni* y *Salmonella* spp, de los cuales el de cebolla, jugo de limón, tamarindo y tomillo fueron los que presentaron halos de inhibición entre 1.2 a 1.9 cm de diámetro contra estos patógenos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Hammer *et al*(1999) quienes probaron el efecto antibacteriano del extracto de tomillo y jugo de limón contra microorganismos como *S. Typhimurium*, *E.coli*, *K. pnemoniae*, *S. aureus*, *S. paratyphi*, *S. flexnerii*, *S. faecalis* y *Citrobacter* spp. Obteniendo halos de inhibición similares a los obtenidos en este estudio en el caso de *Salmonella*(Hammer *et al*, 1999)

El efecto antimicrobiano del tomillo ha sido muy estudiado y se ha visto que el timol (componente del tomillo) es capaz de desintegrar la membrana externa de *Salmonella* liberando lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplásmica. Diferentes autores infieren que el timol se une a las proteínas de membrana hidrofóbicamente por medio de enlaces de hidrógeno cambiando la permeabilidad de la misma, otorgándole así su capacidad antimicrobiana (Lambert *et al*, 2001).

Al probar la actividad antimicrobiana de otros extractos como el ajo y la cebolla, se pudo observar que a primera instancia fueron efectivos contra las bacterias usadas en este estudio, sin embargo, al preparar nuevo extracto, ya no se observó la actividad que presentaron el principio, lo cual pudiera deberse a que la composición de los extractos de plantas varía de acuerdo a diferentes condiciones como el clima o la fecha de colecta de las mismas (Janssen *et al*, 1987).

Es importante mencionar que cualquier parte de la planta puede contener compuestos activos que tengan capacidad antimicrobiana. En el caso del extracto de tamarindo, cuando se analizó la actividad antimicrobiana de los diferentes componentes del mismo como la pulpa y la semilla, se obtuvieron fracciones solubles en diferentes solventes como agua (en el caso de la semilla y la pulpa) y etanol (pulpa). A partir de allí se observó que el extracto de semilla no tuvo efecto sobre el crecimiento de *C. jejuni*, *S. Typhi* y *S. Typhimurium*, mientras que el extracto de pulpa resuspendido en etanol presentaron halos de inhibición de 1.2 a 1.6 cm de diámetro para las tres cepas.

Este resultado es de gran importancia ya que son pocos los microorganismos en los cuáles se haya probado el efecto antimicrobiano del tamarindo, por ejemplo Lazcano *et al* (2005) observaron el mismo comportamiento de actividad del extracto acuoso y etanólico sobre *Candida albicans* y *E. coli*, siendo más efectivo el extracto etanólico sobre *E. coli* presentando halos de inhibición de 1.4 cm de diámetro.



El mecanismo de acción que proponen Lazcano *et al* (2005) para el extracto de tamarindo es el daño a la pared celular de la bacteria provocando cambios morfológicos en la misma afectando su viabilidad, ya que en dicho estudio, observaron estos cambios en la membrana de *E. coli* y que al comparar los halos de inhibición con el efecto de algunos antibióticos, el halo es muy similar al que presentan los  $\beta$ -lactámicos ampicilina y cefalotina, que afectan la pared celular provocándole cambios morfológicos (Lazcano *et al*, 2005).

Con ello, nuestros resultados dan la pauta para análisis posteriores ya que sería interesante ver si el extracto de tamarindo además de tener efecto antimicrobiano contra *C. jejuni*, *S. Typhi* *S. Typhimurium* pueden alterar la membrana celular y definir el mecanismo de acción del extracto.

La CMB obtenida de los diferentes extractos varió entre 2 a 30 mg/ml dependiendo de la cepa, estas variaciones dependen en gran parte de la composición de la planta así como del microorganismo contra el que se prueba. Se ha reportado que para el limón en el caso de *C. jejuni/coli* es de 2mg/ml y para *Salmonella* es de entre 4-8 mg/ml los cuáles concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio (López-Malo *et al*, 2005; Valtierra-Rodríguez *et al*, 2010).

Posteriormente, al realizar las mezclas de los extractos y probarlos contra las cepas de *Salmonella* y *C. jejuni* y determinar su efectose observó que la mezcla de extracto de jugo de limón con tamarindo presentó efecto sinérgico en menos combinaciones que las observadas con la mezcla de extracto de jugo de limón y tomillo contra *C. jejuni*, lo que sugiere que esta última combinación es más efectiva contra dicha bacteria. Este efecto es similar a un estudio realizado por Ettayebi *et al* (2000), donde encontraron que la combinación de nisina y timol (compuesto obtenido del tomillo) son más efectivas en menor concentración cuando son usadas en combinación que por sí solos (Ettayebi *et al*, 2000).

Sin embargo, es difícil comparar los resultados obtenidos debido a los diferentes métodos para desarrollar las mezclas y la manera en la que se interpretan, ya que muchos investigadores difieren de los resultados obtenidos con los diferentes métodos que existen (Smith-Palmer *et al* 1998; Ettayebi *et al*, 2000; Delaquis *et al*, 2002).

En este caso se usó el método del tablero por microdilución el cual se ha reportado ser eficaz para la determinación de actividad de las mezclas pudiendo determinar todos los efectos de la combinación, como aditividad, sinergismo, indiferencia y/o antagonismo, además del grado del efecto mostrado mediante la cuantificación de los resultados (Rui-Song *et al*, 2009). Tal es el caso de este trabajo donde determinamos las CFB, que mostraron que una mezcla de 50% del extracto de jugo de limón con el 50% de la CMB del extracto de tomillo provocó aditividad, lo que significó que no es

necesaria la presencia de un extracto u otro para que haya efecto antimicrobiano. Para la mezcla de tomillo:jugo de limón (25%:0.75% CMB) presentó un efecto sinérgico, de la misma manera que una mezcla de extracto tamarindo:jugode limón (0.75%:50% CMB).

Cuando estas mezclas fueron aplicadas a la carne molida de pollo inoculada artificialmente con *C. jejuni*, no se observó efecto alguno. Esto pudiera ser debido a que existen diferentes factores que pueden alterar dicha actividad, entre las que se encuentran: las condiciones en que se realiza la mezcla, el modelo alimenticio, las concentraciones de cada extracto usado en la combinación y la cepa bacteriana (López-Malo *et al*, 2005b).

Al probar los extractos individualmente de jugo de limón, tamarindo y tomillo a la CMB obtenida en la carne molida, no se observó disminución en la población bacteriana de *C. jejuni*, por lo que se evaluó el efecto de dichos extractos a una concentración 3X, ya que hay reportes que indican que se necesitan concentraciones mayores de extractos naturales que las determinadas por la CMB para inhibir el crecimiento de patógenos ya en alimentos. Dichas concentraciones varían y se ha reportado que la concentración pudiera ser hasta 10 veces mayor a la reportada *in vitro* (Pandit and Shelef, 1994; Shelef *et al*, 1984; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010).

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios en el caso del extracto de tomillo el cuál a una concentración de 9 mg/ml disminuyó aproximadamente 3.5 log UFC/ml de *C. jejuni* durante los primeros 5 días a 4° C, mientras que en el caso del extracto de jugo de limón a 6mg/ml, se observó una reducción de ~2.8 log UFC/ml en el día 5 y 7 a 4° C. Estas diferencias en la actividad de los extractos, pudiera ser debido a: 1) la complejidad del modelo alimenticio probado, en este caso la estructura de la carne molida de pollo debido a que probablemente no va a estar en contacto directo con la cepa, y 2) las propiedades del extracto usado en el extracto usado como la solubilidad o pH que pueden alteran su actividad una vez probado en el modelo alimenticio (Ismail and Pierson, 1990; Birk *et al*, 2010).

En el caso del extracto de tomillo al ser soluble en agua, su actividad se pudo haber visto favorecida ya que al agregarlo a la carne fue más fácil homogenizar la mezcla asegurándose que el extracto estuviera en contacto con la cepa, por lo que se podría pensar en usar el extracto de tomillo como aditivo a la carne molida de pollo para asegurar la calidad microbiológica del mismo con respecto a *C. jejuni*. Sin embargo, existen ciertas regulaciones para el uso de este compuesto en alimentos, principalmente el timol el cual está presente en el extracto de tomillo. De acuerdo a la Legislación Europea se permite el uso de timol purificado como saborizante en productos alimenticios cuyo límite permisible es de 0.05 mg/g (Falcone *et al*, 2007), que es una concentración mucho menor a la obtenida en este estudio con el extracto crudo, por lo que se hacen necesarios más estudios antes de pensar en agregarlo al alimento. Además

es importante obtener un extracto que no afecte las características organolépticas del alimento en cuestión.

Por otro lado, el pH del extracto de jugo de limón fue de 2.3 al agregarlo a la carne modificó la estructura de la misma dando la apariencia de carne “cocida”, lo que pudo haber ocasionado que el extracto no quedara completamente homogéneo y por eso se observara un efecto retardado en la actividad del mismo.

Al probar la actividad antimicrobiana en la carne molida de pollo con el extracto de tamarindo al 3X de la CMB, no se observó disminución en las cuentas de *C. jejuni* durante los 7 días de almacenamiento a 4° C. Esto pudiera estar relacionado con el hecho de que las concentraciones usadas del extracto crudo no fueron lo suficientemente efectivas como para observar actividad antibacteriana, esto en relación a un estudio que realizó Overet *al* (2009) en el cual se probó el efecto antimicrobiano del extracto de tamarindo aplicado a una concentración de 4X en pechuga de pollo contaminada con *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S Typhimurium* en comparación con la concentración de 37.5 mM obtenidas *in vitro* presentando esta concentración la reducción de entre 2 a 5 log UFC/ml. (Overet *al*, 2009).

Finalmente, al realizar las pruebas colorimétricas para la determinación de compuestos químicos presentes en los extractos se observó la presencia de taninos,

cumarinas, flavonoides, quinonas, alcaloides y sesquiterpenlactonas. Estos compuestos ya se han relacionado con la actividad antimicrobiana de algunos productos naturales (Cowan, 1999), por lo que la actividad antibacteriana observada *in vitro* como *in vivo* en este estudio pudiera estar asociada a la presencia de dichos compuestos en los extractos seleccionados.

Sin embargo a pesar de que los resultados obtenidos fueron satisfactorios en el caso del extracto de tomillo, aún quedan más estudios por realizar antes de agregarlo al alimento, ya sea realizando mezclas con otros extractos, probar el compuesto activo purificado, revisar que no se modifiquen las propiedades organolépticas del mismo entre otros factores que se ha visto pueden modificar la actividad del extracto. Quedando este trabajo como antecedente para futuras investigaciones.

Cabe mencionar que un hallazgo de este trabajo es que el extracto de tamarindo se probó contra *C. jejuni*, *S. Typhi* y *S. Typhimurium* y se obtuvieron resultados que pudieran dar pauta a trabajos posteriores debido a que dicho extracto no ha sido del todo estudiado.

En resumen el uso de extractos de plantas comestibles *in vivo* e *in vitro* poseen actividad antimicrobiana contra *Campylobacter jejuni* y *Salmonella* spp, mientras que

las mezclas de los extractos solamente poseen únicamente actividad antibacteriana *in vitro* contra dichas cepas.

Lo anterior es de gran importancia debido a que *Salmonella* y *C. jejuni* hoy en día son dos de los patógenos más importantes transmitidos por alimentos, lo que ha llevado a que se realicen investigaciones como ésta, que pudieran funcionar como tratamiento alternativo para el control de dichos microorganismos en alimentos como la carne molida de pollo la cual se puede contaminar durante su proceso de manufactura y/o empaque.

## 8. CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de jugo de limón y tamarindo y el extracto acuoso de tomillo, presentaron actividad biológica contra las cepas de *S. Typhi*, *S. Typhimurium* y *C. jejuni* cuando fueron probados *in vitro*, así como la mezcla de jugo de limón con tamarindo (0.75 %:50 % CMB) y jugo de limón con tomillo (25%:0.75% CMB) que presentaron efecto sinérgico contra *C. jejuni*.

Cuando las mezclas fueron probadas en el modelo alimenticio, no se observó actividad antibacteriana para ninguna de las cepas probadas.

Al probar los extractos solos en la carne molida de pollo, el extracto de tomillo fue el único que presentó reducción de la población de *C. jejuni* inoculada artificialmente por ~ 3.5 log UFC/ml. Mientras que para ambas cepas de *Salmonella* el extracto de tomillo no presentó disminución de la población.



La determinación colorimétrica de compuestos químicos del extracto de tomillo, reveló la presencia de flavonoides, sesquiterpenlactonas, carbohidratos, p-benzoquinonas, alcaloides, cumarinas, aldehídos y cetonas y taninos.

En el caso del jugo de limón se observó la presencia de hidrocarburos, flavonoides, sesquiterpenlactonas, alcaloides, aldehídos y cetonas, cloruros y taninos.

## LITERATURA CITADA

Adame J, Adame H. 2000. Plantas curativas del Noreste Mexicano. Editorial Castillo: México. pp. 386.

Adhikari B, J. H. Connolly, P. Madie, and P. R. Davies. 2004. Prevalence and clonal diversity of *Campylobacter jejuni* from dairy farms and urban sources. New Zealand Vet. J. 52:378–383

Alarcón G. 2002. Actividad de extractos de plantas en el crecimiento, producción de toxina y unión en *Vibrio cholerae*. Tesis (Maestría) FCB, UANL

Allos B. M, Moore M. R, Griffin M. P, and Tauxe R. V. 2004. Surveillance for sporadic foodborne disease in the 21<sup>st</sup> century: the foodnet perspective. CID 38(3):S115-20

Althouse C, S. Patterson, P. Fedorka-Cray, and R. E. Isaacson. 2003. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. Infect Immun. 71:6446–6452.

Arora D.S, and Kaur J. 1999. Antimicrobial activity of spices. Int J Antimicrob Agents. 12(3):257-62.

Arthur M. H, R. Newsome, and Fred Shank. 2002. IFT Expert Report on Emerging Microbiological Food Safety Issues Implications for Control in the 21st Century. Disponible en: <http://www.ift.org/knowledge-center/read-ift-publications/science-reports/expert-reports/emerging-microbiological-food-safety-issues.aspx?page=viewall>  
Accesado el 25 de febrero del 2010.

Batish D, Singh H, Kohli R, and Kaur S. 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecol. Manage.* 256:12:2166-2174.

Baumler A. J, R. M. Tsois, F. A. Bowe, J. G. Kusters, S. Hoffmann, and F. Heffron. 1996a. The pef fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect. Immun.* 64:61–68.

Baumler A. J, R. M. Tsois, and F. Heffron. 1996b. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. *Infect. Immun.* 64:1862-1865.

Bender J, Smith K, Hedberg C, and Osterholm M. 1999. Foodborne disease in the 21st century. What challenges await us? *Postgrad. Med.* 106: 109–112, 115–116, 119.

Berberian, L. S, Y. Valles-Ayoub, L. K. Gordon, S. R. Targan, and J. Braun. 1994. Expression of a novel autoantibody defined by the VH3-15 gene in inflammatory bowel disease and *Campylobacter jejuni* enterocolitis. *J. Immunol.* 153:3756–3763.

Bhaduri Saumya and Cotrell Bryan. 2004. Survival of Cold-Stressed *Campylobacter jejuni* on ground chicken and chicken skin during frozen storage. *App and Env Microbiol.* 70(12):7103-7109.

Birk T, A. C. Gronlund, B. B. Christensen, S. Knochel, K. Lohse and H. Rosenquist. 2010. Effect of organic acids and marination ingredients on the survival of *Campylobacter jejuni* on meat. *J of Food Prot.* 73:2:258-265.

Black R. and Lanata C. 1995. Epidemiology of diarrheal diseases in developing countries. In *Infections of the Gastrointestinal Tract* (Blaser, M. J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., Greenberg, H. B. & Guerrant, R. L., eds.), pp. 13-36. Raven Press, New York.

Black, R. E, M.M. Levine, M. L. Clements, T. P. Hughes, and M. J. Blaser. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.* 157:472–479.

Blankenship L. C and Craven S. E. 1982. *Campylobacter jejuni* survival in chicken meat as a function of temperature. *App Env Microbiol* 44:1:88-92.

Boes J, L. Nersting, E. M. Nielsen, S. Kranker, C. Ene, H. C. Wachmann, and D. L. Aggesen. 2005. Prevalence and diversity of *Campylobacter jejuni* in pig herds on farms with and without cattle or poultry. *J Food Prot.* 68:722–727.

Bowles, B. L, and A. J. Miller. 1993. Antibotulinal properties of selected aromatic and aliphatic aldehydes. *J Food Prot.* 56:788–794.

Brandi G, Amagliani G, Schiavano G, De Santi M, Sisti M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *J Food Prot.* 69:(9):2274-9.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Int J Food Microbiol.* 94:223-253.

Cao G, C. P. Verdon, A. H. B. Wu, H. Wang, and R. L. Prior. 1995. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clin Chem.* 41:1738–1744.

Cawthraw S. A, L. Lind, B. Kaijser, and D. G. Newell. 2000. Antibodies, directed towards *Campylobacter jejuni* antigens, in sera from poultry abattoir workers. *Clin. Exp. Immunol.* 122:55–60.

Cawthraw S. A, R. A. Feldman, A. R. Sayers, and D. G. Newell. 2002. Long-term antibody responses following human infection with *Campylobacter jejuni*. *Clin. Exp. Immunol.* 130:101-106.

CDC. 2010. Morbidity and mortality weekly report. Preliminary foodnet data on incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food 10 states, 2009. April 16, 2010. Vol. 59. No. 14 pages 418-422.

Cho W. I, Choi J. B. Lee K, Chung M. S, and Pyun Y. R. 2008. Antimicrobial activity of torilin isolated from *Torilis japonica* fruit against *Bacillus subtilis*. *J Food Sci.* 73(2): M37-M46.

Christenson B, A. Ringner, C. Blucher, H. Billaudelle, K. N. Gundtoft, G. Eriksson, and M. Bottiger. 1983. An outbreak of campylobacter enteritis among the staff of a poultry abattoir in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* 15:167–172.

Cowan Marjorie M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology.* 12(4):564-582.

Cox N. A, D. Burdick, J. S. Bailey, and J. E. Thomson. 1986. Effect of the steam conditioning and pelleting process on the microbiology and quality of commercial-type poultry feeds. *Poult. Sci.* 65:704–709.

Cox N. A, J. E. Thomson, and J. S. Bailey. 1981. Sampling of broiler carcasses for *Salmonella* with low volume water rinse. *Poult Sci.* 60:768–770.

Cox N. A, N. J. Stern, K. L. Hiett, and M. E. Berrang. 2002b. Identification of a new source of *Campylobacter* contamination in poultry: Transmission from breeder hens to broiler chickens. *Avian Dis.* 46:535–541.

Cox N. A, A. J. Mercuri, J. E. Thomson, and D. W. Gregory, Jr. 1974b. Quality of broiler carcasses as affected by hot water treatments. *Poult Sci.* 53:1566–1571.

Dabbah R, Edwards VM, and Moats WA. 1970. Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Appl Microbiol.* 19:27–31.

Darwin K. H, and V. L. Miller. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol. Rev.* 12:405–428.

Deininger R. Neves. 1984. Aus der Terpenforschung. *Excerpta phytotherapeutika. Lectures of the Medical Congress.* Berlin: Firma Klosterfrau, Koln, 24–3.

Delaquis P. J, Stanich K, Girard B, Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol* 74:101–9.

Dixon R. A, Dey P. M, and Lamb C. J. 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Adv Enzymol.* 55:1-69.

Domínguez X. A. 1988. Métodos de investigación fotoquímica. Limusa (eds). México, pp. 39-43.

Donoghue A. M, P. J. Blore, K. Cole, N. M. Loskutoff, and D. J. Donoghue. 2004. Detection of *Campylobacter* or *Salmonella* in turkey semen and the ability of poultry semen extenders to reduce their concentrations. *Poult Sci.* 83:1728–1733.

Dorman H. J. D and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J of App Microbiol.* 88:308-316.

Doyle M.P and M. C. Erickson. 2006 .Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poult. Science* 85:960-973.

Draughon F. A. 2004. Use of botanicals as biopreservatives in foods. *Food Technol.* 58:20–28.

Du W-X, C.W. Olsen, R.J. Avena-Bustillos, T.H. Mchugh, C.E. Levin, and Mendel Friedman. 2009. Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple Films on physical properties and antimicrobial activities. *J. of Food Sci.* 74:7.

Elder R. O, J. E. Keen, G. R. Siragusa, G. A. Barkocy-Gallagher, M. Koohmaraie, and W. W. Laegreid. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2999–3003.

Enache E, and Chen Y. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in cranberry juice concentrates at different °Brix levels. *J. Food Prot.* 70: 2072-2077.

Ettayebi K, Yamani J. E, and Rossy-Hassani B. 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183:191-5.

Falcone P, Speranza B, Del Nobile M. A, Corbo M. R. and Sinigaglia M. 2005. A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. *J Food Prot.* 68:1664-1670.

Farkas J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 44:189-204.

Fessenden R. J, Fessenden J. S. 1982. *Organic Chemistry*, 2nd edn. Boston, MA: Willard Grant Press, pp. 139.

Fisher K. and Phillips C.A. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J Appl Microbiol* 101(6):1232-40.

Flávia A. G, M. A. Neto, J. N. S. Bezerra, A. M. Oscarina, Viana de Sousa A. A. Fonteles-Filho, and Regine H.S.F. Vieira. 2008. Antibacterial activity of guava, (*Psidium guajava*) Linnaeus, Leaf extracts on diarrhea causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). *Rev Inst Med Trop. S. Paulo* 50(1):11-15.



Foster J. W. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptative acid tolerance response. J. Bacteriol. 173(21):6896-902.

Friedman C. R, R.M. Hoekstra, M. Samuel, R. Marcus, J. Bender, B. Shiferaw, S. Reddy, S. D. Ahuja D. L, Helfrick F, Hardnett M. C, B. Anderson, and R. V. Tauxe. 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. Clin Infect Dis. 38:S285-S296.

Friedman M, P. R. Henika, and R. E. Mandrell. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J. Food Prot. 65:1545-1560.

Galán. J. E. and H. Wolf-Watz. 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. Nature 444:567-573.

Galanis E. 2007. *Campylobacter* and bacterial gastroenteritis. Canadian Medical Association Journal. 177(6):570-571.

Garcia M. M, Lior H, Stewart R. B, Ruckerbauer G. M, Trudel J. R and Skljarevski A. 1985. Isolation, characterization, and serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from slaughter cattle. Appl Environ Microbiol. 49(3):667-72.

García S, Alarcón G, Gómez M, Heredia N. 2005. Extracts of *Haematoxylon brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. J Food Prot. 68(7):1346-51.

García M. y Uruburu F. 2000. La conservación de cepas microbianas. Act. SEM. 30: 1-8.

Garrity G.M. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition. Springer-Verlag, New York, USA.

Geboes K. 2001. Crohn's disease, ulcerative colitis or indeterminate colitis how important is it to differentiate? *Acta Gastroenterol Belg.* 64:197-200.

Gebreyes W.A, Turner M. B, Funk J. A, Altler C, and Davies P. R. 1999. *Salmonella* prevalence, serotypes and patterns of antimicrobial resistance in cohorts of nursery and finishing pigs. In "Proc. Of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork", pp. 250-251. Washington, D. C.

Geissman T. A. 1963. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds. In: Florkin M, Stotz EH (eds). *Pyrrrole Pigments, Isoprenoid Compounds and Phenolic Plant Constituents*, Vol. 9. New York: Elsevier, pp. 2653.

Gill A.O. and Holley R. A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol.* 108: 1-9.

Gould G.W. 2000a. Strategies for food preservation. Chpt. 2, In the microbiological safety and quality of food. Vol. I. ed. B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, and G.W. Gould, p. 19-35. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Md.

Gould G.W. 2000b. New and emerging physical methods of preservation. Chpt. 13, In *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol. I. ed. B.M. Lund, T.C. Baird Parker, and G.W. Gould, pp. 277-293. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Md.

Hammer H.A, C.F. Carson, and T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J of App Microbiol.* 86:985-990.

Hanninen M. L, Niskanen M and Korhonen L. 1998. Water as a reservoir for *Campylobacter jejuni* infection in cows studied by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Zentralbl Veterinarmed B* 45:37-42.

Ho K. Y, Tsai C. C, Huang J.S, Chen C. P, Lin T. C and Lin C. C. 2001. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. *J Pharm Pharmacol* 53:187-91.

Holt P.S. 2003. Molting and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection: the problem and some solutions. *Poult Sci.* 82(6):1008-10.  
[http://www.rivm.nl/carma/resultaten/ASG%20rapport%2005\\_I00113.pdf](http://www.rivm.nl/carma/resultaten/ASG%20rapport%2005_I00113.pdf) Accesado el 12 de abril del 2010.

Hwang, C. A, and L. R. Beuchat. 1995. Efficacy of selected chemicals for killing pathogenic and spoilage microorganisms on chicken skin. *J. Food Prot.* 58:19-23.

Islam M, M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner, and X. P. Jiang. 2004a. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *J Food Prot.* 67:1365–1370.

Ismaiel A. A. and M. D. Pierson. 1990. Effects of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. *J Food Prot.* 11:958-960.

Janssen A.M, Scheffer, J.J.C, and Baerheim S. A. 1987. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–86 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica* 53, 395–398.

Käferstein F. K, Y. Motarjemi, and D. W. Bettcher World Health Organization, Geneva, Switzerland Foodborne Disease Control: A Transnational Challenge, Vol. 3, No. 4, October–December 1997.

Kapperud G, J. Lassen, S. M. Ostroff, and S. Aasen. 1992. Clinical features of sporadic *Campylobacter* infections in Norway. *Scand. J. Infect. Dis.* 24:741–749.

Karatzas A. K, Bennik M. H, Smid E. J, Kets E. P. 2000. Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes scott*. *A. J. Appl. Microbiol* 89:296-301.

Katsma W. E. A, A. De Koeijer A, W. F. Jacobs-Reitsma, E.A. Egil Fischer, and J. A. Wagenaar. 2005. *Campylobacter* prevalence in broiler flocks in the Netherlands. Modeling transmission within and between flocks and efficacy of interventions. *Campylobacter Risk Management and Assessment (CARMA)*. AGS Report: ASG05/I00113. Wageningen University. Disponible en: [http://www.rivm.nl/carma/resultaten/ASG%20rapport%2005\\_I00113.pdf](http://www.rivm.nl/carma/resultaten/ASG%20rapport%2005_I00113.pdf) Accesado el 20 de Mayo del 2010.

Kemp R, A. J. H. Leatherbarrow, N. J. Williams, C. A. Hart, H. E. Clough, J. Turner, E. J. Wright, and N. P. French. 2005. Prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in environmental water samples from a 100 square kilometer predominantly dairy farming area. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1876-1882.

Ketley J.M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143:5:21.

Kim J. M, Marshall M. R, Cornell J. A, Preston J. F, Wei C. I. 1995a. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella* Typhimurium in culture medium and fish cubes. J Food Sci. 60:1364-8, 1374.

Kimura A. C, V. Reddy, R. Marcus, P. R. Cieslak, J. C. MohleBoetani, H. D. Kassenborg, S. D. Segler, F. P. Hardnett, T. Barrett, and D. L. Swerdlow. 2004. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella* enterica serotype Enteritidis infections in the United States: A case control study in FoodNet sites. Clin Infect Dis. 38:S244–S252.

King J. C, Black R. E, Doyle M. P, Fritsche K. L, Halbrook B. H, Levander O. A, Meydani S. N, Walker A. W and Woteki C. E. 2000. Foodborne Illnesses and Nutritional Status: A statement from an American society for nutritional sciences working group. American Society for Nutritional Sciences. J Nutr. 130:2613-2617.

Knodler L. A. and O. Steele-Mortimer. 2003. Taking possession: Biogenesis of the *Salmonella* containing vacuole. Traffic 4:587-599.

Kollanoor J. A, M. J. Darre, T. A. Hoagland, D. T. Schreiber, A. M. Donoghue, D. J. Donoghue, and K. Venkitanarayanan. 2008. Antibacterial Effect of Trans-Cinnamaldehyde on *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in Chicken Drinking Water. J Appl Poult. Res. 17:490–497.

Kumate J, Muñoz O, Gutierrez G, Santos J. I. 2004. “Manual de Infectología Clínica”. Décimo sexta edición, Méndez Ed. México, p 140-154.

Lambert R. J. W, Skandamis P. N, Coote P, Nychas G. J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol 91:453–62.

Lazcano H. M. A, Navarro-Cruz A. R, Dávila M. R, Ávila S. S. R, González S.F. 2005. Estudio de las propiedades antimicrobianas del tamarindo. Depto. De Bioquímica-Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Disponible en: [www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-13-2005/.../CNA30.pdf](http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-13-2005/.../CNA30.pdf) Accesado el 25 de mayo del 2010.

López-Malo A, Palou E, Parish M. E. and Davidson P. M. 2005b. Methods for activity assay and evaluation of results, in *Antimicrobials in Food*, 3rd edition P. M. Davidson, J. n. Sofos and A. L. Branen, eds, CRC Press, New York, pp 659-680.

Lostroh C. P. and C. A. Lee. 2001. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect.* 3:1281–1291.

Lowry S. and Stone. 2000. IFT Expert report on Emerging Microbiological Food Safety Issues. Implications for Control in the 21<sup>st</sup> Century. Institute of Food Biotechnologists. Disponible en: <http://www.ift.org/knowledge-center/read-ift-publications/science-reports/expert-reports/emerging-microbiological-food-safety-issues.aspx?page=viewall> Accesado el 22 de febrero del 2010.

Mandell G, Bennett J and Dolin R. 2005. “Mandell, Douglas and Bennett’s principles and practice of infectious diseases”. 6th Ed. Pennsylvania. Elsevier.

Manohar V, Ingram C, Gray J. 2001. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol Cell Biochem.* 228:111–7.

Marlovitz T. C, T. Kubori, A. Sukhan, D. R. Thomas, J. E. Galán, and V. M. Unger. 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science.* 306:1040–1042.

Mason T. L, Wasserman B. P. 1987. Inactivation of red beet betaglucan synthase by native oxidized phenolic compounds. *Phytochem.* 26:2197-202.

Mead P. S, L. Slutsker V. D, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 5:607-625.

Methner U, S. Alshabibi, and H. Meyer. 1995. Experimental oral infection of specific pathogen-free laying hens and cocks with *Salmonella* Enteritidis strains. *J. Vet. Med. Ser. B* 42:459–469.

Miles A. and Mishra S. 1932. The estimation of the bacterial power of blood. *J Hig Vol.* 38 p 732-735.

Moore J. E, Corcoran D, Dooley James S.G, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell D.A, Mégraud F, and Millar C. 2005. *Campylobacter*. *Vet Res* 36:351-382.

Morrison G. J. and G. H. Fleet. 1985. Reduction of *Salmonella* on chicken carcasses by immersion treatments. *J. Food Prot.* 48:939-943.

Nachamkin I, B. M. Allos, and T. W. Ho. 2000. *Campylobacter jejuni* infection and the association with Guillain-Barré syndrome, p. 155–178. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.

Nam K. C. and D. U. Ahn. 2003. Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat. Sci.* 63:1-8.

Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner R. A. 2001 Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*. 414:454–7.

Nogueira M. C, Oyarzabal O. A, and Gombas D. E. 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in cranberry, lemon and lime juice concentrates. *J Food Prot*. 66(9):1637-41.

O'Bryan C.A, Crandall P.G, Chalova V. I and Ricke S.C. 2008. Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *J. Food Sci*. 73:6:264-267.

Ohl M. E and S. I. Miller. 2001. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Med*. 52:259-274.

OIE.2008.AnimalProduction Food Safety. Disponible en [http://www.oie.int/eng/info\\_jw/en\\_apfs.htm](http://www.oie.int/eng/info_jw/en_apfs.htm) Accesado el 20 de Junio del 2010.

OMS. 1999. Boletín de la Organización Mundial de la Salud. Recopilación de artículos No. 1. Disponible en [http://whqlibdoc.who.int/boletin/1999/RA\\_1999\\_1\\_111-115\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/boletin/1999/RA_1999_1_111-115_spa.pdf) Accesado el 27 de Junio del 2009.

OMS. 2002. Estrategia Global de la OMS para la Inocuidad de los Alimentos. Disponible en <http://whqlibdoc.who.int/publications/2002/9243545744.pdf> Accesado el 9 de Enero del 2009.

OMS. 2009. La protección de los alimentos y la salvaguardia de la salud pública. Disponible en [http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/VP/ops98-02\\_ch04-vet.pdf](http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/VP/ops98-02_ch04-vet.pdf) Accesado el 23 de Marzo del 2010.



Orhan G, Bayram A, Zer Y, and Balci I. 2005. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. J Clin Microbiol. 43(1):140-3.

Over K.F, N. Hettiarachchy, M. G. Johnson, and B. Davis. 2009. Effect of organic acids and plant extracts on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium in broth culture model and chicken meat systems. J of food Sci.74:9.

Pandit V.A, and L. A. Shelef. 1994. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosemarinus officinalis*). Food Microbiol. 11:57-63.

Pereda O. J. A, Juárez I. M, Zurera C. G, Otero C. A.2004.Opinión del Comité científico de la AESAN sobre una cuestión presentada por la Presidencia de la AESA, en relación con la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. Disponible en: <http://www.aesan.msc.es> Accedido el 10 de julio del 2010.

Peshin S, Lall S, and Gupta S. 2002. An epidemiologic pattern of poisoning in India. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 11(1):73-4.

Peterson M. C. 2003. *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. J Environ Health 65:20-21.

Ponce A. G, Fritz R, Del Valle C. and Roura S.I. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss carc. Lebensm-Wiss-u-Technol. 36:679-684.

Popoff M, Bockemuhl J, Gheesling L. 2001. "To the Kauffmann-White scheme". Res Microbiol. 154:45:173-174.

PROY-NOM-059-PESC-2004. Proyecto de norma oficial mexicana que regula el uso de antimicrobianos en el cultivo de crustáceos en la República Mexicana. Disponible en: [www.cofemermir.gob.mx/.../5277.59.59.1.ANTIBIÓTICOS.MOD2.doc](http://www.cofemermir.gob.mx/.../5277.59.59.1.ANTIBIÓTICOS.MOD2.doc) Accesado el 20 de Agosto del 2010.

Ramar P. S. and P. Gopalakrishnakone. 2008. Therapeutic Potential of Plants as Antimicrobials for Drug Discovery. Published by Oxford University Press. pp. 1-12.

Ramsewak R. S, Nair M. G, Strasburg G. M, DeWitt D. L, and Nitiss J. L. 1999. Biologically active carbazole alkaloids from *Murraya koenigii*. J Agri Food Chem. 47:444-7.

Ransom J. R, K. E. Belk, J. N. Sofos, D. Stopforth, J. A. Scanga, and G. C. Smith. 2003. Comparison of intervention technologies for reducing *Escherichia coli* O157:H7 on beef cuts and trimmings. Food Prot. Trends 23:24-34.

Rattanachaikusopon P. and P. Phumkhachorn. 2010. Potential of Coriander (*Coriandrum sativum*) oil as a natural antimicrobial compound in controlling *Campylobacter jejuni* in raw meat. Biosci Biotechnol Biochem. 74 (1), 31-35.

Ravishankar S, Libin Z, Law B, Joens L, and Mendel F. 2008. Plant derived compounds inactivate antibiotic resistant *Campylobacter jejuni* strains. J Food Prot. 71:6:1145-1149.

Ricke S. C, M. M. Kunderling, D. R. Miller, and J. T. Keeton. 2005. Alternatives to Antibiotics: Chemical and Physical Antimicrobial Interventions and Foodborne Pathogen Response. Poult Sci. 84:667-675.

Rui-Song P, Feng Zhou, Bao-Ping, and J. Xu. 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. J Food Sci. 74:7:379-83.

Samuel M. C, D. J. Vugia, S. Shallow, R. Marcus, S. Segler, T. McGivern, H. Kassenborg, K. Reilly, M. Kennedy, F. Angulo, and R. V. Tauxe. 2004. Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996-1999. *Clin Infect Dis.* 38(Suppl. 3):S165–S174.

Sharon N and Ofek I. Mannose specific bacterial surface lectins. In: Mirelman D (ed), *Microbial Lectins and Agglutinins*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1986, 55-82.

Shelef L. A, E. K. Jyothi, and M. A. Bulgarelli. 1984. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *J. Food Sci.* 49:737-740.

Simpson B. B, Ogorzaly M. C. 2001. “Economic botany in plants and their manipulation by people”. McGraw Hill Eds. USA pp 1-2.

SINAVE. 2007. Sistema de Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. Disponible en <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html> Accesado el 10 de Enero del 2009.

Skirrow M.B. and Blaser M.J. 2000. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In: *Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. and M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 69-88.

Smith-Palmer A, J. Stewart and L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 118–122.

Stacewickz-Sapuntzakis M, Bowen P.E, Hussain E. A, Damayanti-Wood B.I and Farnsworth N.R. 2001. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Crit. Rev. Food Sci Nutr* 41(4):251-286

Sukupolvi S, R. G. Lorenz, J. I. Gordon, Z. Bian, J. D. Pfeifer, S. J. Normark, and M. Rhen. 1997. Expression of thin aggregative fimbriae promotes interaction of *Salmonella* Typhimurium SR-11 with mouse small intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 65:5320–5325.

Tierrez A. and F. García-del Portillo.2005. New concepts in *Salmonella* virulence: The importance of reducing the intracellular growth rate in the host. *Cell Microbiol.* 7:901-909.

Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, *et al.* 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 50:27-34.

Tuttle J, Gomez T, Doyle M. P, Wells J. G, Zhao T, Tauxe R. V, Griffin P. M. 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli*O157: H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol Infect.* 122:185-92.

Urs N. R. R. and Dunleavy J. M. 1975. Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, soybeans). *Phytopath* 65:686-90.

USDA. 1996. Pathogen reduction, hazard analysis and critical control point (HACCP) systems; final rule. Washington, DC: USDA.

USDA-FSIS. 1999. Appendix A. Compliance guidelines for meeting lethality performance standards for certain meat and poultry products. USDA-FSIS, Washington, DC.

Uzzau S, Brown D, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt D, Olsen J. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella* enteric. *Epidemiol. Infect.* 125:229–255.

Valtierra-Rodríguez D, N. L. Heredia, S. García and E. Sánchez. 2010 Reduction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry skin by fruit extracts. *J Food Prot.* 73(3):447-82.

Van Pelt W, M. A. de Wit, W. J. Wannet, E. J. Ligtoet, M. A. Widdowson, and Y. T. Van Duynhoven. 2003. Laboratory surveillance of bacterial gastroenteric pathogens in The Netherlands, 1991-2001. *Epidemiol Infect.* 130:431–441.

Vazquez M. A, Martínez G. I and Totosa A. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos polifenólicos de romero y chile ancho y su aplicación en un producto cárnico. *NACAMEH* 3(1):21-32. Disponible en <http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/> Accesado el 25 de Mayo del 2010.

Vieira R.H, S.F. Rodrigues, D. P, Goncalves, F.A, Menezes F. G, Aragao J. S, and Sousa O.V. 2001. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 43: 145-148.

Vijay K, Cheng-An Hwang, and Mendel Friedman. 2010. Thermal inactivation and post-thermal treatment growth during storage of multiple *Salmonella* serotypes in ground beef as affected by sodium lactate and oregano oil. *J. of Food Sci.* 75:1:1-6.

Vijay K. Juneja and Mendel Friedman. 2009. Carvacrol and cinnamaldehyde facilitate thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *J. Food Prot.* 71:8:1604-1611.

Wallis T. S. and E. E. Galyov. 2000. Molecular basis of *Salmonella* induced enteritis. *Mol. Microbiol.* 36:997–1005.

Wassenaar T. M. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:466-476.

Weber P, M. Koch, W. R. Heizmann, M. Scheurlen, H. Jenss, and F. Hartmann. 1992. Microbic superinfection in relapse of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol.* 14:302-308.

Wheeler J. G, D. Sethi, J. M. Cowden, P. G. Wall, L. C. Rodrigues, D. S. Tompkins, M. J. Hudson, P. J. Roderick. 1999. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *BMJ* 318:1046-1050.

Williams J. E, and S. T. Benson. 1978. Survival of *Salmonella* Typhimurium in poultry feed and litter at three temperatures. *Avian Dis.* 22:742–747.

World Health Organization. 1999. Removing obstacles to healthy development World Health Organization Report on Infectious Diseases. WHO, Geneva, Switzerland, pp. 68.

Zaidi M. B, P.F. McDermott, P. Fedorka-Cray, V. León, C. Canché, S.K. Hubert, J. Abbott, M. León, S. Zhao, M. Headrick, L. Tollefson. 2006. Non-typhoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clin. Infect. Dis.* 42:21-28.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

**Mayela de San Juan Robles Huízar**

**Candidata para el grado de:**

**Maestro en Ciencias con acentuación en Microbiología**

**Tesis:** EFECTO DE EXTRACTOS DE PRODUCTOS NATURALES PARA CONTROLAR LA PRESENCIA DE *Campylobacter jejuni* y *Salmonellaspp.* EN CARNE MOLIDA DE POLLO

**Campo de estudio:** Productos naturales e inocuidad alimentaria.

**Datos Personales:** Nacida en Fresnillo, Zac. el 16 de diciembre de 1983, hija de Rubén Robles González y Hortensia Huízar Vázquez.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ), grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2007.

**Experiencia Profesional:** Practicante del Laboratorio de Análisis de Alimentos de la UAZ 2005. Practicante de Laboratorio Clínico del IMSS, 2006. Estancia de tiempo completo en la Unidad de Investigación Médica de Zacatecas del IMSS 2007-2008.