



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

POSGRADO EN PROTECCIÓN VEGETAL

**EXTRACTOS ORGÁNICOS PARA LA
REDUCCIÓN DE RIESGOS
BIOLÓGICOS EN HORTALIZAS**

T E S I S

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
COMISIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES

Presenta:
LETICIA LIZETTE CONDE RAMOS

Bajo la supervisión de:
M.C. MA. DE LOURDES RODRÍGUEZ MEJÍA



Chapingo, Méx., Noviembre 2016

EXTRACTOS ORGÁNICOS PARA LA REDUCCIÓN DE RIESGOS BIOLÓGICOS EN HORTALIZAS

Tesis realizada por **LETICIA LIZETTE CONDE RAMOS** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



M.C. MA. DE LOURDES RODRÍGUEZ MEJÍA

ASESOR:



DR. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ

ASESOR:



DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁG.
Hoja de Aprobación de la Tesis.....	i
Índice de Contenido.....	ii
Lista de Cuadros.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Dedicatoria.....	viii
Agradecimientos.....	ix
Datos Biográficos.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo General.....	4
2.2 Objetivos Particulares.....	4
3. HIPÓTESIS.....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1 FSMA (Ley de Modernización para la Inocuidad Alimentaria)...	7
4.2 Productos frescos como fuente de contaminación.....	8
4.3 Enterobacterias.....	8
4.3.1 <i>Escherichia coli</i>	11
4.3.2 <i>Samonella</i> spp.....	14
4.4 Alertas de Importación por la FDA.....	17
4.5 Brotes de enfermedades a causa de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp..	19
4.5.1 Brotes por <i>Escherichia coli</i>	19
4.5.2 Brotes por <i>Samonella</i> spp.....	19
4.5.3 La situación en México.....	20
4.6 Granada (<i>Punica granatum</i>).....	23
4.6.1 Usos de la granada.....	24
4.6.2 Constituyentes químicos de la granada.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1 Evaluación <i>in vitro</i>	28
5.1.1 Obtención de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	28
5.1.2 Especies de plantas utilizadas para la preparación de extractos.....	29
5.1.3 Preparación de extractos orgánicos.....	29
5.1.3.1 Macerado Acuoso.....	29
5.1.3.2 Molido Acuoso.....	30
5.1.3.3 Molido Metanólico.....	30

5.1.3.4 Cocción Acuoso.....	30
5.1.4 Siembra Bacteriana.....	31
5.1.5 Establecimiento de los experimentos <i>in vitro</i>	31
5.2 Evaluación <i>in vivo</i>	34
5.2.1 Raspado de la superficie de frutos de Melón chino, Jitomate y follaje de Cilantro.....	35
5.2.2 Procedimiento por medio de inmersión en agua peptonada.....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1 Resultados <i>in vitro</i>	39
6.1.1 Análisis estadístico general de los resultados <i>in vitro</i> ..	41
6.1.2 Análisis estadístico por cepa bacteriana y extracto de los resultados <i>in vitro</i>	45
6.2 Resultados <i>in vivo</i>	49
6.2.1 Resultados del procedimiento de raspado.....	49
6.2.1.1 Análisis Estadístico general de los resultados de raspado.....	50
6.2.1.2 Análisis Estadístico por producto y extracto de los resultados de raspado.....	53
6.2.1.3 Resultados del Análisis de varianza en cilantro.....	54
6.2.1.4 Resultados del Análisis de varianza en Jitomate.....	56
6.2.1.5 Resultados del Análisis de varianza en Melón.....	58
6.2.2 Resultados del procedimiento de inmersión en agua peptonada amortiguada.....	61
7. CONCLUSIONES.....	63
8. RECOMENDACIONES.....	67
9. LITERATURA CITADA.....	68

LISTA DE CUADROS

NO.	CUADROS	PÁG.
1	Principales características microbiológicas de la familia Enterobacteriaceae	10
2	Notificaciones de alertas por la FDA al año	17
3	Distribución de microorganismos patógenos en las alertas	18
4	Distribución de alertas por estado	18
5	Brotes de ETA's contaminados con <i>E. coli</i> en E.E.U.U. de 2010 a 2015	19
6	Brotes de ETA's contaminados con <i>Salmonella</i> spp. en E.E.U.U. de 2010 a 2015	20
7	Usos de <i>Punica granatum</i> en diferentes partes del mundo	25
8	Establecimiento de los experimentos <i>in vitro</i> para evaluar la inhibición de <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i> con extractos orgánicos en Chapingo, Méx. 2016	31
9	Descripción de los tratamientos realizados en la evaluación de la acción antibacteriana de <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>E. coli</i> ATCC 25922 realizada en la superficie por producto de Melón chino, Jitomate y follaje de Cilantro, en Chapingo, Méx. 2016.	34
10	Resultados del análisis de varianza, a través de la comparación de las medias de la interacción de los Efectos Principales evaluados en la etapa <i>in vitro</i> . Chapingo, Méx. 2016.	41
11	Resultados del análisis de varianza, a través de la comparación de las medias de las interacciones de los efectos por cepa bacteriana, evaluados en la etapa <i>in vitro</i> . Chapingo, Méx., 2016.	45
12	Resultados del análisis de varianza, a través de la comparación de las medias de la interacción de los Efectos Principales evaluados en la etapa <i>in vivo</i> . Chapingo, Méx. 2016.	50
13	Resultados del análisis de varianza, a través de la comparación de las medias de la interacción de los frutos con los extractos evaluados y las horas de medición. Chapingo, Méx. 2016.	53
14	Resultados de crecimiento bacteriano por el procedimiento de inmersión en agua peptonada amortiguada evaluados en la etapa <i>in vivo</i> . Chapingo, Méx. 2016.	61

LISTA DE FIGURAS

NO.	CONTENIDO	PÁG.
1	Ciclo general de infecciones causadas por Enterobacterias	10
2	Mecanismos de patogenicidad de <i>Escherichia</i>	13
3	Imagen del crecimiento de colonias de <i>E. coli</i> en medio EMB-L	13
4	Mecanismos de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	16
5	Imagen del crecimiento de colonias de <i>Salmonella typhimurium</i> en medio EMB-L	16
6	Mapa de distribución de alertas en México	18
7	Porcentaje de afectación por bacterias causantes de diarreas en 831 niños de Yucatán, Méx.	20
8	Distribución de los grupos de <i>E. coli</i> encontrados en niños de Yucatán, Méx.	21
9	Tendencia de Salmonelosis en México de 2000 a 2011	21
10	Fruto de <i>Punica granatum</i>	23
11	Flores de <i>Punica granatum</i>	24
12	Forma en que se realizó la medición de la zona de inhibición generada por cada disco de papel filtro atribuido al efecto de los extractos evaluados.	33
13,14,15	Establecimiento del experimento para evaluar el efecto antibacteriano de <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i> , por medio del procedimiento del raspado de la superficie de los frutos.	35
16	Ejemplo del marcado de cada uno de los cm ² marcado en cada una de las cajas Petri para cuantificar el desarrollo del crecimiento colonial, del procedimiento por medio del raspado de la superficie de los frutos.	36
17, 18	Establecimiento del experimento para evaluar el efecto antibacteriano de <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i> , por medio del procedimiento de inmersión en agua peptonada amortiguada.	38
19	Gráfica de los resultados generales del análisis de varianza comparando la sensibilidad de las cepas bacterianas a los extractos utilizados en la evaluación.	43
20	Gráfica de los resultados generales del análisis de varianza comparando el desarrollo bacteriano a través de las tres horas de evaluación.	43
21	Gráfica de los resultados del análisis de varianza del desarrollo colonial, combinando ambas cepas bacterianas, comparado con los extractos orgánicos.	44

22	Gráfica de los resultados del análisis de varianza del desarrollo colonial comparado con las diferentes concentraciones utilizadas en la evaluación de los extractos orgánicos.	44
23	Gráfica de los resultados del análisis de varianza de la inhibición del desarrollo colonial de <i>E. coli</i> por efecto de los extractos orgánicos.	46
24	Gráfica de los resultados del análisis de varianza del efecto de las concentraciones de los extractos orgánicos sobre la inhibición del desarrollo colonial de <i>E. coli</i> .	47
25	Gráfica de los resultados del análisis de varianza de la inhibición del desarrollo colonial de <i>S. typhi</i> por efecto de los extractos orgánicos.	47
26	Gráfica de los resultados del análisis de varianza del efecto de las concentraciones de los extractos orgánicos sobre la inhibición del desarrollo colonial de <i>S. typhi</i> .	48
27	Gráfica de los resultados del análisis de varianza comparando el desarrollo bacteriano sobre los frutos de Meón, Cilantro y Jitomate.	51
28	Gráfica de los resultados del análisis de varianza comparando las tres horas de medición del desarrollo bacteriano sobre los frutos.	52
29	Gráfica de los resultados del análisis de varianza comparando la inhibición del desarrollo bacteriano sobre los frutos por el efectos de los extractos.	52
30	Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del extracto acuoso de Granada (<i>P. granatum</i>) en Cilantro.	55
31	Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del ácido peracético en Cilantro.	55
32	Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del aceite esencial de Tomillo en cilantro.	56
33	Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del extracto acuoso de Granada (<i>P. granatum</i>) en Jitomate.	57
34	Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del ácido peracético en Jitomate.	57
35	Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del aceite esencial de Tomillo en Jitomate.	58
36	Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del extracto acuoso de Granada (<i>P. granatum</i>) en Melón.	59
37	Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del ácido peracético en Melón.	59

38	Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del aceite esencial de Tomillo en Melón.	60
----	---	----

DEDICATORIA

La vida esta llena de obstáculos
que en su conjunto la enriquecen.
Sólo tú decides como afrontarlos
y aunque parezca que no se superarán
recuerda que Dios, no te pone a prueba
de lo que no puedas superar...

Con todo mi Amor para Irving

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Universidad Autónoma Chapingo por su patrocinio para la realización de este trabajo de investigación.

A la Profesora Ma. De Lourdes Rodríguez Mejía por su colaboración y apoyo en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Mateo Vargas por ser un guía comprometido con la investigación y apoyo incondicional a los estudiantes.

Al Dr. Marcelo Acosta por su colaboración, promoviendo siempre la superación personal en todos los sentidos de la vida.

A todos los profesores y amigos del Posgrado en Protección Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo, gracias por compartir su sabiduría y experiencia.

A mis padres y hermanos, por apoyar mis decisiones, ofrecer su punto de vista y centrarme en el camino.

A los compañeros del Laboratorio de Bacteriología Agrícola, del Dpto. de Parasitología Agrícola, por compartir tantas horas de buena armonía.

A los laboratoristas los Srs. Poli y José (los argentinos), así como a Don Leo, por su amistad y apoyo proporcionado en el laboratorio y sobre todo por hacer los días más divertidos de lo normal.

A la secretaria del posgrado, Mary, por proporcionar siempre las facilidades en lo requerido.

Por último gracias a todas aquellas personas que de algún modo colaboraron en la realización del presente trabajo, no sólo en lo académico, si no por proporcionar las facilidades para cumplir con el objetivo.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Leticia Lizette Conde Ramos
Lugar de nacimiento	Estado de México.
Profesión	Ing. Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola
Cédula profesional	6919415

Desarrollo académico

Preparatoria	Preparatoria Agrícola
Licenciatura	Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola

Experiencia laboral

Auditor Externo	Esquemas de Inocuidad privados
Tercero Autorizado en SRRC	Actuar bajo Autoridad Legal Delegada del SENASICA a través de la DGIAAP.
Gerente de Calidad	Diferentes unidades de verificación en materia de sanidad vegetal
Tercero Especialista Fitosanitario	Evaluación de la conformidad de diferentes Normas Oficiales Mexicanas en materia de sanidad vegetal

EXTRACTOS ORGÁNICOS PARA LA REDUCCIÓN DE RIESGOS BIOLÓGICOS EN HORTALIZAS

ORGANIC EXTRACTS FOR THE REDUCTION OF BIOLOGICAL RISKS IN VEGETABLES

Leticia Lizette Conde Ramos¹, Ma. de Lourdes Rodríguez Mejía¹.

RESUMEN

Las enfermedades causadas por patógenos transmitidos por los alimentos constituyen un gran problema para los consumidores. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad antibacteriana, *in vitro* e *in vivo*, de extractos orgánicos de las plantas: *Aloe vera*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Ruta graveolens*, *Nicotiana glauca*, *Larrea tridentata*, *Thymus vulgaris*, *Punica granatum* y *Persea drymifolia*; 3 metanólicos: *Origanum vulgare*, *Larrea tridentata* y *Thymus vulgaris*; y un aceite esencial: *Thymus vulgaris*, para controlar el desarrollo de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. La evaluación *in vitro*, se realizó por medio del procedimiento de difusión de disco, obteniendo las mejores inhibiciones con el extracto acuoso de *P. granatum* y el aceite esencial de *T. vulgaris*; estos extractos se utilizaron para la segunda etapa de investigación. En la evaluación *in vivo* se comparó la acción antibacteriana del extracto acuoso de *P. granatum* al 10%, aceite esencial de *T. vulgaris* a 90 ppm y ácido peracético a 90 ppm, sobre melón, jitomate y cilantro inoculados con una mezcla bacteriana, utilizando dos procedimientos, uno por medio de raspado y otro tomando como referencia la NOM-210-SSA1-2014. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza combinado, a través un experimento factorial completo, por medio de comparaciones de medias por el método de Tukey ($P = 0.05$), observándose la mejor inhibición del desarrollo bacteriano en Jitomate, seguido de cilantro y por último el melón; el mejor efecto inhibitorio se obtuvo con el ácido peracético, entre el extracto acuoso y el aceite esencial, no se observó diferencia significativa.

Palabras clave: Extracto acuoso de *P. granatum*, aceite esencial de *T. vulgaris*, ácido peracético, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Illnesses caused by food-borne pathogens constitute a major problem for consumers. The objective of this study was to evaluate the antibacterial effectiveness, *in vitro* and *in vivo*, of organic extracts of plants: *Aloe Vera*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Ruta graveolens*, *Nicotiana glauca*, *Larrea tridentata*, *Thymus vulgaris*, *Punica granatum* and *Persea drymifolia*; 3 methanol ones: *Origanum vulgare*, *Larrea tridentata* and *Thymus vulgaris*; and an essential oil: *Thymus vulgaris*, to control the development of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. The *in vitro* assessment was carried out by the disk diffusion procedure, obtaining the best inhibitions with the aqueous extract of *P. granatum* and the essential oil of *T. Vulgaris*; these extracts were used for the second phase of the research. In the *in vivo* evaluation the antibacterial action of the aqueous extract of *P. granatum* at 10%, essential oil of *T. vulgaris* at 90 ppm and peracetic acid at 90 ppm, on melon, tomato and coriander inoculated with a bacterial mixture was compared, using two procedures, one by scraping and another by taking as a reference NOM-210-SSA1-2014. The results were statistically analyzed using combined variance analysis through a complete factorial experiment, by means of comparison of means using the Tukey method ($P = 0.05$), observing the best inhibition of bacterial growth in tomato, followed by coriander and finally melon; the best inhibitory effect was obtained with peracetic acid; between the aqueous extract and the essential oil, no significant difference was observed.

Keywords: aqueous extract of *P. granatum*, essential oil of *T. vulgaris*, peracetic acid, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por patógenos transmitidos por los alimentos constituyen un gran problema para los consumidores, los operadores de empresas de alimentos y los gobiernos nacionales. Por ello, la prevención y control de estas enfermedades son una de las metas de la salud pública internacional. Tradicionalmente estas metas se han investigado, en parte, a través del establecimiento de parámetros como los Criterios Microbiológicos (CM), que reflejan el conocimiento y la experiencia de las Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y el impacto a la salud humana debido a los posibles peligros. Los criterios microbiológicos se han usado desde hace muchos años y han contribuido a la mejora general de la higiene de los alimentos, aún cuando fueran basados en una observación empírica de los resultados obtenidos por la aplicación de las medidas existentes sin una relación explícita con niveles específicos de protección a la salud pública. Los avances en las técnicas de Evaluación de Riesgos Microbiológico (ERM) y el uso de un marco de gestión de riesgos han incrementado la posibilidad de una estimación más cuantificable del riesgo para la salud pública, además de la determinación del efecto de dichas intervenciones (CODEX, 2013).

La naturaleza de los agentes contaminantes, la interacción de los productos agrícolas con diferentes sustancias y superficies de contacto durante su proceso de producción, cosecha y empaque así como las características morfológicas y fisiológicas de los productos agrícolas, generan que una vez posicionado un contaminante sobre la superficie del mismo difícilmente se pueda eliminar (SENASICA-DGIAAP).

Por lo tanto, cada vez más existen nuevos retos para el control de los patógenos que causan las ETA's (Enfermedades Transmitidas por Alimentos), haciendo que la vista se dirija hacia otras alternativas de control como son los extractos orgánicos o vegetales, los cuales pudieran ser una muy buena opción

de control, que garantice la calidad e inocuidad del producto y en el caso de los productos orgánicos, no se pierda la calidad orgánica.

La inocuidad de los productos es cada vez más importante y para 2017, se tendrá que cumplir obligatoriamente con la Ley de Modernización para la Inocuidad Alimentaria (FSMA) por sus siglas en Ingles, la cual entre otras circunstancias obliga a los productores que quieran exportar a Estados Unidos a cumplir con una serie de requisitos que garantice la inocuidad de los productos exportados a ese país.

Por lo tanto y en respuesta a esta necesidad de producir productos inocuos con el uso de alternativas eficaces para la disminución de contaminantes en las cadenas productivas hortícolas y al mismo tiempo conservar de algún modo la medicina tradicional de nuestro país, se propone el presente trabajo de investigación enfocándose en la evaluación de plantas usadas en la medicina tradicional como es *Aloe vera*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Ruta graveolens*, *Nicotiana glauca*, *Larrea tridentata*, *Thymus vulgaris*, *Punica granatum* y *Persea drymifolia*, para encontrar una alternativa orgánica para la disminución de la contaminación biológica de productos frescos como el jitomate, melón y cilantro.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Determinar la efectividad antibacteriana, *in vitro* e *in vivo*, de extractos vegetales, obtenidos de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana, para controlar el desarrollo de las enterobacterias *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Escherichia coli* ATCC 25922, sobre la superficie de productos hortícolas frescos.

2.2 Particulares

Con la finalidad de dar cumplimiento al objetivo general se plantean los siguientes objetivos particulares.

1. Valorar *in vitro* diferentes extractos vegetales para el control de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Escherichia coli* ATCC 25922.
2. Evaluar *in vivo* la reducción o eliminación del riesgo, en Jitomate, Cilantro y Melón, con los mejores extractos orgánicos obtenidos de los resultados *in vitro*.
3. Comparar los extractos con un producto utilizado en el mercado para la eliminación de las poblaciones de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en Jitomate, Cilantro y Melón.

3. HIPÓTESIS

De las evaluaciones *in vitro*: Al menos un extracto orgánico inhibirá el desarrollo bacteriano de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

De las evaluaciones *in vivo*: Al menos un extracto orgánicos favorecerá la disminución del crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Escherichia coli* ATCC 25922 sobre productos hortícolas frescos, incluyendo un producto utilizado en el mercado para la desinfección de hortalizas.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

Desde los orígenes de las primeras civilizaciones se ha sospechado la relación existente entre los hábitos alimenticios y la salud. Ya en el siglo V a.C., Hipócrates afirmaba: *“deja que el alimento sea tu medicina y que la medicina sea tu alimento”*, sin ser consciente de como su principio seguiría teniendo vigencia 2,500 años después. No obstante, las conexiones concretas no han sido fundamentadas hasta el siglo XIX. Durante el siglo XIX y mitad del siglo XX, la observación médica y la experimentación animal y bioquímica han ido demostrando el importante papel que juega la alimentación en diversos procesos bioquímicos. Por un lado, la dieta suministra los nutrientes necesarios para satisfacer los requerimientos metabólicos de un individuo. Pero más allá de los beneficios nutricionales aceptados, la alimentación puede producir una serie de efectos fisiológicos beneficiosos al modular funciones específicas, por lo que puede no sólo ayudar a alcanzar una salud óptima, sino desempeñar además una función importante reduciendo los riesgos de padecer determinadas enfermedades. De hecho, en las últimas décadas se han acumulado numerosas evidencias científicas que demuestran el papel de ciertos componentes de la dieta en la prevención de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, obesidad, condiciones inflamatorias y algunos tipos de cáncer. (Quirantes, 2012).

Sin embargo, cuando estos alimentos se encuentran contaminados con agentes de origen biológico, químico y/o físico, la salud humana puede verse afectada, sobre todo en aquellas personas consideradas dentro de la población sensible (SENASICA-DGIAAP). Es por ello que si no se les da el apropiado manejo, los alimentos se pueden convertir en vectores de múltiples peligros biológicos, químicos y físicos, por lo cual es indispensable asegurar alimentos inocuos y nutritivos a lo largo de la cadena alimentaria (Cruz, 2016).

La seguridad de los alimentos está determinada por el nivel de microorganismos patógenos o sus toxinas presentes y el control o destrucción

que se aplique a los mismos (Cruz, 2016). Por lo cual, en los últimos años se ha agravado un problema serio con respecto a las enfermedades causadas por los alimentos ETA's, lo que ha obligado a buscar opciones para reducir los riesgos ocasionados por peligros microbiológicos

Una ETA es un síndrome generalmente agudo que puede caracterizarse por un cuadro digestivo, cutáneo o neurológico originado por la ingestión de alimentos y/o agua que contengan agentes etiológicos en cantidad tal que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupo de población. Las alergias por hipersensibilidad individual a ciertos alimentos no se consideran como ETA (Cruz, 2016).

Recientemente, un número de antibióticos han perdido su eficacia debido al desarrollo de cepas resistentes de bacterias, que se ha producido principalmente a través de la expresión de genes de resistencia (Davis, 1994; Servicio, 1995, Chebaibi and Rhazi, 2013). Además de la inducción de la resistencia, los antibióticos se asocian a veces con efectos opuestos, tales como hipersensibilidad, supresión inmune y reacciones alérgicas (Ahmad et al., 1998, Chebaibi and Rhazi, 2013). Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar fármacos antimicrobianos alternativos para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Berahou et al, 2007;.. Salomao et al, 2008, Chebaibi and Rhazi, 2013).

Por esta causa, ha aumentando la tendencia al uso de conservantes naturales, que han llegado a constituir una alternativa promisorio como fuente de sustancias con actividad antimicrobiana (Castaño, P., *et al.* 2010), junto con las nuevas tendencias en el consumo mundial de alimentos se orientan a la demanda de productos que cumplan, cada vez más, estrictas normas de sanidad, inocuidad y calidad. Este panorama es producto de un entorno comercial que día a día se torna más exigente y competitivo debido a la globalización de los mercados y a la interdependencia económica (Díaz, 2008).

4.1 FSMA (Ley de Modernización para la Inocuidad Alimentaria)

Un hecho importante que nos concierne en estos días y que se tornará de carácter obligatoria a mediados de 2016, es el cumplimiento con los siete requisitos que establece la FDA a través de la Ley de Modernización para la Inocuidad Alimentaria (FSMA), la cual fue promulgada el 4 de Enero de 2011 por el presidente Obama y hasta el momento es la legislación sobre inocuidad alimentaria más radical que se haya aprobado en EE.UU. en los últimos 60 años, los cuales incluyen:

- Controles Preventivos para Alimentos de Consumo Humano, que detalla requisitos de regulación para procesadores de alimentos cuyos productos se exportarán y serán consumidos por los consumidores de los EE.UU.
- Inocuidad de Frutas y Vegetales, que detalla los requisitos de regulación para agricultores.
- Programas de Verificación de Proveedores Extranjeros (FSVP) para Importadores, que detalla los requisitos de regulación para importadores.
- Transporte Higiénico de Alimentos para Consumo Humano y Animal, que detalla los requisitos de regulación para aquellos que transportan alimentos y que puede afectar a los exportadores.
- Adulteración Intencionada de los Alimentos, que detalla requisitos de regulación que requieren que tanto las instalaciones en los EE.UU. como las del extranjero, cuyos productos se exportan, traten la seguridad alimentaria implementando un plan de defensa alimentaria.
- Controles Preventivos para Alimentos de Consumo Animal, que detalla requisitos de regulación para productores exportadores de alimentos para animales.
- Organismos de Certificación/Acreditación de Auditores de Terceras Partes, que detalla los requisitos de la comunidad de auditores.

(FDA-FSMA, 2016)

4.2 PRODUCTOS FRESCOS COMO FUENTE DE CONTAMINACIÓN

Los productos frescos (frutas y vegetales mínimamente procesados) están reconocidos como una fuente importante de agentes patógenos transmitidos por alimentos; en particular, por *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC) y el serogrupo O157:H7. Las frutas y verduras contaminadas representan alrededor del 20% de todos los brotes notificados de VTEC, siendo los más notables en espinacas, lechuga y los germinados. (Wright, et. al., 2013).

La contaminación de los productos puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimentaria, aunque el agua de riego contaminada y la contaminación por granjas o animales silvestres se cree que son las fuentes más importantes de contaminación antes de la cosecha en los cultivos (Wright, et. al., 2013). La evidencia reciente ha demostrado que las enterobacterias pueden colonizar las plantas como huéspedes alternativos y pueden entrar en el tejido vegetal, en los que pueden ser protegidos de los procesos de saneamiento de post-cosecha, lo que representa un riesgo potencial para la salud (Wright, et. al., 2013).

4.3 ENTEROBACTERIAS

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre (Puerta, 2010).

Las bacterias entéricas se encuentran naturalmente en el tracto digestivo de los mamíferos e incluyen muchas especies de comensales y organismos patógenos, que normalmente crecen mejor bajo condiciones de pH neutro

(Kanjee & Houry, 2013). Durante el paso a través del tracto digestivo humano, las bacterias entéricas deben sobrevivir primero al estómago extremadamente ácido, donde existe un pH entre 1.5 y 3.0 que actúa como una potente barrera contra la infección microbiana. Sin embargo, algunas bacterias han evolucionado y no tienen problema en desarrollarse a pH bajo, por lo cual resalta la importancia de estas cepas (Kanjee & Houry, 2013).

La mayoría de las bacterias patógenas requieren una dosis infecciosa de gran tamaño (por ejemplo, *Vibrio cholerae* requiere $\sim 10^9$ organismos) con el fin de asegurar que algunos organismos sobrevivan al paso a través del estómago (Kanjee & Houry, 2013). Sorprendentemente, la bacteria infecciosa *Escherichia coli* enterohemorrágica requiere una dosis infecciosa sustancialmente menor ($\sim 10^2$ organismos) y esto se ha atribuido a la fuerte supervivencia de esta bacteria a pH bajo (Kanjee & Houry, 2013).

Después del paso a través del estómago, las bacterias entran en el intestino delgado relativamente neutro o básico. Sin embargo, el entorno del intestino es rico en carbohidratos y bajo en oxígeno, lo que conduce a altos niveles de fermentación y la consiguiente producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), tales como ácido fórmico, acético, propiónico, y ácido láctico. Los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) cruzan la membrana de la célula en un estado sin carga (descargados) y, posteriormente, se disocian en el citoplasma, lo que resulta en una disminución del pH interno (Kanjee & Houry, 2013). Por lo tanto, las células bacterianas se enfrentan a estrés ácido incluso en el intestino y la evidencia de la gran evolución que han desarrollado para su supervivencia y afectación de la salud humana.

De manera general, en la siguiente imagen se muestra el ciclo de desarrollo de las enterobacterias:

Ciclo de Infección

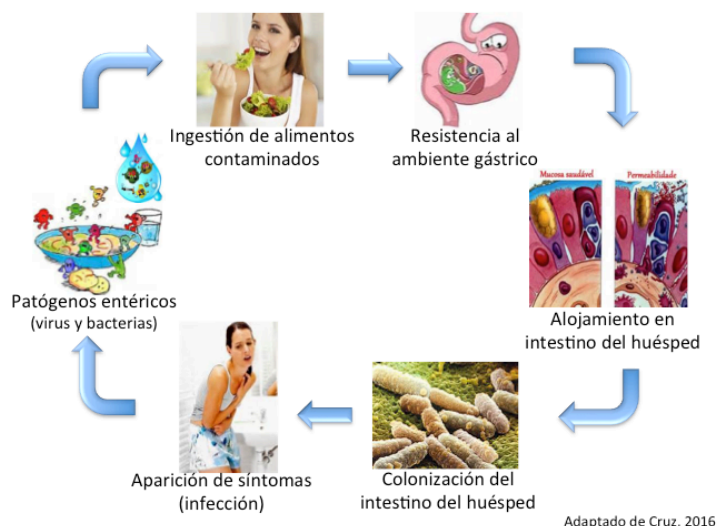


Figura 1. Ciclo general de infección causado por Enterobacterias.

En el cuadro 1 se resumen las principales características microbiológicas de la familia *Enterobacteriaceae*.

Cuadro 1. Principales características microbiológicas de la familia *Enterobacteriaceae*.

Características típicas y distintivas de la enterobacterias
Son aerobios no formadores de esporas que pueden crecer en anaerobiosis (anaerobios facultativos).
Reducen los nitratos a nitritos (Con algunas excepciones).
No licuan el alginato
Fermentan la glucosa a ácido con producción de gas o sin ella
Son oxidasa-negativos, a excepción de <i>Plesiomonas</i>
Producen catalasa
No ven favorecido su crecimiento por la presencia de NaCl
La mayoría son móviles (con flagelos peritricos)
No formadores de esporas.

FUENTE: Puerta, 2010.

4.3.1 *Escherichia coli*

La mayoría de las *Escherichia coli* son inofensivas y en realidad son una parte importante del tracto intestinal humano, sin embargo, algunas bacterias de *E. coli* son patógenas, lo que significa que pueden causar enfermedades, diarrea o enfermedades fuera del tracto intestinal. Los tipos de *E. coli* que causan diarrea, pueden ser transmitidas a través del agua o alimento contaminado o por contacto con animales o personas (CDC a, 2016).

Es el microorganismo de vida libre que mejor se ha estudiado. Estas bacterias pueden ser móviles (la mayoría) o inmóviles, la mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano (Puerta, 2010). Se deshidrata a concentraciones salinas >10%, pH >5 y es ácido tolerante (Ray & Bhunia, 2010).

En condiciones de laboratorio, *E. coli* es capaz de sobrevivir a un estrés de pH de 2.0 durante varias horas, destacando la potente capacidad de este organismo para resistir condiciones ácidas (Kanjee & Houry, 2013).

Las cepas patógenas de *Escherichia coli* se dividen de acuerdo con los síntomas clínicos que producen y por sus mecanismos de infección en:

- ***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).** Es una de las causas más frecuentes de deshidratación por diarrea en niños menores de dos años y es la principal causa de diarrea del viajero. En general los síntomas tienden a ser leves, con diarrea acuosa. Ocasionalmente los síntomas pueden ser más graves, con fiebre, escalofríos y vómito (Puerta, 2010).
- ***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).** Es una causa importante de diarrea en neonatos en los países subdesarrollados, causando enfermedad muy raramente en adultos en el mundo desarrollado. Producen una lesión típica en la mucosa, con la formación de

microcolonias y la pérdida de microvellosidades adyacentes (Puerta, 2010).

- ***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y otras cepas productoras de toxina Shiga (STEC).** Estas cepas producen toxinas de tipo Shiga (también denominadas verotoxinas) que consisten en citotoxinas que inducen la muerte de la célula huésped. Las cepas que producen toxinas Shiga pueden causar enfermedad de grado variable como diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome hemolítico urémico (SHU) y muerte (Puerta, 2010).
- ***Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).** Son capaces de invadir las células. Clínicamente se manifiestan como un cuadro similar a la disenteríaa bacteriana, con una incidencia elevada de fiebre y diarrea sanguinolenta (Puerta, 2010).
- ***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).** Debe su nombre a la capacidad para agregarse en el cultivo en medio celular. Puede considerarse una verdadera infección emergente. Se ha descrito de forma excepcional como causa de diarrea del viajero y con mayor frecuencia, de diarrea persistente en sujetos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Puerta, 2010).

El mecanismo de patogenicidad de las bacterias enteroinvasivas comienza cuando *Escherichia* prolifera en la luz intestinal y se adhiere a las microvellosidades mediante receptores específicos, pueden ser ingeridas por endocitosis en las células del colón, después de que atraviesa la membrana, la bacteria se multiplica y atraviesa la superficie basolateral para infectar a otros enterocitos colónicos que en casos extremos son lisados, observándose como microúlceras y por otra atraviesan la lámina propia para desplazarse al torrente circulatorio donde pueden ser fagocitados por neutrófilos y macrófagos, es ahí donde se estimula una respuesta inflamatoria pasando a los capilares y de ahí a la circulación general. Cualquiera de los factores de invasión que produzcan una reacción de inflamación del huésped con un incremento de linfocitos resulta

en disentería (Figura 2). La fimbrilla permite a la bacteria colonizar la mucosa del íleon. Sus propiedades de virulencia están codificadas en los plásmidos; interaccionan de forma característica con la mucosa intestinal y producen enterotoxinas o citoxinas induciendo diarrea aguda (Alanis, 2006).

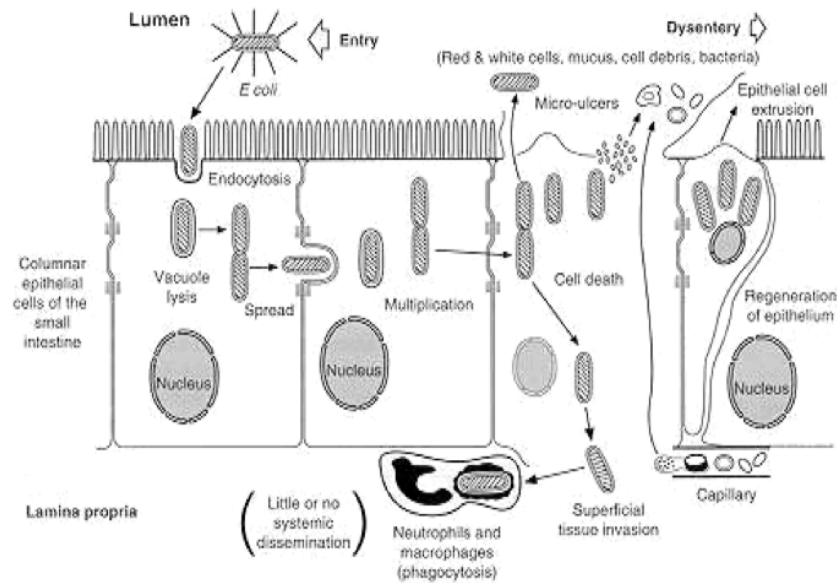


Figura 2. Mecanismo de patogenicidad de *Escherichia*. (Fuente: Alanis, 2006).

En el medio EMB-L, *Escherichia coli* ATCC 25922 se torna de color verdoso con brillo metálico como se muestra en la figura 3.



Figura 3. Imagen del crecimiento de colonias de *Escherichia coli* ATCC 25922 en medio EMB-L. Fuente propia.

4.3.2 *Salmonella* ssp.

La bacteria de *Salmonella*, fue descubierta por un científico Americano llamado Dr. Salmon y a sido causante de salmonelosis por más de 125 años. La mayoría de las personas infectadas con *Salmonella*, desarrollan diarrea, fiebre y calambres abdominales de 12 a 72 hrs después de la infección. La enfermedad dura de 4 a 7 días. En algunos casos, la diarrea puede ser tan severa que el paciente debe ser hospitalizado. En estos pacientes, la infección por *Salmonella* puede propagarse de los intestinos al torrente sanguíneo y luego a otras partes del cuerpo. En estos casos, puede causar la muerte a menos que el paciente reciba tratamiento con antibióticos. Los ancianos, los niños y las personas con sistema inmune alterados son más propensos a tener una enfermedad grave (CDC a, 2016).

Se estima que aproximadamente se presentan 1.2 millones de casos de enfermedades causados por *Salmonella* cada año en los Estados Unidos, con más de 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes (Atlas of *Salmonella*, 2013).

Salmonella pertenece a las bacterias gran negativas que no esporulan, son microorganismos mesófilos (temperatura óptima de 35-37°C, pero se pueden desarrollar de 5-46°C). No resisten la pasteurización, es sensible a pH <4.5. Sobrevive en largos periodos de congelación (Ray & Bhunia, 2010). Forma biofilms por medio de la producción de lipopolisacáridos, acumula osmoprotectores a base de Prolina, Glicina-betaina, Ectoina y Trealosa (Finn, et.al., 2013).

Los serotipos de *Salmonella* se engloban dentro de una especie, *Salmonella choleraesuis*. Existen más de 2,000 serotipos diferentes que se agrupan en seis grupos. Grupo A: *S. paratyphi* A; grupo B: *S. typhimurium* y *S. bredeney*; grupo C1: *S. choleraesuis*, *S. montevideo* y *S. oranienburg*; grupo C2: *S. Newport*; grupo D: *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. dublín* y *S. gallinarum*; grupo E1: *S. butantan*,

S. anatum y *S. give*. La salmonelosis puede observarse bajo cinco diferentes síndromes clínicos, que se presentan de forma exclusiva o superpuesta y que corresponden a los siguientes: portador asintomático, gastroenteritis aguda, bacteriemia (la presencia de una bacteriemia por *Salmonella* obliga a descartar la existencia de una infección por el VIH), infecciones focales (meningitis, osteomielitis o abscesos) y fiebre tifoidea (Puerta, 2010).

Salmonella tiene la habilidad para invadir las células, para replicarse intracelularmente y la posibilidad para producir toxinas. Dependiendo del serotipo algunas pueden infectar el hígado, el bazo, los huesos, las meninges y otro órganos. La respuesta inflamatoria aguda causa diarrea, ulceración y destrucción de la mucosa produciendo la enfermedad sistémica. Después de la ingestión de *Salmonella* la bacteria enteroinvasiva prolifera en la luz intestinal y se adhiere a las microvellosidades mediante receptores específicos y penetra en las células del colon, donde se multiplica e infecta a otros enterocitos dentro de las células intestinales, las bacterias pasan a través de la barrera gástrica e invade la mucosa del intestino. Estas producen toxinas que activan a la adenilil ciclasa incrementando la secreción del AMP cíclico y en consecuencia hay un aumento en la secreción del agua y electrolitos que se manifiestan en diarrea. Así también la invasión de las células epiteliales estimulan la liberación de citosinas proinflamatorias las cuales inhiben la síntesis de proteínas y estimulan la secreción de agua y electrolitos induciendo inflamación y diarrea. En casos graves la *Salmonella* atraviesa la lámina propia para diseminarse sistémicamente (Figura 4). (Alanis, 2006).

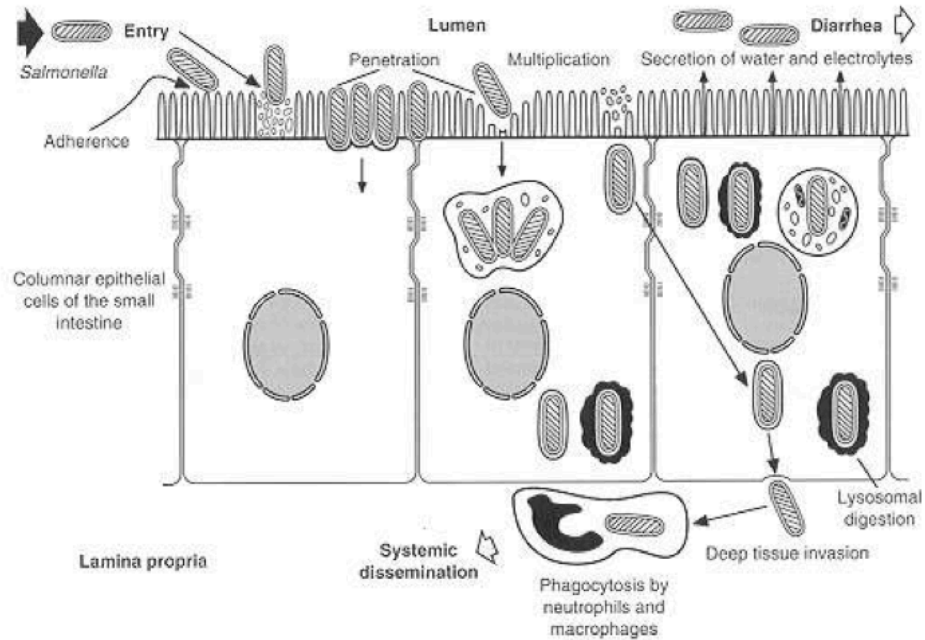


Figura 4. Mecanismo de patogenicidad de *Salmonella*. (Fuente: Alanis, 2006).

En el medio EMB-L, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 adquiere el color del medio como se muestra en la imagen 5.



Figura 5. Imagen del crecimiento de colonias de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 en medio EMB-L. Fuente propia.

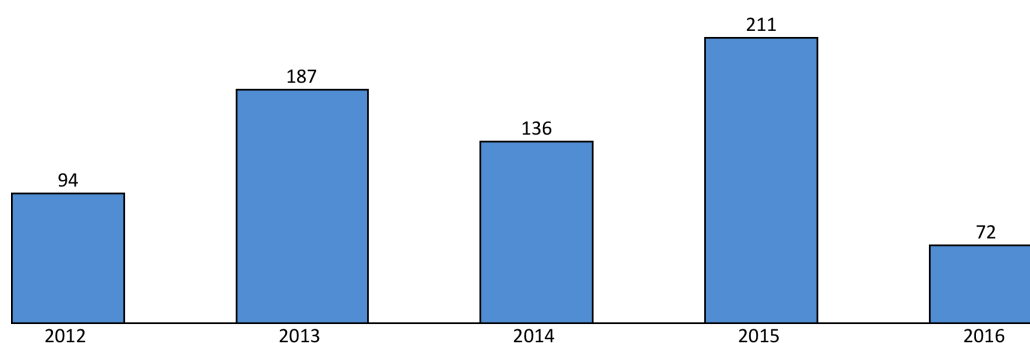
4.4 ALERTAS DE IMPORTACIÓN POR LA FDA

La FDA es la agencia del gobierno de Estados Unidos que se encarga de regular los alimentos y medicamentos que se comercializan en ese país para garantizar la seguridad de los consumidores estadounidenses.

Las alertas de importación de productos frescos generadas por la FDA, tienen gran impacto en los productores mexicanos, ya que una vez que se genera una alerta, sea por plaguicidas o por contaminación microbiológica, la acción inmediata por parte de los importadores es cancelar las importaciones del producto en cuestión, hasta que se valide la calidad de los productos, por lo cual, es de suma importancia tener en consideración las alertas, ya que más del 80% de las frutas y hortalizas frescas importadas por E.E.U.U. proviene de México (Salmones, 2016).

En el cuadro 2 se muestra el número de alertas por año que se han reportado por la FDA en los últimos años.

Cuadro 2. NOTIFICACIONES DE ALERTAS POR LA FDA AL AÑO



Fuente: Salmones, 2016.

De 2012 a lo que llevamos de 2016, se han reportado 700 alertas de las cuales 84 han sido por microorganismos y 616 por contaminantes químicos (Salmones, 2016).

De las alertas por microorganismos, se han dividido en los siguientes patógenos:

Cuadro 3. Distribución de microorganismos patógenos en las alertas.

2013	2014	2015	2016
74% Salmonella	80% Salmonella	58% Salmonella	100% Salmonella
26% Cyclospora	20% Listeria	42% Listeria	

Fuente: Salmones, 2016.

Las alertas por estado se han dividido como se muestra en la figura 6 y en el cuadro 4.



Figura 6. Mapa de distribución de alertas en México.

Cuadro 4. Distribución de alertas por Estado

ESTADO	ALERTAS	ESTADO	ALERTAS
BC	97	GTO	18
PUE	71	BCS	16
CHIH	67	NAY	15
MICH	43	AGS	12
SIN	40	CHIS	12
COL	29	YUC	12
CDMX	29	MEX	10
NL	27	SLP	9
MOR	26	ZAC	7
JAL	25	COAH	4
SON	24	QRO	3
VER	23	CAMP	2
TAMPS	21	TAB	2

Fuente: Salmenes, 2016.

4.5 BROTES DE ENFERMEDADES A CAUSA DE *E. coli* y *Salmonella* spp.

Cuando dos o más personas tienen la misma enfermedad de la misma comida o bebida contaminada, el evento se cataloga como un brote de enfermedades transmitidas por alimentos (CDC a, 2016).

4.5.1 Brotes por *E. coli*

Los datos que se muestran en el cuadro 5, pertenecen a brotes presentados en Estados Unidos, los cuales son publicados en la página del centro para el control y prevención de enfermedades (CDC), aplicables a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con *E. coli*.

Cuadro 5. Brotes de ETA's contaminados con *E. coli* en E.U. de 2010 a 2015

AÑO	No. BROTES	ENFERMOS	HOSPITALIZADOS	MUERTOS
2010	34	364	92	1
2011	30	661	96	2
2012	30	539	95	3
2013	32	473	144	2
2014	29	284	76	2
2015	40	469	102	0

FUENTE: CDC b, 2016.

4.5.2 Brotes por *Salmonella* spp.

Los datos que se muestran en el cuadro 6, pertenecen a brotes presentados en Estados Unidos, los cuales son publicados en la página del centro para el control y prevención de enfermedades (CDC), aplicables a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con *Salmonella* spp.

Cuadro 6. Brotes de ETA's contaminados con *Salmonella* spp. en E.U. de 2010 a 2015

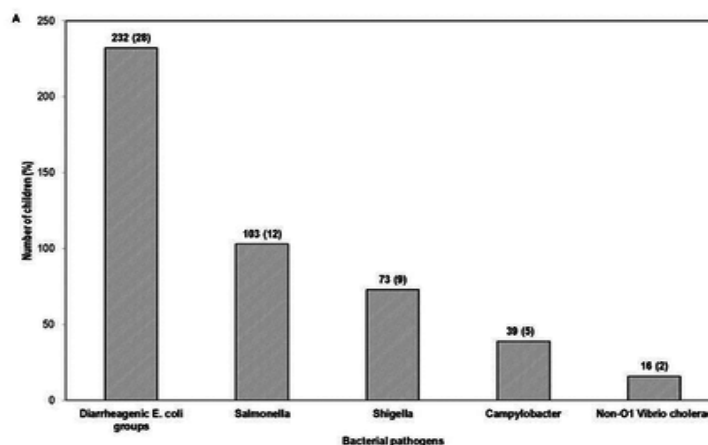
AÑO	No. BROTES	ENFERMOS	HOSPITALIZADOS	MUERTOS
2010	132	4461	330	1
2011	118	3198	482	5
2012	118	3456	532	5
2013	161	3642	632	4
2014	154	2597	401	1
2015	163	4070	571	8

FUENTE: CDC b, 2016.

4.5.3 Situación en México

En México, las enfermedades causadas por diarrea continúan siendo un problema de salud nacional. Es la segunda causa de morbilidad y la quinta causa de mortalidad entre los niños menores de cinco años de edad. En 2010, se registraron más de 5.5 millones de casos de diarrea para una tasa nacional de 5,264.24 por cada 100,000 habitantes; la mayoría de estos casos ocurren en niños pequeños (Vargas, Et.Al., 2015).

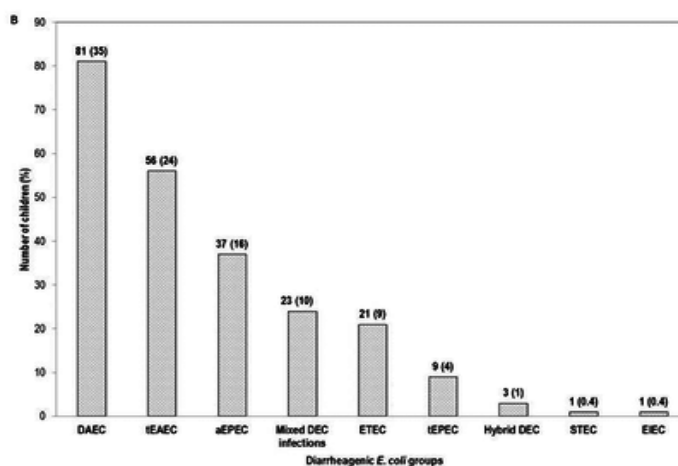
De acuerdo con los resultados obtenidos en un estudio realizado durante cuatro años en el estado de Yucatán, se demostró que la bacteria que causa más diarreas en ese estado es *E. coli*, seguida de *Salmonella* (Figura 7), estos resultados, pueden proporcionar una idea general de la situación que se vive a nivel nacional en nuestro país.



FUENTE: Vargas, Et.Al., 2015

Figura 7. Porcentaje de afectación por bacterias causantes de diarreas en 831 niños de Yucatán, Méx.

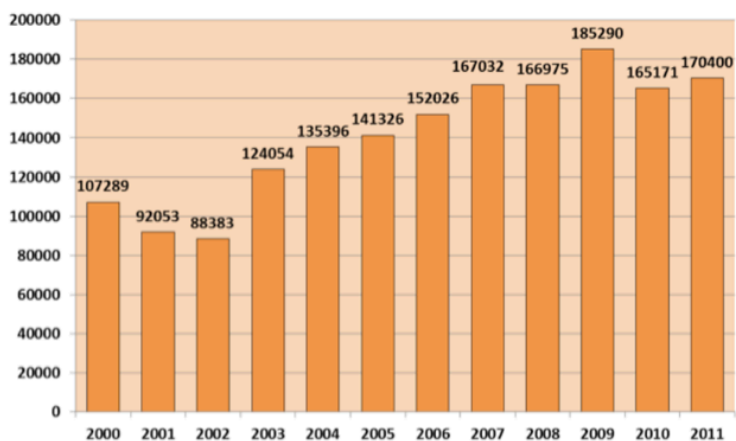
De los brotes generados por *Escherichia coli*, los grupos de más afectación se describen en la figura 8.



FUENTE: Vargas, Et.Al., 2015

Figura 8. Distribución de los grupos de *Escherichia coli*, encontrados en niños de Yucatán, Méx.

La salmonelosis como se ha visto, es una infección de importancia en salud pública debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados. Es una enfermedad transmitida por los alimentos los cuales causan la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas y aunque puede ser causada por cualquiera de los casi 2,500 serotipos que existen hasta hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia en México son *Salmonella enteritidis* y *S. typhimurium* (MPEVE, 2012)(Figura 9)



FUENTE: SINAVE/DGE/Salud/Subsistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedad

Figura 9. Tendencia de Salmonelosis en México de 2000 a 2011.

A diferencia de Estados Unidos, en México, no se tiene un monitoreo y registro exhaustivo en referencia a los brotes provocados por el consumo de alimentos contaminados por enterobacterias, sin embargo, se pueden referenciar algunos casos, como los que se enlistan a continuación:

- De Mayo a Agosto 2011. Se investigó la exportación de papayas de los principales estados productores de México, enviados a EE. UU. Debido a 100 casos de *Salmonella* Agona. (FDA, 2011).
- Marzo 2012. Tabasco. Se reportaron aproximadamente 871 personas enfermas, presuntamente por el consumo de agua contaminada con *Escherichia coli*. (Barboza, 2012).
- Octubre 2014. Recall de 6,215 libras de Chile Serrano presuntamente contaminado con *Salmonella* spp., el cual fue producido en México y comercializado en EE. UU. (FSN, 2014).
- Septiembre 2015. Norte del País. Se reportaron 907 casos de salmonelosis causado por *Salmonella poona*, en pepinos cultivados en Baja California, México y exportados a varios estados de EE. UU. (CDC-FDA, 2016).

Esta información nos permite tomar conciencia en la importancia del manejo adecuado de los productos que producimos y consumimos.

4.6 GRANADA (*Punica granatum*)

Clasificación taxonómica:

División: Fanerógamas.

Clase: Dicotiledóneas.

Subclase: Arquiclamídeas.

Orden: Myrtales.

Familia: Punicaceae.

Género: *Punica*.

Especie: *Granatum*.



Figura 10. Fruto de *Punica granatum*. Fuente propia

La granada (*Punica granatum* L.) (Figura 10), es un cultivo que se desarrolla en diversos climas, desde zonas semi-áridas templadas a climas subtropicales. Según su hábito de crecimiento y porte, la granada se clasifica como arbusto leñoso muy ramificado y con tendencia basítona con crecimiento concentrado en la base de la planta, tendiente a formar varios tallos desde la base y su altura no supera los 3 metros (Sudzuki, 1996. Zoppolo y Fasiolo, 2015).

Tiene un sistema radicular denso y superficial lo que le proporciona gran capacidad de absorción. Las yemas tanto vegetativas como mixtas son de color rojizo, las hojas son lanceoladas y color verde brillante. Las flores se desarrollan en las axilas de las hojas de la rama del año, son muy vistosas de color rojo (también las hay blancas y combinadas), hermafroditas y pueden aparecer en solitario o en grupos de 2-3 flores. Las mismas presentan un receptáculo en forma de copa que contiene al ovario ínfero (Figura 11).



Figura 11. Flores de *P. granatum*. Fuente propia

El fruto es de forma globosa de 10-15 cm de diámetro, en su interior está dividido por tabiques que contienen los arilos. Estos últimos son la parte comestible del fruto y están formados por la semilla y una pulpa jugosa de color rojo con alto contenido de antocianos y sólidos solubles (Botti et al., 1999; Sepúlveda et al., 2000; García, 2011; Zoppolo y Fasiolo, 2015).

4.6.1 Usos de la granada

La granada (*Punica granatum* L.), fruto antiguo, místico y distintivo, fue alabado en la antigüedad en diferentes escritos tales como la Biblia, el Torá judío y el Talmud de Babilonia como una fruta sagrada con poderes sobre la fertilidad, la abundancia y la buena suerte. También destaca en ciertas ceremonias, arte y mitología de los egipcios y los griegos y fue el emblema personal del emperador romano Máximo (Carbonell y Calín, 2013).

Además de estos usos históricos, la granada se utiliza en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades en distintos tipos de medicina. La medicina Ayurveda (medicina hindú) considera la granada como un fármaco adecuado para el tratamiento de parásitos, diarrea, úlceras y considera que tiene carácter depurativo. La granada sirve también como remedio para la diabetes en la medicina Unani que se practica en la India. El enorme interés que existe en la

actualidad sobre las bondades medicinales y nutricionales de la granada comenzó en el año 2000 y desde ese momento se han generado más de 200 referencias en las que se describen los efectos beneficiosos sobre la salud de la granada y sus productos derivados (Carbonell y Calín, 2013). En el cuadro 7 se muestra el uso que se le da a la granada en diferentes partes del mundo.

Cuadro 7. Usos de *P. granatum* en diferentes partes del mundo.

Nombre común	Distribución	Parte usada	Usos
Apinkoya, Magraner, Manglano, Mingrana, Milingrandeira y Romazeira	España y Latino-América	Raíz y tronco Cáscara del fruto Fruto	Parasitosis intestinal. Diarrea, disentería e infecciones. Gripe, resfriados.
Dadima, Darim, Mathalanarakom, Pomegranate y Posnar	India	Raíz Fruto	Abortivo y antihelmíntico. Lepra, leucorrea, menorragia, úlceras pépticas, disentería y diarrea.
Granada, granado y Pomegranate	Argentina, Cuba, Guatemala, Perú, Honduras, México, Venezuela e Islas Canarias	Corteza del tronco Fruto Jugo Raíz Flores	Úlceras, emenagogo, pulmón, disentería y diarrea. Antihelmíntico, detener el sangrado excesivo de la menstruación, enteritis, diarrea, infecciones del tracto respiratorio y urinario. Diarrea, disentería y antihelmíntico. Tenias y antihelmíntico. Inflamación garganta y enteritis.
Melograno, Qsur roman y Ranato	Italia	Cáscara del fruto	Inflamación
Mkoma manga	Este de África	Corteza de raíz	Antihelmíntico
Nar	Turquía	Corteza del tronco	Diarrea
Pomegranate, Roma y Romeira	Turquía, Egipto, Inglaterra, Nepal, EUA Grecia.	Cáscara del fruto Corteza de raíz y tallo	Anticonceptivo y traqueobronquitis. Ducha vaginal, diarrea, antihelmíntico y fiebre.
Roman	Egipto y Etiopía	Fruto Hojas Corteza de raíz	Lesiones piel. Antihelmíntico. Emenagogo
Sham al-rumman	Arabia	Cáscara del fruto	Anticonceptivo
Thab thim	Tailandia	Raíz Cáscara de fruto	Antihelmíntico. Diarrea y disentería.

Fuente: Alanis, 2006.

4.6.2 Constituyentes químicos de la granada

El estudio de los componentes bio-activos de la granada y sus efectos sobre la mejora de la salud humana es un campo de investigación de gran actualidad y del máximo interés. Se ha comprobado mediante numerosos estudios

científicos que tanto la granada como sus productos derivados contienen numerosos componentes que pueden servir para la prevención de enfermedades y para el mantenimiento de la salud (Larrosa et al., 2006; Sartippour et al., 2008; Koyama et al., 2010).

La granada posee numerosos compuestos químicos de alto valor biológico en sus diferentes partes: corteza, membranas carpelares y semillas. Alrededor del 50 % del peso total de la granada corresponde a la corteza y a las membranas carpelares, que son una fuente importante de compuestos bio-activos como polifenoles, flavonoides, elagitaninos, proantocianidinas y minerales principalmente potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y sodio (Carbonell y Calín, 2013).

La cáscara del fruto tiene mucílagos; lignanos; caroteno; crisantemina; niacina; pectina; ácidos orgánicos (ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido pantoténico, ácido clorogénico, ácido neoclorogénico y ácido cumarínico); ácidos inorgánicos (ácido bórico); **taninos** (cianina, ácido elágico, malvidina, pelorganidina, punicalina punicalagina); flavonoides (luteolina, quercetina y camperol) y azúcares (fructosa, glucosa y maltosa), (Alanis, 2006).

La actividad antimicrobiana de la granada y sus productos derivados ha sido demostrada en numerosos estudios en los que se ha comprobando la inhibición de la actividad de numerosos microorganismos (Reddy et al., 2007; McCarrell, 2008; Al-Zoreky 2009; Choio et al., 2009; Gould et al., 2009).

Alanis (2006) evaluó extractos metanólicos y acuosos de *Punica granatum*, entre otros, contra ocho cepas bacterianas enteropatógenas (*Escherichia coli* enteroemorrágica O157:H7, dos cepas de *Shigella sonnei*, dos cepas de *Shigella flexneri*, dos cepas de *Salmonella* sp. y como cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922), observando que la mejor actividad antibacteriana fue en la concentración de 8 mg/mL.

Reddy et al. (2007) demostraron que diferentes extractos de granada en diferentes disolventes (agua, etanol, etc.) mostraron una actividad antimicrobiana significativa frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *S. aureus*.

Al-Zoreky (2009) demostró que los extractos de la piel de granada son un potente inhibidor del crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* y *Yersinia enterocolitica*.

Choi et al. (2009) investigaron el efecto in vivo e in vitro de la aplicación de diferentes concentraciones de extractos de piel de granada para inhibir el crecimiento de *Salmonella*, comprobando que la dosis mínima era de 62.5 mg/L.

En general, el elevado potencial inhibidor de la granada y sus productos derivados se atribuye a la elevada concentración de compuestos tales como polifenoles, taninos y antocianinas. Estudios muy recientes han comprobado que el uso de productos derivados y subproductos, como condimento alimentario, además de mejorar su capacidad antioxidante asegura una total inocuidad debido a la gran capacidad de la granada y sus extractos en la inhibición de la actividad de los microorganismos que causan el deterioro de los alimentos (Navarro et al., 2011; Viuda-Martos et al., 2011).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en dos etapas:

En la Primer etapa *in vitro* se evaluaron diez extractos orgánicos de plantas Sábila (*Aloe vera*), Orégano (*Origanum vulgare*), Romero (*Rosmarinus officinalis*), Ajenjo (*Artemisia absinthium*), Ruda (*Ruta graveolens*), Palán (*Nicotiana glauca*), Gobernadora (*Larrea tridentata*), Tomillo (*Thymus vulgaris*), Granada (*Punica granatum*) y Aguacate (*Persea drymifolia*); 3 extractos metanólicos de Orégano (*Origanum vulgare*), Gobernadora (*Larrea tridentata*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*); 1 aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*).

En la segunda etapa *in vivo*, se evaluaron los mejores extractos orgánicos, obtenidos en la etapa *in vitro*, para reducir las poblaciones de *S. typhimurium* ATCC 14028 y *E. coli* ATCC 25922 de la superficie de frutos de Melón Chino, Jitomate y follaje de Cilantro.

5.1 Evaluación *in vitro*

Esta evaluación se realizó en cuatro diferentes momentos, con diferentes extractos, como se describe a continuación.

5.1.1 Obtención de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Escherichia coli* ATCC 25922

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se compraron al laboratorio PROQUIFA.

5.1.2 Especies de plantas utilizadas para la preparación de extractos

El establecimiento de los experimentos se realizó en 4 diferentes momentos, utilizándose distintas plantas para la preparación de los extractos orgánicos.

En un principio se evaluaron 6 especies vegetales: Sábila (*Aloe vera*), Orégano (*Origanum vulgare*), Romero (*Rosmarinus officinalis*), Ajenjo (*Artemisia absinthium*), Ruda (*Ruta graveolens*), Palán (*Nicotiana glauca*).

En un segundo experimento se utilizaron: Orégano (*Origanum vulgare*) acuoso y metanolico, Gobernadora (*Larrea tridentata*) acuoso y metanolico, Tomillo (*Thymus vulgaris*) acuoso y metanolico.

En la tercera ocasión se evaluó: Granada (*Punica granatum*), Orégano (*Origanum vulgare*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*), todos los extractos preparados fueron acuosos.

Por último se utilizaron especies de: Tomillo (*Thymus vulgaris*) Acuoso y Aceite esencial, (el aceite esencial de tomillo se compró en la farmacia París de la Ciudad de México) y Aguacate (*Persea drymifolia*) acuoso.

5.1.3 Preparación de extractos orgánicos

La preparación de extractos vegetales se realizó de cuatro formas diferentes, los cuales se describen a continuación:

5.1.3.1 Macerado acuoso

Para la preparación de estos extractos, se pesó un gramo del tejido vegetal, específicamente follaje, el cual se desinfectó, sumergiendo el tejido en

hipoclorito de sodio al 1%, durante un minuto, al término de este tiempo el tejido se enjuagó tres veces con agua destilada estéril, posteriormente se colocó en un mortero para ser macerado, al cual se le agregaron 2 mL de agua destilada estéril.

Una vez obtenido el macerado se sumergieron los discos de papel filtro watman N°1 previamente esterilizados, dejándose los discos sumergidos por alrededor de 1 min, para posteriormente establecer el experimento.

5.1.3.2 Molido acuoso

Este método fue adaptado de Alanis, 2006. Los extractos acuosos se prepararon moliendo en licuadora 5 g del tejido vegetal seco, posteriormente sumergiendo el tejido molido en 150 mL de agua destilada estéril y por último dejando reposar esta mezcla por 24 h. Pasadas las 24 h, se filtró el material vegetal y se vació en un frasco ámbar, para su conservación.

5.1.3.3 Molido metanólico

Los extractos metanólicos se prepararon moliendo en licuadora 5 g del tejido vegetal seco, posteriormente sumergiendo el tejido molido en 150 mL de metanol y dejando reposar la mezcla por 24 h. Una vez transcurridas las 24 h., se procedió a filtrar los preparados y a someterlos a un proceso de destilado rotativo al vacío (rotovaporización) para concentrar los metabolitos. Una vez evaporado el metanol, se lavó el matraz con 2 ml de metanol y se vació el extracto en frascos ámbar.

5.1.3.4 Cocción acuoso

Este método fue adaptado de Alanis, 2006. El extracto se preparó moliendo en licuadora 5 g del tejido vegetal seco, después el producto molido se sumergió

en 150 mL de agua destilada estéril y se dejó reposar por 24 h. Posteriormente se sometió a cocción por 10 min y por último se filtro el material vegetal y se vació en un frasco ámbar para su conservación.

5.1.4 Siembra bacteriana

La siembra de las cepas se realizó utilizando el medio E.M.B.-L, (Eosina y Azul de Metileno).

La siembra bacteriana se realizó durante la preparación del medio; una vez que el preparado se sustrajo de la autoclave se mantuvo a temperatura constante de 40 °C, una vez alcanzada esta temperatura, se le añadieron 5 mL de suspensión bacteriana, a una concentración de 3×10^7 UFC por cada 100 mL de medio, se mezclo y se vació el medio en cajas Petri, repitiéndose esta operación con cada una de las cepas, posteriormente se permitió solidificar el medio a temperatura ambiente por unos minutos, para proseguir con el establecimiento del experimento.

5.1.5 Establecimiento de los experimentos *in vitro*

Las características involucradas en el establecimiento de los experimentos *in vitro* descritos anteriormente se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro 8. Establecimiento de los experimentos *in vitro* para evaluar la inhibición de *S. typhimurium* y *E. coli* con extractos orgánicos en Chapingo, México, 2016.

Evaluación	No. de repeticiones	Tipo de extracto	Especies vegetales	Concentración
1	4	Macerado acuoso	Sábila, Orégano, Romero, Ajenjo, Ruda y Palán	100 %
2	2	Molido acuoso y metanólico	Orégano, Gobernadora y Tomillo	200, 400, 800 y 1600 ppm
3	4	Cocción acuoso	Granada, Orégano y Tomillo	200, 400, 800 y 1600 ppm
4	4	Cocción acuoso y aceite esencial	Tomillo (acuoso y aceite esencial) y Aguacate acuoso	400, 800 y 1600 ppm

El establecimiento de todos los experimentos se realizó en ambiente controlado y de los cuales se tomaron los datos para posteriormente realizar el análisis estadístico consistió en preparar el medio EMB-L y mezclar la suspensión bacteriana como se describe en el punto 5.1.4, es decir, mantener la temperatura constante del medio a 40 °C, para evitar su solidificación y añadirle por separado 5 mL de cada suspensión bacteriana *S. typhimurium* ATCC 14028 y *E. coli* ATCC 25922 a una concentración aproximada de 3×10^7 UFC por cada 100 mL de medio para cada una de las bacterias; posterior a ello se mantuvieron las cajas Petri a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min y enseguida se colocaron los tratamientos.

El establecimiento de los tratamientos consistió en sumergir discos de papel filtro watman No. 1, previamente esterilizados, en los extractos realizados mediante el método de cocción acuoso de Granada, Orégano, Tomillo, Aguacate y aceite esencial de Tomillo, a las concentraciones de 400, 800 y 1600 ppm. La decisión de utilizar estos extractos para la evaluación final *in vitro* se tomó porque estos extractos fueron los que presentaron mayor halo de inhibición en las pruebas previas.

Una vez que los discos se encontraron impregnados con los diferentes extractos, se colocaron 4 repeticiones por caja Petri en los cuatro puntos cardinales y se colocó en el centro un control, que consistió en la colocación de un disco de papel filtro watman No. 1 previamente sumergido en agua destilada estéril. Posterior a esto, las placas se incubaron a $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$.

Por último, la sensibilidad de las diferentes cepas bacterianas a los extractos se midió en términos de zona de inhibición de cada disco, evaluándose a las 24, 48 y 72 h del establecimiento de los experimentos.

La evaluación de los experimentos *in vitro*, se realizó midiendo con un vernier la zona de inhibición de cada uno de los disco de papel filtro cada 24 h, durante tres días (Figura 12).

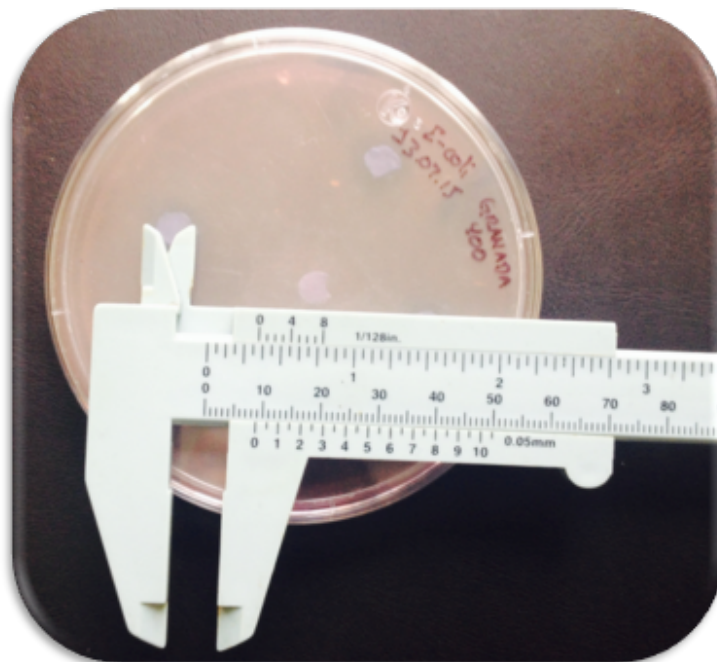


Figura 12. Forma en que se realizó la medición de la zona de inhibición generada por cada disco de papel filtro atribuido al efecto de los extractos evaluados.

5.2 Evaluación *in vivo*

Esta evaluación se realizó en condiciones controladas, con la finalidad de evaluar la capacidad antibacteriana de los extractos orgánicos, para ésto se emplearon 60 frutos de Melón chino, 60 frutos de Jitomate y 60 ramas de Cilantro (Cuadro 9), a los cuales previamente se les aplicó una mezcla de suspensión bacteriana de aproximadamente 3×10^3 UFC/mL, dejándose reposar por 1 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, los productos inoculados se sumergieron en los tratamientos a evaluar.

Los tratamientos evaluados consistieron en el extracto preparado por medio de cocción acuosa de Granada (*P. granatum*) al 10%, aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*) a 90 ppm y Ácido Peracético a 90 ppm.

Cuadro 9. Descripción de los tratamientos realizados en la evaluación de la acción antibacteriana de *S. typhimurium* ATCC 14028 y *E. coli* ATCC 25922 realizada en la superficie por producto de Melón chino, Jitomate y follaje de Cilantro, en Chapingo, Méx. 2016.

Horas de evaluación	Núm. Total de Repeticiones	Granada 10 %	Tomillo 90 ppm	Ac. Peracético 90 ppm	Control
0 h	20	5	5	5	5
24 h	20	5	5	5	5
48 h	20	5	5	5	5

Para la evaluación del desarrollo del crecimiento bacteriano sobre los productos hortícolas se utilizaron dos procedimientos distintos; uno por medio de raspado de la superficie de los frutos y el otro tomando como referencia la NOM-210-SSA1-2014.

5.2.1 Raspado de la superficie de frutos de Melón chino, Jitomate y follaje de Cilantro

Este procedimiento se realizó en condiciones controladas y consistió en frotar con hisopos, previamente esterilizados, la superficie de los productos frescos; el raspado de la superficie de cada fruto se sembró en cajas Petri con medio EMB-L. Repitiéndose esta actividad a las 24 y 48 h (Figuras 13, 14 y 15). Las cajas Petri con la siembra del raspado se incubaron a $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$.



Figuras 13, 14 y 15. Establecimiento del experimento para evaluar el efecto antibacteriano de *S. typhimurium* y *E. coli*, por medio del procedimiento del raspado de la superficie de los frutos.

La evaluación del crecimiento bacteriano se realizó a las 24, 48 y 72 h de la siembra de cada una de la toma de las muestras.

Para la medición de los resultados, se realizó un muestreo por cada caja Petri, marcándose cuatro cuadros de 1cm^2 por cada caja Petri y contabilizando el número de colonias encontradas dentro de cada cm^2 (Figura 16),

La clasificación del desarrollo colonial de las bacterias se definió en porcentaje con base al número de colonias cuantificadas dentro de cada cm^2 , considerándose como 100 al número más alto, cuando el cm^2 se encontraba totalmente lleno de colonias bacterianas y 0 cuando no se apreciaba el desarrollo colonial, asignándose valores intermedios dependiendo del grado de desarrollo bacteriano dentro del cm^2 .

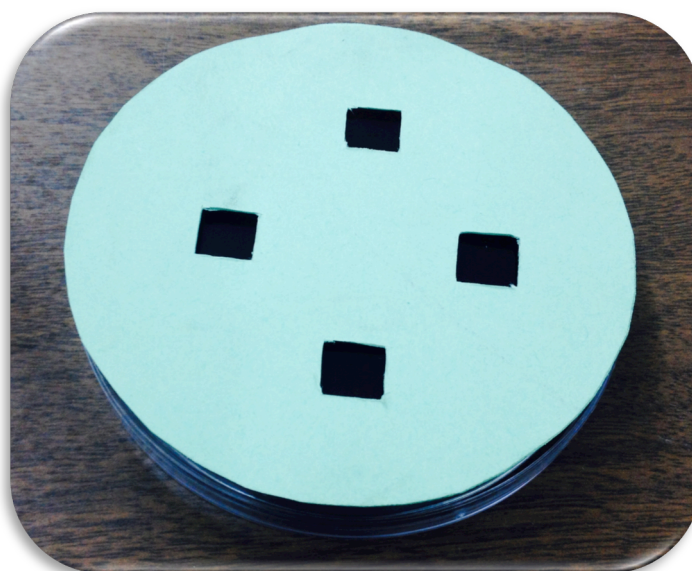


Figura 16. Ejemplo del marcado de cada uno de los cm^2 marcado en cada una de las cajas Petri para cuantificar el desarrollo del crecimiento colonial, del procedimiento por medio del raspado de la superficie de los frutos.

5.2.2 Procedimiento por medio de inmersión en agua peptonada

Para el establecimiento del experimento con este procedimiento, se tomó como referencia la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Una vez que los frutos de Melón chino, Jitomate y follaje de Cilantro se inocularon con la mezcla bacteriana de *S. typhimurium* ATCC 14028 y *E. coli* ATCC 25922, como se describió en el punto 5.2, cada uno de los frutos se colocaron en bolsas estériles individuales y se les añadió agua peptonada amortiguada previamente preparada, en una relación aproximada de 1:1.5 el peso del fruto, es decir, si el fruto pesaba 1 kg, se le colocó 1.5 L de agua peptonada con el objetivo de que el producto quedara bien sumergido. Por último se amarraron las bolsas, de tal modo que permitiera el paso del aire durante la incubación. Posterior a esto, las bolsas con el producto y el agua peptonada se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$ (Figuras 17 y 18).

Una vez transcurridas las 18 h, con una pipeta estéril se tomó una muestra de 0.5 mL del agua peptonada de cada bolsa, colocándose en cajas Petri con medio EMB-L y con ayuda de un triángulo de cristal estéril se dispersó la suspensión de cada muestra. Cuando se concluyó la siembra de la suspensión del agua peptonada en las cajas Petri de cada uno de los productos, éstas se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$.

Por último y una vez que pasaron las 24 h de incubación, se realizó la medición del crecimiento bacteriano sobre las cajas para realizar el análisis de resultados.



Figura 17 y 18. Establecimiento del experimento para evaluar el efecto antibacteriano de *S. thyphimurium* y *E. coli*, por medio del procedimiento de inmersión en agua peptonada amortiguada.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo se dividen en dos partes. La primera parte comprende los resultados de la actividad antibacteriana obtenidos de la evaluación *in vitro* de 10 extractos derivados de plantas medicinales. La segunda parte *in vivo*, incluye los resultados obtenidos a través de dos procedimientos, donde se evaluaron los mejores extractos obtenidos de la primera etapa, comparándose con un producto comercial, utilizado en los centros de manipulación (empaquete) y/o en las unidades de producción.

6.1 RESULTADOS *in vitro*.

En la primera fase de la investigación se prepararon 10 extractos acuosos, 3 extractos metanólicos y un aceite esencial, el cual fue comprado en la farmacia París de la Ciudad de México. Esta primera fase se realizó en 4 momentos diferentes, en donde se evaluaron diferentes extractos; de cada etapa se eligió el extracto con el mejor efecto inhibitorio.

Se decidió no incluir los extractos metanólicos en la evaluación *in vivo*, porque el enfoque de la investigación estuvo dirigido al cumplimiento de los requisitos de inocuidad y se consideró que el metanol pudiera representar una contaminación del tipo químico sobre los productos y se tomó la decisión de no incluirlos en la siguiente etapa.

En la primera evaluación *in vitro*, utilizando extractos preparados por medio de macerado, se observó que la planta con menor efecto inhibitorio del desarrollo bacteriano fue el Palán (*Nicotiana glauca*) y el que presentó mejor efecto fue el Orégano (*Origanum vulgare*), por lo cual el Orégano se utilizó en el segundo momento de evaluación.

En el segundo momento de evaluación se obtuvo el mejor resultado de inhibición con el extracto acuoso de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y el que presentó menor efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano fue el extracto de Gobernadora (*Larrea tridentata*).

El extracto que resultó con mejor efecto inhibitorio del desarrollo bacteriano en el tercer momento de evaluación fue el preparado con Granada (*Punica granatum*).

Por esta situación, en la última etapa *in vitro*, de la cual se tomaron los datos para realizar el análisis estadístico, sólo se consideraron los extractos acuosos de Granada (*Punica granatum*), Tomillo (*Thymus vulgaris*), Aguacate (*Persea drymifolia*) y Orégano (*Origanum vulgare*), así como el aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*).

De manera general, se observó que la cepa bacteriana con mayor susceptibilidad a los extractos la presentó *S. typhimurium* ATCC 14028, sin que se observará alguna tendencia en particular durante las horas de evaluación.

Los resultados de los análisis estadísticos que se muestran enseguida, se dividen primero en los resultados de los efectos principales (entendiéndose como efecto principal la interacción de las variables consideradas en el análisis estadístico: cepas bacterianas, horas de evaluación, los extractos evaluados y las diferentes concentraciones de los extractos) y posteriormente se presentan los resultados particulares por cepa bacteriana, extractos y concentraciones.

6.1.1 Análisis estadístico general de los resultados *in vitro*

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza combinado a través de la evaluación de la inhibición del crecimiento bacteriano, tiempo de evaluación, especie de extracto y concentración; considerando el modelo correspondiente a un experimento factorial completo. Así mismo, se realizaron comparaciones de medias a través de la Diferencia Significativa Honesta de Tukey (DSH), incluyendo los efectos principales y las correspondientes interacciones.

Se obtuvieron los siguientes resultados para los efectos principales:

Cuadro 10: Resultados del análisis de varianza, a través de la comparación de las medias de la interacción de los Efectos Principales evaluados en la etapa *in vitro* para inhibir el crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*.

Chapingo, Méx. 2016.

EFFECTO PRINCIPAL	NIVELES	MEDIAS
BACTERIA	<i>S. typhi</i>	0.82 A*
	<i>E. coli</i>	0.60 B
	Pr > F	< 0.0001
	DSH	0.0645
HORAS	72	0.73 A
	48	0.72 A
	24	0.67 A
	Pr > F	0.4224
	DSH	0.0946
EXTRACTO	Esencial	1.71 A
	Granada	1.48 B
	Aguacate	0.32 C
	Orégano	0.15 D
	Tomillo	0.10 D
	Pr > F	< 0.0001
	DSH	0.143
CONCENTRACIÓN	800	0.86 A
	1600	0.68 B
	400	0.57 C
	Pr > F	< 0.0001
	DSH	0.0946

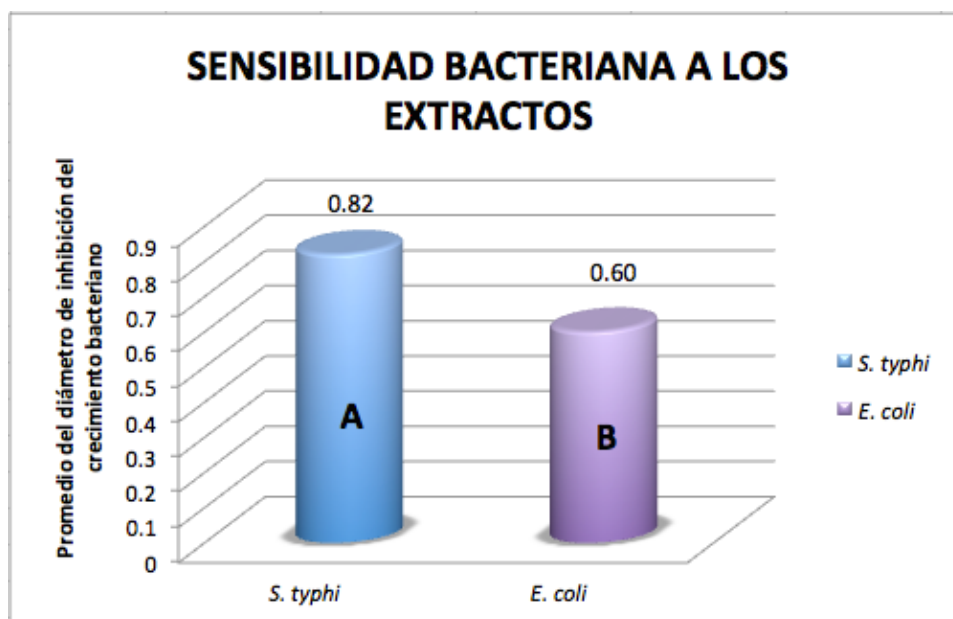
*: Medias con la misma letra dentro de cada Efecto Principal no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$).

Con base en los resultados mostrados en el cuadro 10, referentes al efecto principal de las bacterias, se concluye que hubo significativa ($p = 0.05$), entre ambas cepas bacterianas, presentando mayor sensibilidad a los extractos la cepa de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, la cual presentó un promedio de 0.82 cm de diámetro del halo de inhibición (Figura 19). Esto es congruente con lo observado durante la toma de datos de las mediciones.

Con respecto al efecto principal de las Horas, se concluye que no hubo diferencia significativa ($p = 0.05$) entre las horas de aplicación de los extractos y la toma de resultados (Figura 20).

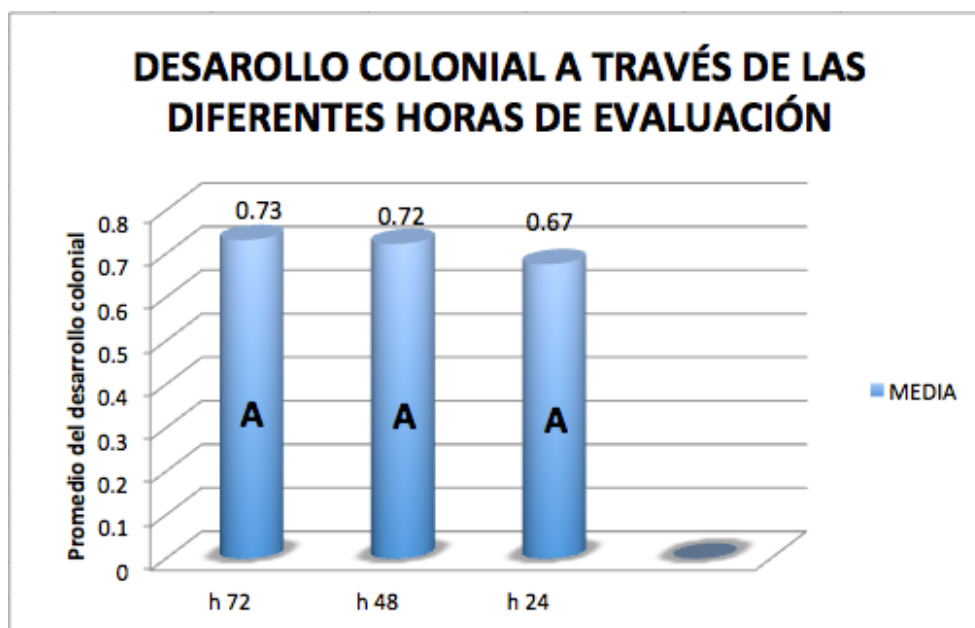
Con referencia a los extractos evaluados, se puede observar que hubo diferencia significativa ($p = 0.05$) entre el aceite esencial de Tomillo, el extracto acuoso de Granada y el extracto acuoso de Aguacate; sin embargo, los extractos acuosos de Orégano y Tomillo no mostraron diferencia significativa. Así mismo, el aceite esencial de Tomillo fue el que presentó mayor inhibición con un promedio de 1.71 cm de diámetro, seguido del extracto acuoso de Granada con un promedio de 1.48 cm de diámetro de inhibición (Figura 21).

Por último, los resultados referentes a las concentraciones, se observó que hubo diferencia significativa ($p = 0.05$) entre las tres concentraciones evaluadas presentando mayor inhibición a 800 ppm, con 0.86 cm de diámetro, seguida de 1600 ppm con 0.68 cm y por último la que tuvo menor control fue a 400 ppm con 0.57 cm del halo de inhibición (Figura 22).



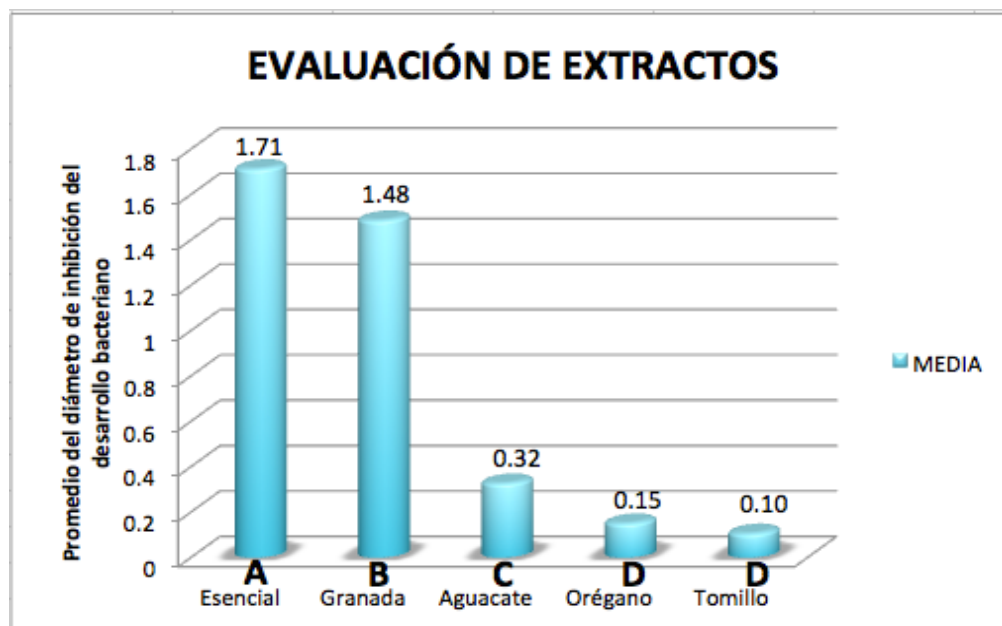
*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 19. Gráfica de los resultados generales del análisis de varianza comparando la sensibilidad de las cepas bacterianas a los extractos utilizados en la evaluación.



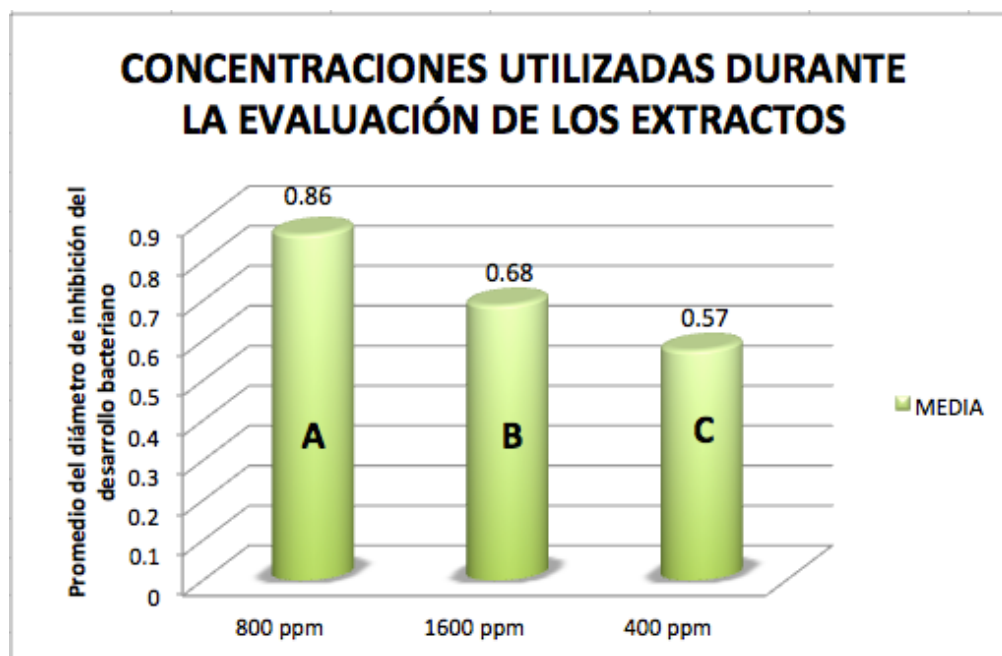
*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 20. Gráfica de los resultados generales del análisis de varianza comparando el desarrollo bacteriano a través de las tres horas de evaluación.



*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 21. Gráfica de los resultados del análisis de varianza del desarrollo colonial, combinando ambas cepas bacterianas, comparado con los extractos orgánicos.



*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 22. Gráfica de los resultados del análisis de varianza del desarrollo colonial comparado con las diferentes concentraciones utilizadas en la evaluación de los extractos orgánicos.

6.1.2 Análisis estadístico por cepa bacteriana y extracto de los resultados *in vitro*

El análisis de varianza se realizó con el mismo método que los resultados generales (mostrados anteriormente). La comparación de medias se realizó separando de susceptibilidad de cada cepa bacteriana a los extractos y a las concentraciones; la hora no se tomó en consideración, ya que los resultados generales mostraron que no hubo diferencia entre ellas.

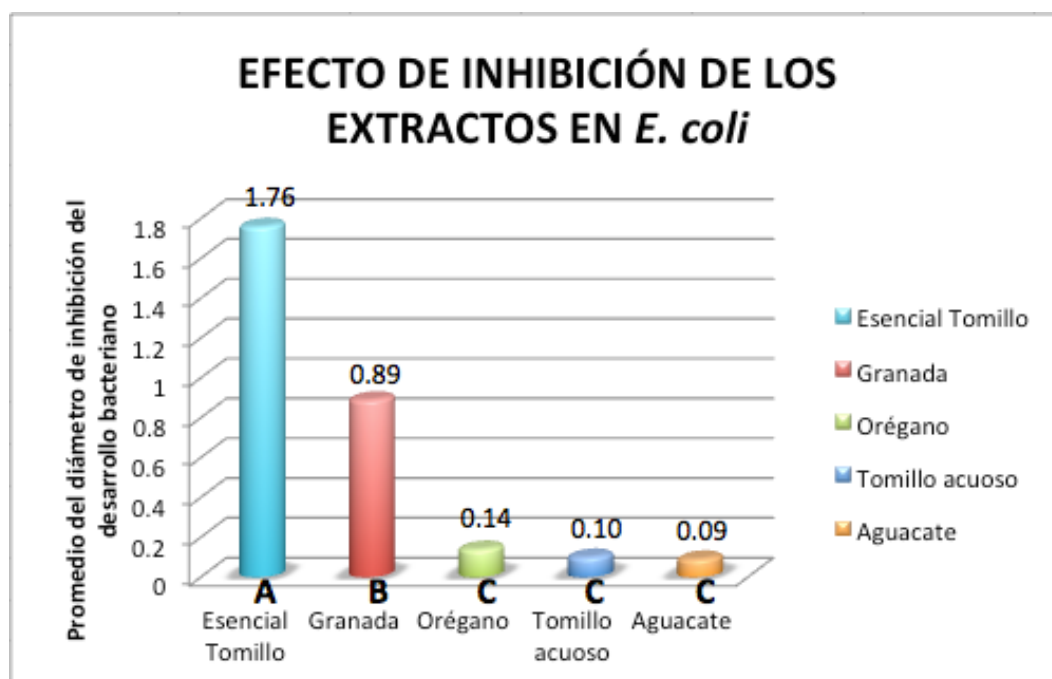
Cuadro 11: Resultados del análisis de varianza, a través de la comparación de las medias de las interacciones de los efectos por cepa bacteriana, evaluados en la etapa *in vitro*. Chapingo, Méx., 2016.

EFEECTO EN <i>Escherichia coli</i>	NIVELES	MEDIAS
Extractos	Esencial Tomillo	1.76 A*
	Granada	0.89 B
	Orégano	0.14 C
	Tomillo acuoso	0.10 C
	Aguacate	0.09 C
	Pr > F	< 0.0001
	DSH	0.0982
Concentración	800 ppm	0.81 A
	1600 ppm	0.51 B
	400 ppm	0.47 B
	Pr > F	< 0.0001
	DSH	0.0652
EFEECTO EN <i>Salmonella typhimurium</i>	NIVELES	MEDIAS
Extractos	Granada	2.08 A
	Esencial Tomillo	1.63 B
	Aguacate	0.49 C
	Orégano	0.15 D
	Tomillo acuoso	0.10 D
	Pr > F	< 0.0001
	DSH	0.2627
Concentración	800 ppm	0.91 A
	1600 ppm	0.86 A
	400 ppm	0.67 B
	Pr > F	0.0004
	DSH	0.1702

*: Medias con la misma letra dentro de cada Efecto Principal no son estadísticamente diferentes, Tukey (p=0.05).

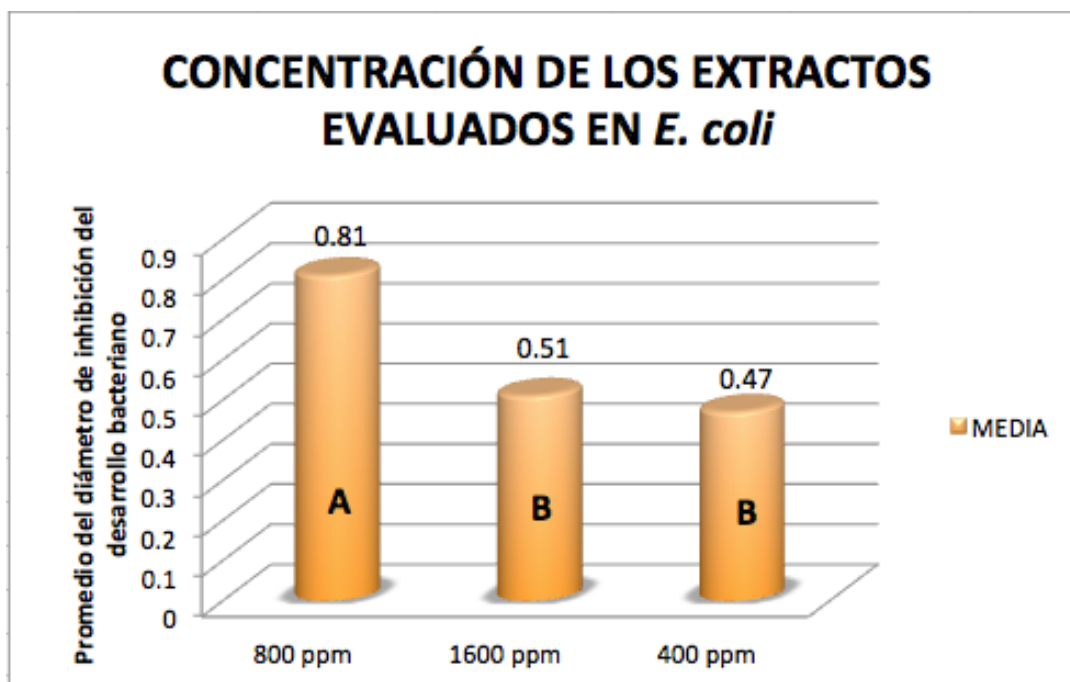
Los resultados observados en el cuadro 11, muestran que *E. coli*, presentó mayor sensibilidad al aceite esencial de Tomillo, seguido del Extracto acuoso de granada, sin observarse diferencia significativa ($p = 0.05$) entre los extractos de Orégano, Tomillo acuoso y Aguacate (Figura 23). Así mismo, la concentración a la que presentó mejor efecto inhibitorio fue a 800 ppm (Figura 24). Estos resultados refuerzan los mostrados con los efectos principales.

En referencia a los resultados observados en *S. typhi*, el extracto que presentó mayor efecto inhibitorio fue el proveniente de Granada, seguido del aceite esencial de Tomillo y del extracto de Aguacate, entre los extractos de Orégano y Tomillo acuoso no se observó diferencia significativa ($p = 0.05$) (Figura 25). Con respecto a las concentraciones, en este caso no se observó diferencia significativa ($p = 0.05$) entre las concentraciones de 800 ppm y 1600 ppm, la que presentó menor efecto inhibitorio fue a 400 ppm (Figura 26).



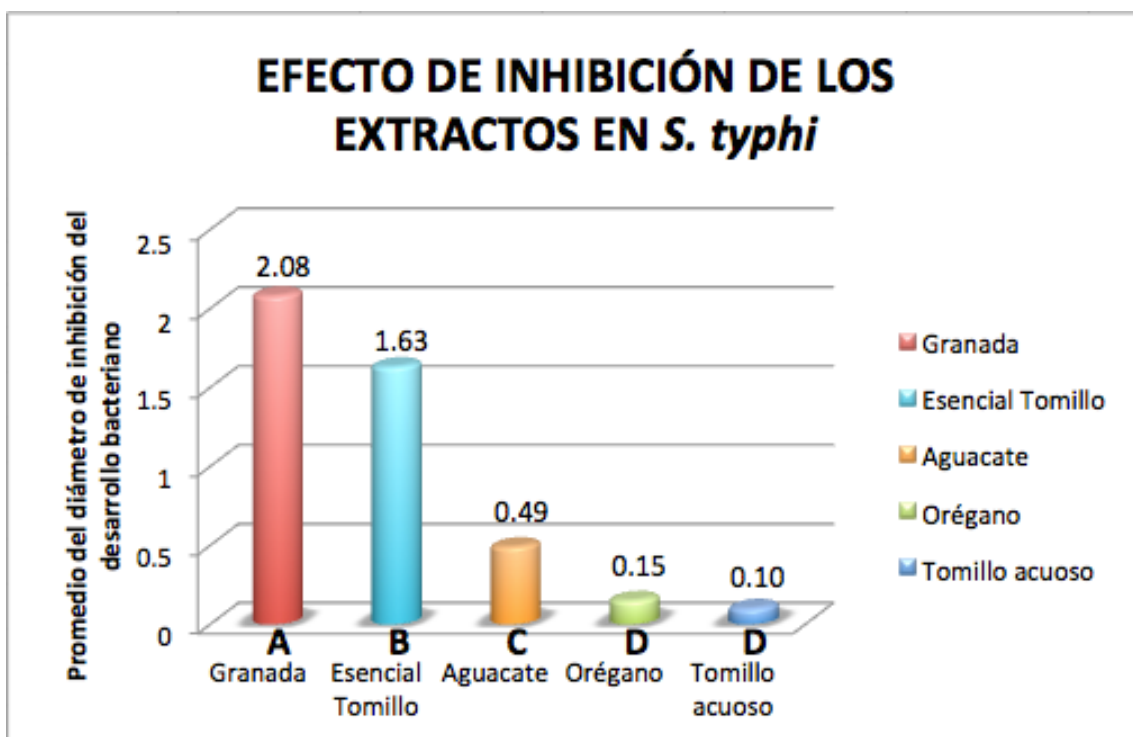
*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 23. Gráfica de los resultados del análisis de varianza de la inhibición del desarrollo colonial de *E. coli* por efecto de los extractos orgánicos.



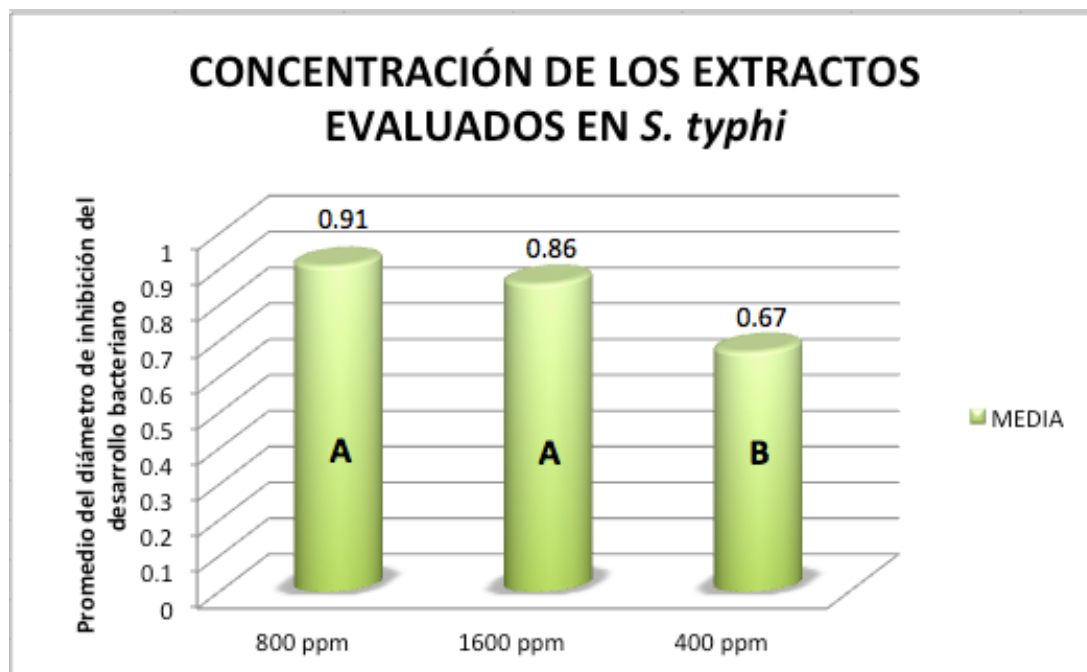
*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 24. Gráfica de los resultados del análisis de varianza del efecto de las concentraciones de los extractos orgánicos sobre la inhibición del desarrollo colonial de *E. coli*.



*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 25. Gráfica de los resultados del análisis de varianza de la inhibición del desarrollo colonial de *S. typhi* por efecto de los extractos orgánicos.



*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 26. Gráfica de los resultados del análisis de varianza del efecto de las concentraciones de los extractos orgánicos sobre la inhibición del desarrollo colonial de *S. typhi*.

6.2 RESULTADOS *in vivo*.

Los resultados de la segunda parte del trabajo de investigación, evaluación de la inhibición del desarrollo bacteriano sobre los frutos de Melón, Jitomate y follaje de Cilantro, incluye los resultados obtenidos en los dos procedimientos realizados, donde se evaluaron los mejores extractos obtenidos de la primera etapa *in vitro*, comparados con un producto comercial utilizado en los centros de manipulación (empaquete) y/o en las unidades de producción.

6.2.1 Resultados del procedimiento de raspado de la superficie del fruto

De manera general con este procedimiento se observó que en los frutos de Jitomate el desarrollo colonial fue menos abundante que lo observado en Melón. Y por efecto de los extractos evaluados, se pudo observar que el ácido peracético presentó mejor control del desarrollo colonial en comparación con los extractos evaluados.

Como se ha mencionado anteriormente, para realizar el análisis de varianza, las cajas Petri con medio, se marcaron con cuatro cuadros de 1cm^2 , contabilizándose el número de colonias que se encontraron dentro de cada uno de los cm^2 .

Los resultados de los análisis estadísticos que se muestran a continuación, se dividen primero en los resultados de los efectos principales y posteriormente se presentan los resultados por fruto y por extracto. (entendiéndose como efecto principal la interacción de las variables consideradas en el análisis estadístico: frutos, horas de evaluación y los extractos evaluados).

6.2.1.1 Análisis estadístico general de los resultados del raspado de superficie del fruto

El análisis estadístico general se realizó mediante análisis de varianza combinado a través de la evaluación en los productos frescos (frutos), hora de evaluación y los extractos; considerando el modelo correspondiente a un experimento factorial completo. Así mismo, se realizaron comparaciones de medias a través de la Diferencia Significativa Honesta de Tukey (DSH), incluyendo los efectos principales y las correspondientes interacciones. Se obtuvieron los siguientes resultados de los efectos principales:

Cuadro 12: Resultados del análisis de varianza, a través de la comparación de las medias de la interacción de los Efectos Principales evaluados en la etapa *in vivo*. Chapingo, Méx. 2016.

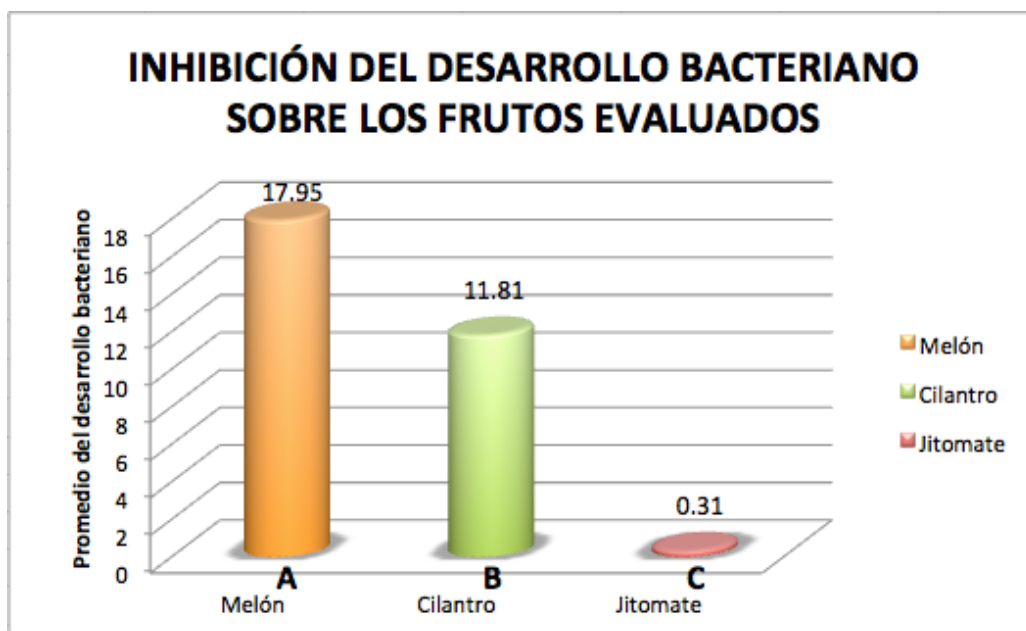
EFFECTO PRINCIPAL	NIVELES	MEDIAS
FRUTOS	Melón	17.95 A*
	Cilantro	11.81 B
	Jitomate	0.31 C
	Pr > F	< 0.0001
	DSH	2.7802
HORA DE EVALUACIÓN	24	17.27 A
	72	8.32 B
	48	4.47 C
	Pr > F	< 0.0001
	DSH	2.7802
EXTRACTOS	Control	22.05 A
	Granada	8.15 B
	Tomillo	6.84 B
	Peracético	3.05 C
	Pr > F	< 0.0001
	DSH	3.5198

*: Medias con la misma letra dentro de cada Efecto Principal no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Como se puede observar en el cuadro 12, los resultados referentes a los frutos, muestran que se encontró diferencia significativa ($p = 0.05$) entre los tres frutos evaluados, observándose que en donde se tuvo mejor control del desarrollo bacteriano fue en Jitomate, seguido de Cilantro y por último en el que se tuvo menor efecto inhibitorio del desarrollo bacteriano fue en Melón (Figura 27).

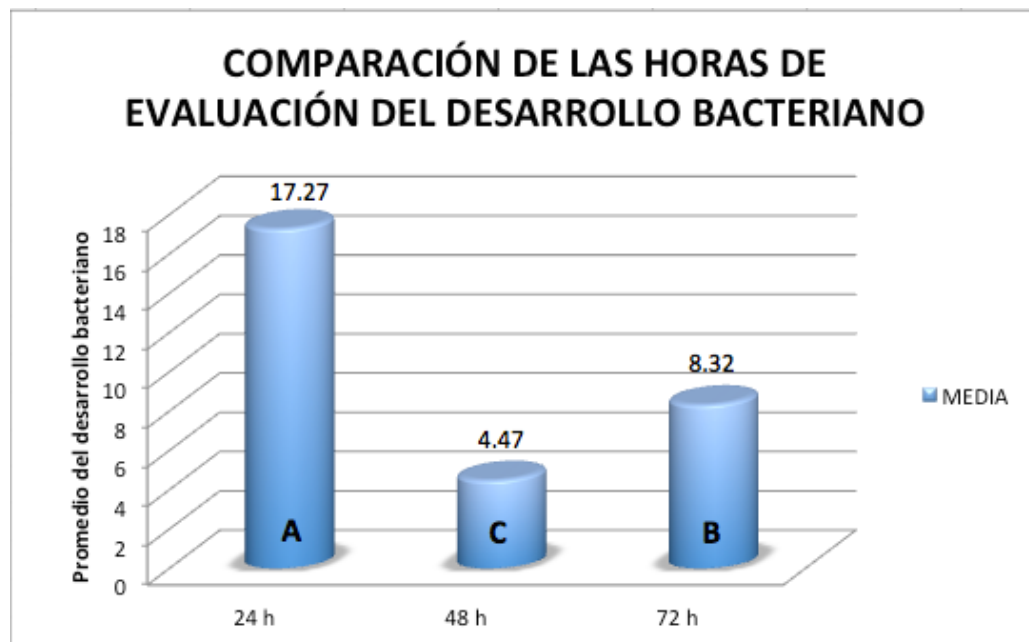
En referencia a los resultados de la evaluación de las horas se encontró diferencia significativa ($p = 0.05$) entre las tres horas de evaluación, observándose que a las 24 h se presentó el mayor desarrollo bacteriano sobre los frutos, llegando a su punto mínimo de desarrollo a las 48 h y por último se observó un restablecimiento del desarrollo bacteriano a las 72 h (Figura 28).

Con respecto al análisis con los extractos, se muestra que existe diferencia significativa ($p = 0.05$) entre el ácido peracético, el cual tuvo mejor control del desarrollo bacteriano, en comparación con el aceite esencial de tomillo y el extracto acuoso de granada. Entre el aceite esencial de tomillo y el extracto acuoso de granada no se observó diferencia significativa ($p = 0.05$), como se muestra en la figura 29.



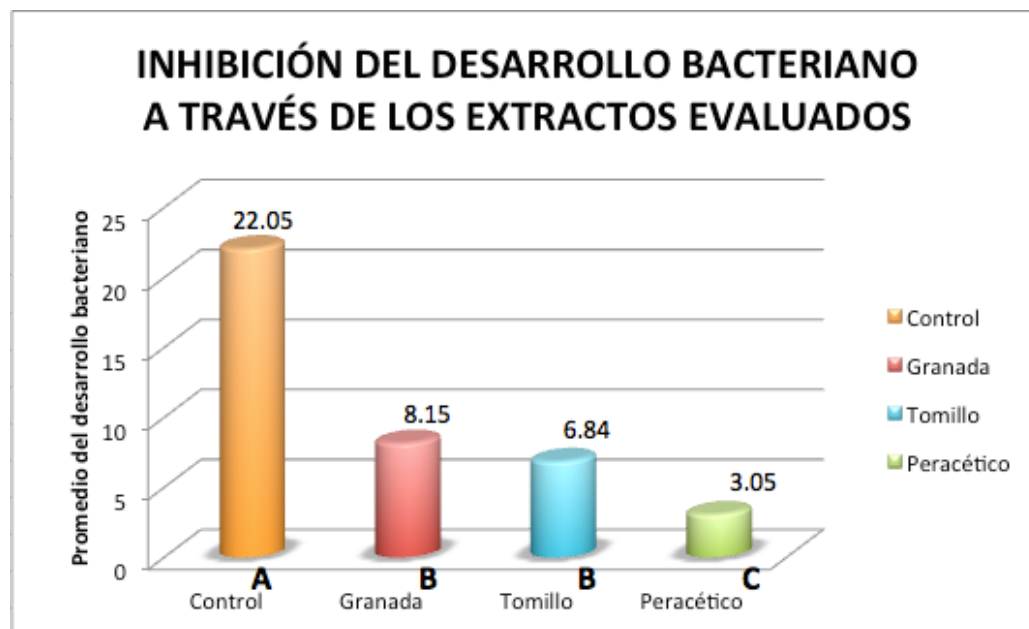
*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 27. Gráfica de los resultados del análisis de varianza comparando el desarrollo bacteriano sobre los frutos de Melón, Cilantro y Jitomate.



*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 28. Gráfica de los resultados del análisis de varianza comparando las tres horas de medición del desarrollo bacteriano sobre los frutos.



*: Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, Tukey ($p=0.05$)

Figura 29. Gráfica de los resultados del análisis de varianza comparando la inhibición del desarrollo bacteriano sobre los frutos por el efectos de los extractos.

6.2.1.2 Análisis estadístico por producto y extracto de los resultados del raspado

El análisis de varianza se realizó con el mismo método que los resultados principales (mostrados anteriormente). La comparación de medias se realizó separando la inhibición del desarrollo bacteriano por fruto, extracto y hora de evaluación

Se obtuvieron los siguientes resultados por fruto:

Cuadro 13: Resultados del análisis de varianza, a través de la comparación de las medias de la interacción de los frutos con los extractos evaluados y las horas de medición. Chapingo, Méx. 2016.

PRODUCTO	EXTRACTO	H. EVAL.	MEDIA
CILANTRO	Granada	24	20.35 A*
		72	2.75 B
		48	1.95 B
		Pr > F	< 0.0001
		DSH	7.98
	Peracético	24	11.15 A
		48	0.45 B
		72	0.25 B
		Pr > F	< 0.0001
		DSH	4.51
	Aceite Esencial de Tomillo	24	17.60 A
		48	2.50 B
		72	2.45 B
		Pr > F	< 0.0001
		DSH	4.53
JITOMATE	Granada	24	0.40 A
		72	0.05 B
		48	0.00 B
		Pr > F	0.0003
		DSH	0.24
	Peracético	48	0.10 A
		72	0.05 A
		24	0.00 A
		Pr > F	0.3613
		DSH	0.16
	Aceite Esencial de Tomillo	24	0.20 A
		72	0.20 A
		48	0.10 A
		Pr > F	0.7662
		DSH	0.37
MELÓN	Granada	24	25.20 A
		72	13.05 AB
		48	9.60 B

		Pr > F	0.0086	
		DSH	12.25	
	Peracético	24	8.60	A
		72	5.15	B
		48	1.75	C
		Pr > F	< 0.0001	
		DSH	3.23	
	Aceite Esencial de Tomillo	24	23.40	A
		72	9.90	B
		48	5.25	B
		Pr > F	0.0009	
		DSH	11.41	

*: Medias con la misma letra dentro de cada Efecto Principal no son estadísticamente diferentes, Tukey (p=0.05)

6.2.1.3 Resultados del Análisis de varianza en Cilantro

Como se puede observar en el Cuadro 13, la mayor inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del extracto acuoso de Granada, sobre el Cilantro, se presentó entre las 24 h y 48 h, siendo a las 48 h el punto de mayor control por efecto del extracto, observándose posteriormente un aumento en el desarrollo bacteriano a las 72 h (Figura 30).

Con respecto al ácido peracético, también se observó mayor inhibición entre las 24 y 48 h, hacia las 72 h se siguió presentando la inhibición del crecimiento bacteriano pero en menor proporción que en las horas anteriores (Figura 31).

Con respecto al aceite esencial de Tomillo, la tendencia fue similar al obtenido con el ácido peracético, entre las 24 y 48 h se observó la mayor inhibición de desarrollo bacteriano y hacia las 72 h disminuyó la tendencia de inhibición (Figura 32).

De manera general, el tratamiento que presentó mejor efecto inhibitorio sobre el cilantro fue el ácido peracético, seguido del aceite esencial de Tomillo y por último de extracto acuoso de Granada.

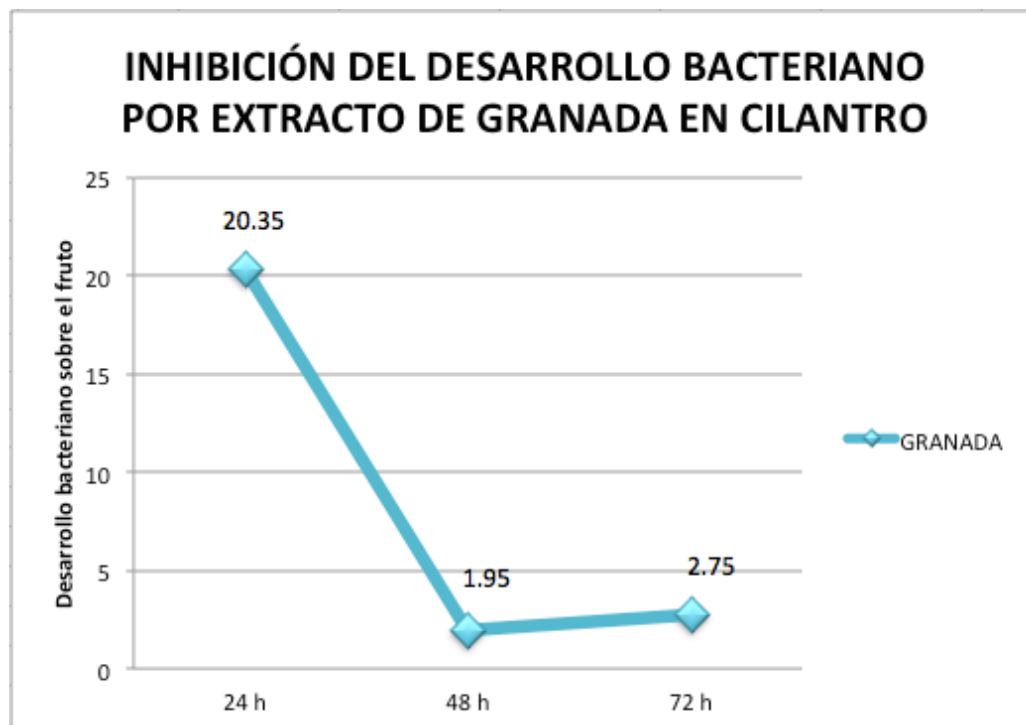


Figura 30. Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del extracto acuoso de Granada (*P. granatum*) en Cilantro.

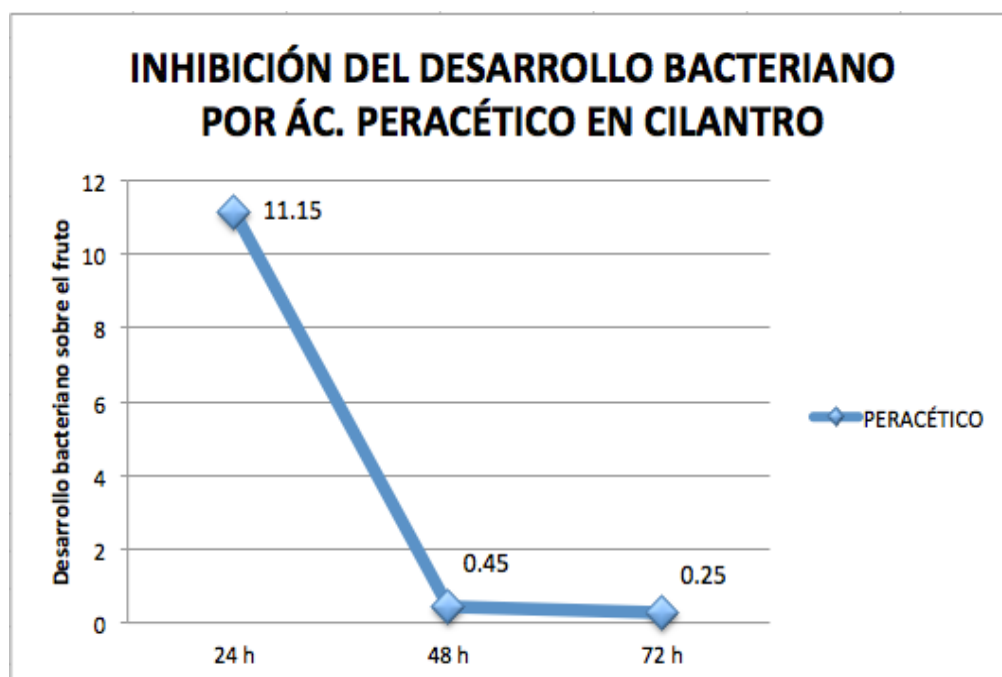


Figura 31. Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del ácido peracético en Cilantro.

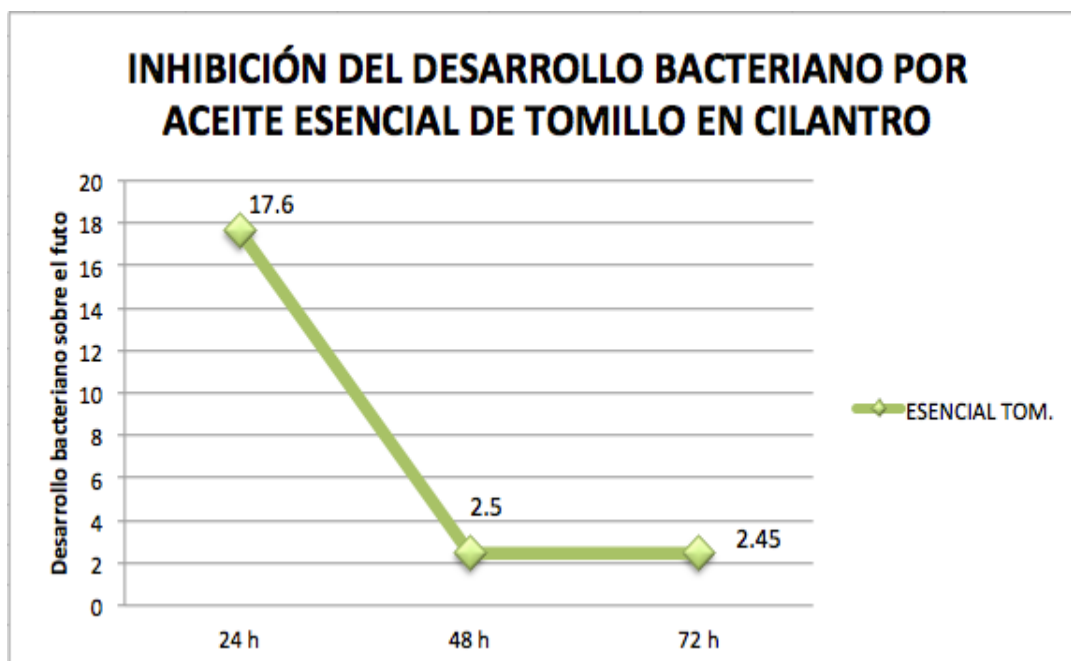


Figura 32. Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del aceite esencial de Tomillo en cilantro.

6.2.1.4 Resultados del Análisis de varianza en Jitomate

Como se observar en el cuadro 13, la mayor inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del extracto acuoso de Granada, sobre el Jitomate, se presentó entre las 24 h y 48 h, siendo a las 48 h el punto de mayor control por efecto del extracto, posteriormente se observó un aumento en el desarrollo bacteriano a las 72 h (Figura 33).

Con respecto al ácido peracético, en las dos primeras horas de evaluación, es decir a las 24 y 48 h, aparentemente no mostraba efecto inhibitorio, sin embargo a partir de las 48 h, se comenzó a observar el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano (Figura 34).

En referencia al aceite esencial de Tomillo, se observó la mayor inhibición del desarrollo entre las 24 y 48 h, posteriormente se apreció un aumento en el desarrollo bacteriano hacía la ultima hora de evaluación (Figura 35).

De manera generalizada y al igual que lo observado en los resultados en Cilantro, el mejor tratamiento se obtuvo con el ácido peracético, seguido del aceite esencial de Tomillo y por último el extracto acuoso de Granada.

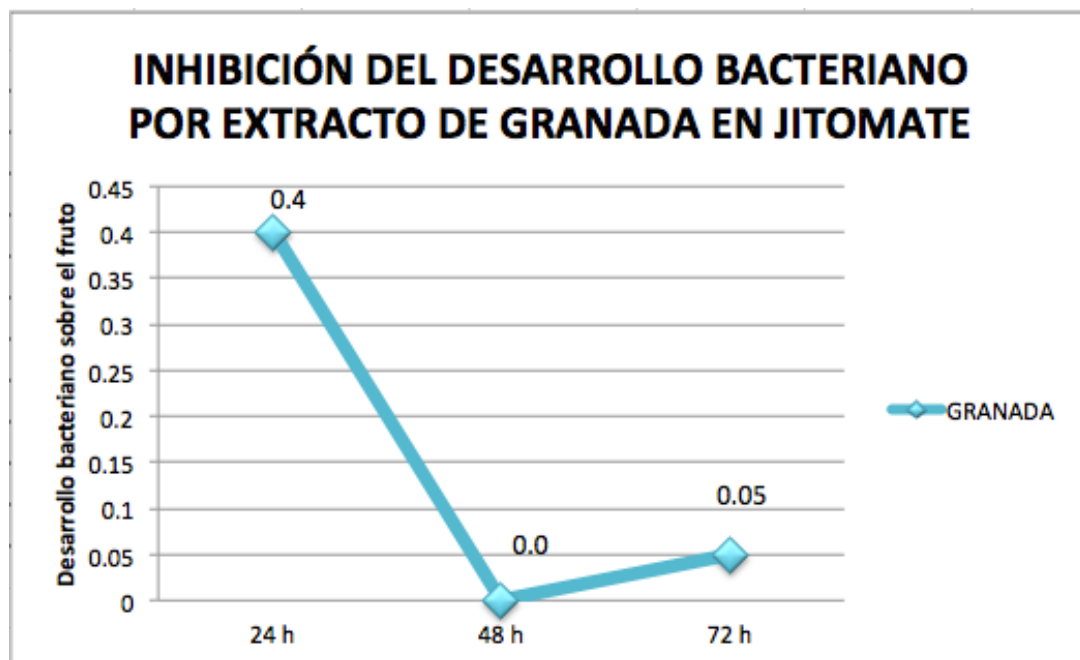


Figura 33. Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del extracto acuoso de Granada (*P. granatum*) en Jitomate.

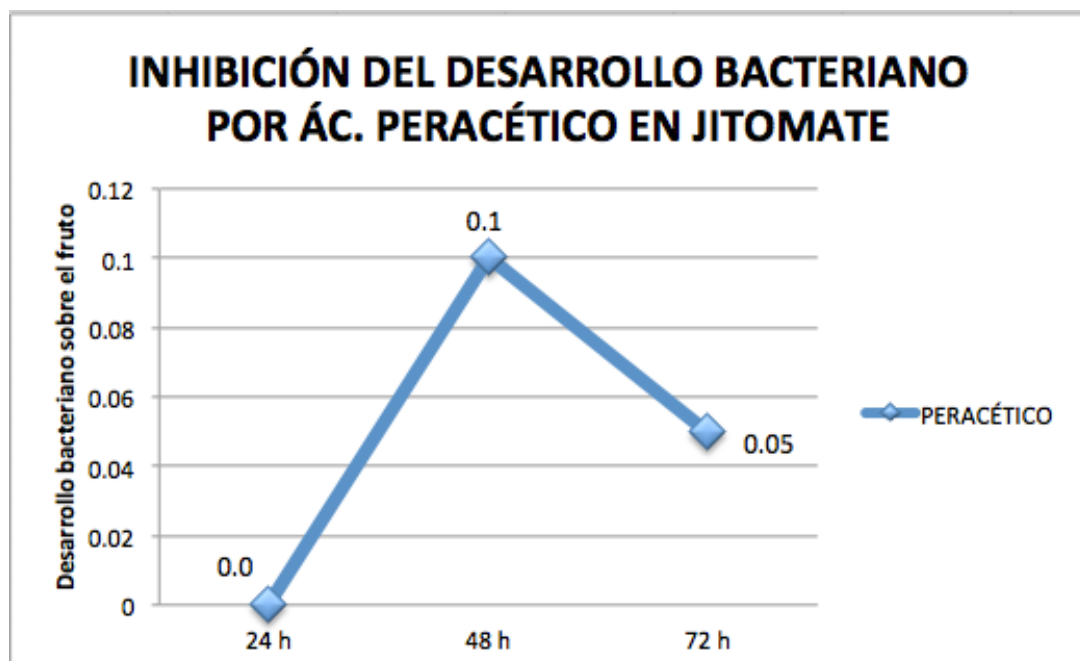


Figura 34. Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del ácido peracético en Jitomate.

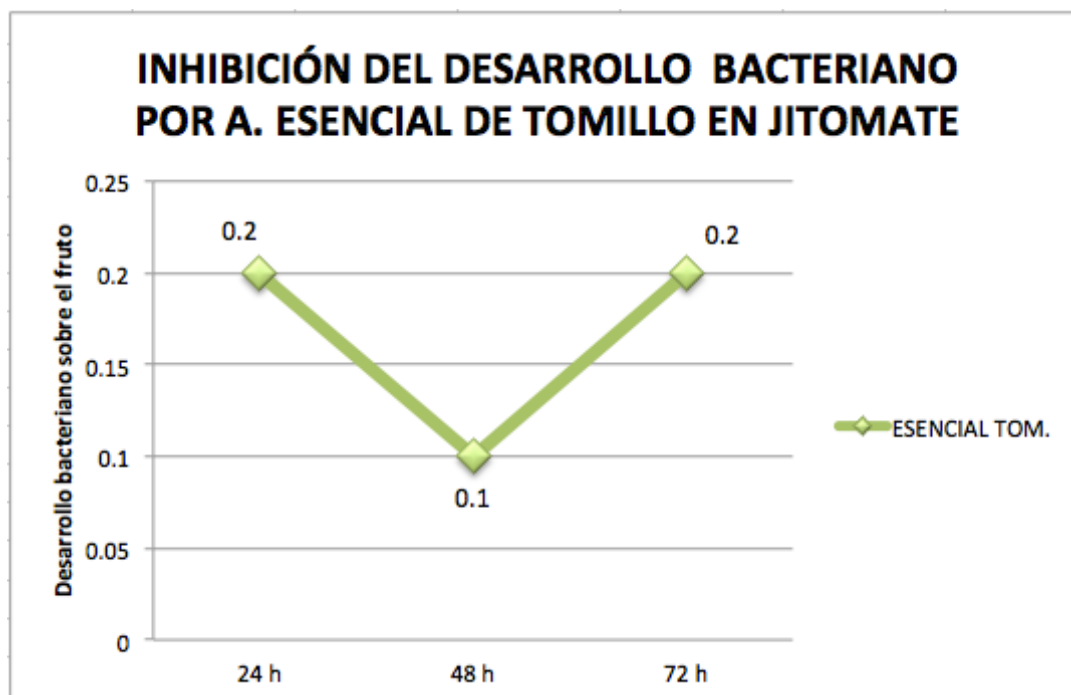


Figura 35. Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del aceite esencial de Tomillo en Jitomate.

6.2.1.5 Resultados del Análisis de varianza en Melón

Con base en los resultados mostrados en el cuadro 13, la mayor inhibición del desarrollo bacteriano por efecto de los tres tratamientos: extracto acuoso de Granada (Figura 36), ácido peracético (Figura 37) y aceite esencial de Tomillo (Figura 38), sobre el Melón, se presentó entre las 24 h y 48 h, siendo a las 48 h el punto de mayor control, posteriormente se observó un aumento en el desarrollo bacteriano a las 72 h, aunque en menor proporción, observándose este mismo efecto en todos los casos.

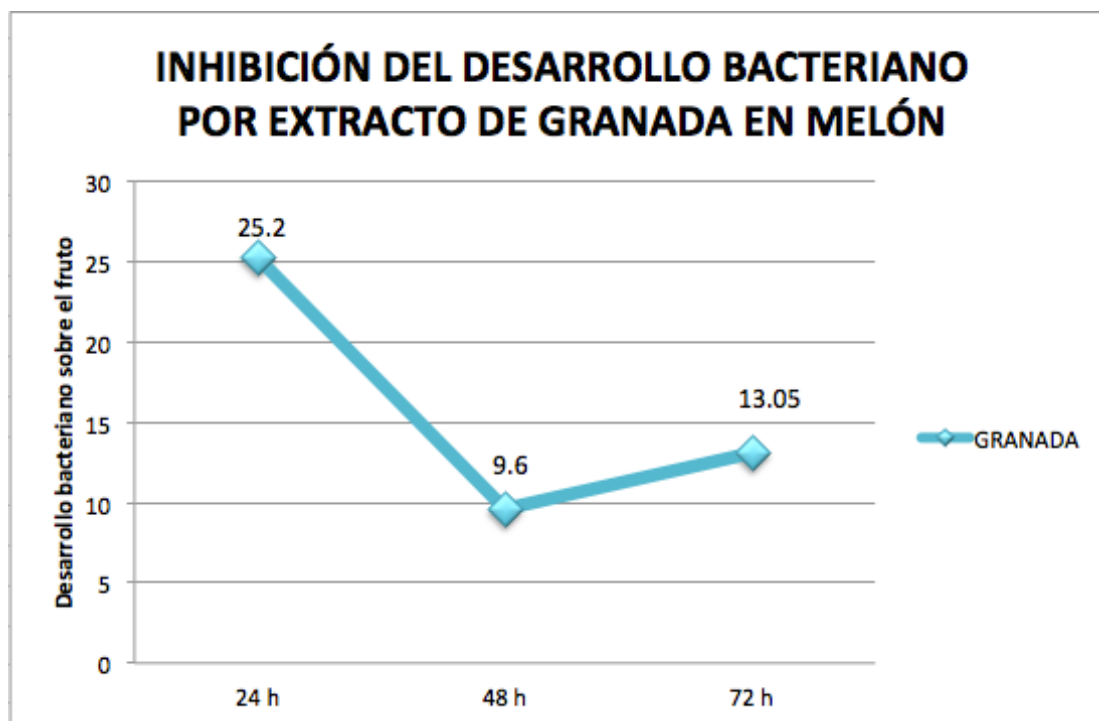


Figura 36. Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del extracto acuoso de Granada (*P. granatum*) en Melón.

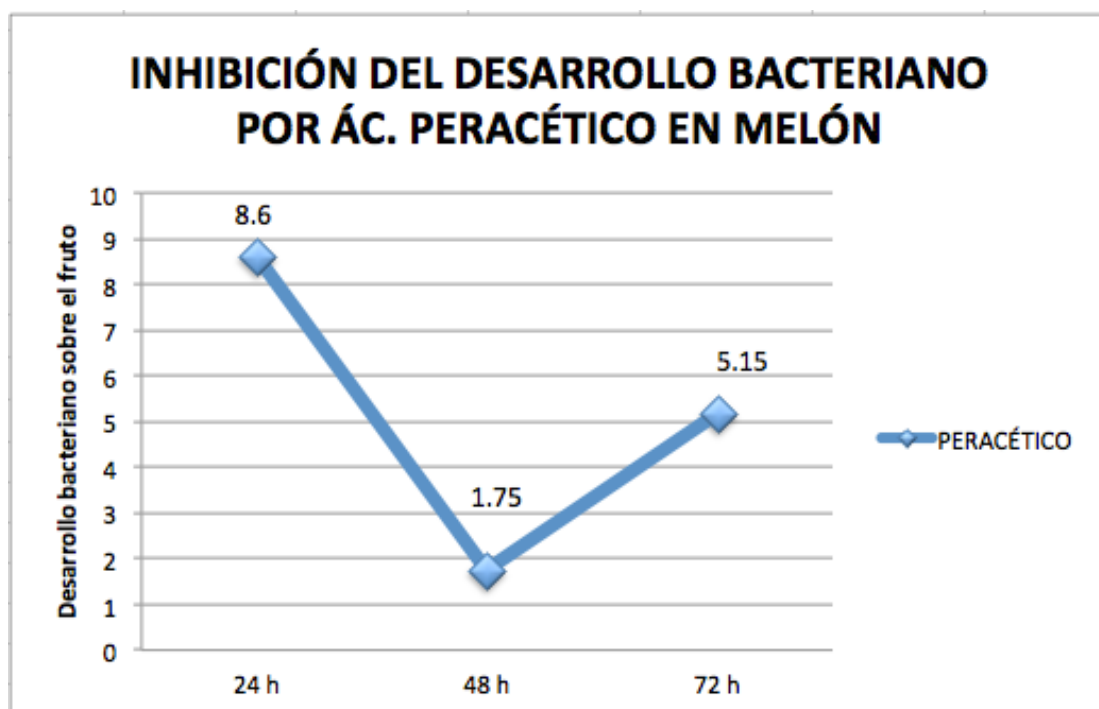


Figura 37. Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del ácido peracético en Melón.

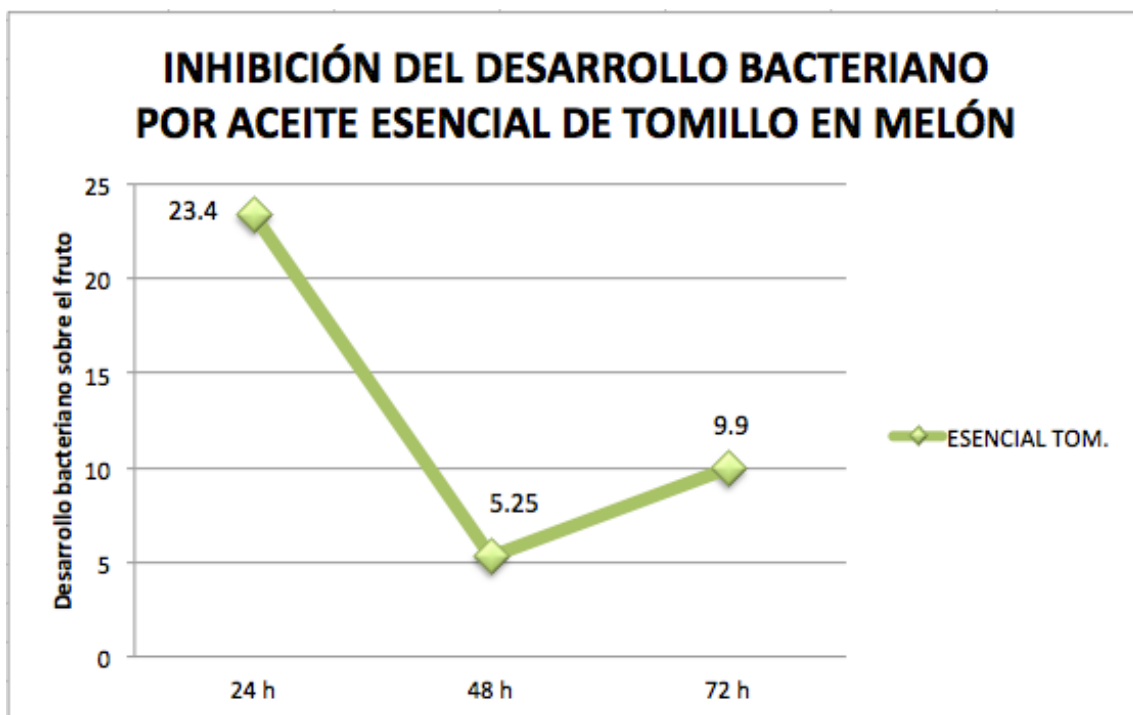


Figura 38. Tendencia de inhibición del desarrollo bacteriano por efecto del aceite esencial de Tomillo en Melón.

Estos resultados a primera vista demuestran que no se cumplió con la hipótesis planteada para la evaluación *in vivo*, ya que de manera general el extracto acuoso de Granada fue el que presentó menor efecto inhibitorio, sin embargo, es importante destacar algunas puntuaciones:

La concentración utilizada en la evaluación *in vivo* no es la misma que se utilizó en la evaluación *in vitro*, debido a que el experimento se planteó con un enfoque para su aplicabilidad en los centros de manipulación, por lo cual, si se utilizaba la concentración de 800 ppm, según el resultado obtenido en la fase *in vitro*, la aplicabilidad en campo se perdería, ya que para los Melones se tendrían que haber preparado aproximadamente 28 L de extracto, por lo cual se considera que el método utilizado no fue el apropiado, pudiéndose utilizar otro en el cual no fuera necesaria la inmersión de los frutos, tal vez por aspersión.

Así mismo, es importante tener en cuenta que los frutos no sufrieron ningún tipo de lavado antes de establecer los tratamientos, lo cual también pudo haber influido en los resultados obtenidos.

Aun con estos efectos, se consideran importantes los resultados encontrados con el extracto acuoso de Granada, ya que su alto contenido en flavonoides y taninos (cianina, ácido elágico, malvidina, pelorganidina, punicalina punicalagina), han demostrado que presentan actividad antibacteriana por cierto efecto antiséptico, debido a que precipitan las enzimas extracelulares secretadas por los microorganismos causantes de las infecciones, como lo describió (Alanis, 2006).

Por ello, la información del presente estudio contribuye al uso de nuevas alternativas para la reducción de riesgos biológicos en productos frescos para su uso en sistemas de inocuidad y sistemas de producción orgánica.

6.2.2 Resultados del procedimiento de inmersión en agua peptonada amortiguada

La evaluación de los resultados obtenidos mediante el procedimiento de la inmersión de los frutos en el agua peptonada amortiguada consistió en asignar valores del 0 al 100 al crecimiento de las colonias bacterianas en las cajas Petri, considerándose como 0 a la que no presentó crecimiento y 100 a la que tuvo crecimiento total dentro de la placa.

Los resultados obtenidos con este procedimiento no se analizaron estadísticamente, porque no hubo diferencias dentro de los resultados, esto debido a que prácticamente en todas las placas sembradas con el agua peptonada obtenida de cada bolsa con cada producto, presentó crecimiento bacteriano del 100 %, lo cual se atribuye a que el agua peptonada es un medio de enriquecimiento bacteriano y debido a que los frutos no se le proporcionó

ningún tipo de limpieza previo al establecimiento de los experimentos, se favoreció el desarrollo de todos los microorganismos presentes en la superficie de los frutos.

Cuadro 14. Resultados de crecimiento bacteriano por el procedimiento de inmersión en agua peptonada amortiguada evaluados en la etapa *in vivo*. Chapingo, Méx. 2016.

PRODUCTO	EXTRACTO	No. DE REPETICIONES	CRECIMIENTO BACTERIANO
MELÓN	Granada	1	100
		2	100
		3	100
		4	100
	Peracético	1	100
		2	100
		3	100
		4	100
	Ac. Esencial Tomillo	1	100
		2	100
		3	100
		4	100
JITOMATE	Granada	1	0
		2	50
		3	100
		4	50
	Peracético	1	0
		2	0
		3	100
		4	20
	Ac. Esencial Tomillo	1	20
		2	0
		3	100
		4	100
CILANTRO	Granada	1	100
		2	100
		3	100
		4	100
	Peracético	1	100
		2	100
		3	100
		4	100
	Ac. Esencial Tomillo	1	100
		2	100
		3	100
		4	100

7. CONCLUSIONES

De manera generalizada los resultados de este estudio se pueden tomar como referencia para el uso de las plantas en la medicina tradicional, como tratamiento de enfermedades gastrointestinales, por ejemplo la diarrea, porque a pesar de haber tenido poca actividad antibacteriana, aun así presentaron cierto grado de inhibición, tal es el caso del Aguacate, Orégano y Tomillo.

Con los resultados del análisis estadístico de la primera etapa, es decir de las evaluaciones *in vitro*, se concluye que entre las cepas bacterianas, la que presenta mayor susceptibilidad a los extractos evaluados fue *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

De los extractos evaluados en *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, el que presentó mayor efecto inhibitorio fue el extracto acuoso de Granada, seguido del aceite esencial de Tomillo, en ambos casos con una concentración de 800 ppm, sin encontrarse alguna diferencia entre las tres horas evaluadas.

Con respecto a los extractos evaluados en *Escherichia coli* ATCC 25922, el que presentó mayor efecto inhibitorio fue el aceite esencial de Tomillo, seguido del extracto acuoso de Granada a una concentración de 800 ppm, al igual que en el caso anterior, sin encontrarse diferencia entre las horas de evaluación.

En la segunda etapa del trabajo; en las evaluaciones *in vivo*, sólo se realizó análisis estadístico del procedimiento realizado por medio del raspado, ya que en el procedimiento basado en la inmersión en agua peptonada amortiguada sólo se evaluó la presencia o ausencia del crecimiento bacteriano.

Con los resultados obtenidos con el procedimiento de raspado de los efectos principales, se concluye que el Jitomate fue el que se presentó mayor efecto inhibitorio del desarrollo bacteriano sobre su superficie, debido principalmente a la textura de la epidermis del fruto. Por el contrario en el que se tuvo menor efecto inhibitorio del desarrollo bacteriano, fue el Melón, atribuyéndose este efecto a la textura rugosa de la superficie del fruto.

En referencia a los resultados por producto hortícola (fruto) y extracto, se concluye que para el caso del Cilantro se tiene mayor control del desarrollo bacteriano con el ácido peracético, seguido del aceite esencial del Tomillo y del extracto acuoso de Granada, sin observarse diferencia entre estos dos últimos. Para el caso del extracto acuoso de Granada, se observó que su máximo punto de control se presentó a las 48 h, presentándose después, en menor proporción un aumento en el desarrollo bacteriano, debido tal vez a que el efecto de control por parte del extracto acuoso derivado de los metabolitos se pierda con el paso del tiempo y esto provoque que el desarrollo bacteriano vuelva a restablecerse, aunque se observa que lo hace en menor proporción.

Con respecto a los resultados en Jitomate, se observó la misma tendencia que en Cilantro, ya que el mejor control se presentó con el ácido peracético, seguido del aceite esencial de Tomillo y por último el extracto acuoso de Granada. Así mismo, el extracto acuoso de Granada mostró su máximo punto de control a las 48 h, posteriormente se presentó un pequeño aumento en el desarrollo bacteriano, esta tendencia se le atribuye a la misma situación que se concluyó en el Cilantro. Sin embargo, a diferencia del Cilantro, el ácido peracético en Jitomate se observó que retrasó el desarrollo bacteriano entre 24 y 48 h, ya que el punto máximo de desarrollo bacteriano se presentó a las 48 h, para posteriormente controlar el crecimiento bacteriano a las 72 h. Este efecto, como se ha mencionado, se le atribuye principalmente a la textura de la epidermis del Jitomate.

Para el caso del Melón, se observó la misma tendencia que en los casos anteriores, con respecto a que el mejor control se obtuvo con el ácido peracético, seguido del aceite esencial de Tomillo y del extracto acuoso de Granada. Sin embargo, para este producto el mayor punto de control se presentó a las 48 h en los tres tratamientos, posteriormente se observó, en menor proporción, un aumento en el desarrollo bacteriano, lo cual se atribuye, tal vez a la superficie rugosa del Melón que puede proporcionar un medio favorable para que las bacterias se resguarden evitando el contacto con los desinfectantes y una vez que éstos han perdido su efecto las bacterias vuelvan a desarrollarse.

Aunque los mejores controles se obtuvieron con el ácido peracético, se puede concluir que *P. granatum* es una planta con gran potencial para su uso como un método alternativo para la desinfección de enterobacterias contaminando productos frescos, ya que se obtuvieron buenos resultados de control y no trasfiere un olor ajeno a los frutos, lo cual también se considera un contaminante en los esquemas de inocuidad.

A pesar de los buenos resultados obtenidos con el aceite esencial de Tomillo, no se recomienda su uso sobre productos frescos, ya que durante la evaluación se observó que degrada los tejidos de la epidermis de los Jitomates, acortando su vida de anaquel y en el caso del Cilantro se apreció que quema el follaje, ya que se tornaron de un color verde oscuro y se observó pérdida de turgencia. Aparentemente a los Melones no les causó ningún efecto adverso.

Con respecto a los resultados obtenidos con el agua peptonada amortiguada, no se pudo realizar ningún análisis estadístico debido a que se presentó el 100% de desarrollo de colonias bacterianas prácticamente en todas las cajas Petri, lo cual se atribuye a que el agua peptonada es un medio de enriquecimiento bacteriano aunado a que no se le proporcionó ningún tipo de limpieza a los productos hortícolas previo al establecimiento de los

experimentos, lo que favoreció el desarrollo de todos los microorganismos presentes en la superficie de los productos.

Por último se concluye que éstos resultados pueden ser tomados en consideración como parte de la validación de los procesos que requieren algunos esquemas de inocuidad; tanto los privados, como el esquema oficial mexicano: Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC); ya que se han realizado las evaluaciones en comparación con el ácido peracético, el cual es un producto utilizado en muchos centros de manipulación (empaques) y en las unidades de producción, como desinfectante de diversos productos hortícolas frescos.

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere para trabajos futuros, realizar un análisis del efecto residual de los metabolitos de la Granada (*P. granatum*) y con ello proporcionar un panorama más específico sobre el efecto de este extracto sobre las enterobacterias para determinar su tiempo de acción.

Así mismo, se puede generar una investigación con diferentes concentraciones del extracto acuoso de Granada en evaluaciones *in vivo*, para determinar la concentración más eficaz y comprobar la funcionalidad de este extracto para su aplicación en los centros de manipulación y unidades de producción.

Se sugiere realizar otra evaluación en productos en fresco, separando cepas bacterianas, así como ampliando el número de cepas evaluadas para identificar las más susceptibles al extracto de Granada, o cualquier otro extracto de interés.

9. LITERATURA CITADA

- Alanís R.A.D. 2006. Evaluación de la actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales, usadas en la medicina tradicional mexicana, contra enterobacterias causantes de diarrea y disentería: estudio farmacológico y químico del pericarpio de *Punica granatum* L. (granado). México, D.F.
- Al-Zoreky N.S. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica Granatum* L.) fruit peels. *Int J Food Microbiol* 134: 244–248.
- Atlas of Salmonella, 2016. An Atlas of Salmonella in the United States, 1968-2011. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
- Barboza S.R. 2012. Reportan brote de diarrea por E. coli en Tabasco. El Universal. <http://archivo.eluniversal.com.mx/notas/837322.html>
- Carbonell B.A. y Calín S.A., 2013. Punicalagina antioxidante del zumo de granada y el extracto de granada, en la alimentación funcional del futuro. Universidad Miguel Hernández, Departamento Tecnología Agroalimentaria. Orihuela, España.
- CDC a, 2016. <http://www.cdc.gov/mmwr/international/relres.html>
- CDC b, 2016. Foodborneoutbreaks. <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>
- CDC-FDA, 2016. Multistate Outbreak of Salmonella Poona Infections Linked to Imported Cucumbers (Final Update). <http://www.cdc.gov/salmonella/poona-09-15/index.html>
- Chebaibi A. & RHAZI F. 2013. Bactericidal activity and phytochemical screening of Moroccan pomegranate (*Punica granatum* Linn.) peel aqueous extracts. College of Sciences, Moulay Ismail University, B.P 11201, Zitoune, Meknès. Morocco.
- Choi J.G., Kang O.H., Lee Y.S., Chae H.S., Oh Y.C., Brice O.O., Kim M.S., Sohn D.H., Kim H.S., Park H., Shin D.W., Rho JR. y Kwon D.Y., 2009. In vitro and in vivo antibacterial activity of *Punica granatum* peels ethanol extract against Salmonella. *Evid Based Compl Alter Med* 17: 1–8.
- CODEX Alimentarius. 2013. Principles and Guidelines for the establishment and application of microbiological criteria related to foods.
- Cruz C.A., et al, 2010. In vitro evaluation of the antibacterial effect of *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* and *Silybum marianum*. Colombia.

- Cruz K. P. 2016. Microorganismos Patógenos en los alimentos y su impacto en la salud. III Congreso de Innovación en Seguridad Alimentaria (CISA). Ciudad de México.
- Díaz A. 2008. Buenas Prácticas Agrícolas. Guía para pequeños y medianos productores. Honduras.
- FDA, 2011. U.S. Department of Health and Human Services. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm269621.htm>
- FDA-FSMA, 2016. Food Safety Modernization Act (FSMA). www.fda.gov/fsma
- Finn S., Condell, O., McClure, P, Amézquita, A. and Fanning S. 2013. Mechanisms of survival, responses and sources of Salmonella in low-moisture environments. The journal Frontiers in Microbiology.
- (FSN) FOOD SAFETY NEWS, 2014. Serrano Chile Peppers Recalled for Possible Salmonella Contamination. EE. UU.
- Gould S.W.J., Fielder M.D., Kelly A.F. and Naughton D.P. 2009. Anti-microbial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by cupric sulphate against clinical isolates of *S. aureus*, MRSA and PVL positive CA-MSSA. BMC Comple Alter Med 9: 23-29.
- Kanjee U. & HOURY, A. W., 2013. Mechanisms of Acid Resistance in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol. 67:65–81
- Koyama S., Cobb L.J., Mehta H.H., Seeram N.P., Heber D., Pantuck A.J. y Cohen P., 2010. Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. Gro Horm IGF Res 20: 55-62.
- Melgarejo P. y Salazar, D.M. 2003. Tratado de Fruticultura para zonas áridas y semiáridas, (Mundi-Prensa, Madrid).
- MPEVE, 2012. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México.
- Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
- Puerta G.A. y Mateos R.F. 2010. Enterobacterias. Unidad de enfermedades infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Albacete, España.

- Quirantes P. R. M., 2012. Caracterización y estudios metabólicos de compuestos fenólicos bioactivos mediante técnicas separativas acopladas a espectrometría de masas. Granada, España.
- Ray B. & Bhunia, K.A., 2010. Fundamental food microbiology. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Reddy M.K., Gupta S.K., Jacob M.R., Khan S.I. and Ferreira D., 2007. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med* 73: 461–467.
- Salmones R.M.A., 2016. Acciones y Criterios para la atención de las notificaciones de contaminación de los productos de Origen Mexicano. 5to. Foro Internacional de Alimentos Sanos. México.
- SENASICA-DGIAAP. Anexo Técnico 1. Requisitos generales para el reconocimiento y certificación de Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación en la Producción Primaria de Alimentos de Origen Agrícola.
- Vargas P.S., Bano Z., Perez, M., León, C., Ayala, M., Chaussabel, D., Estrada, G. 2015. Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *CONACyT*. México.
- Viuda M.M., Ruiz N.Y., Fernández L.J., Sendra E., Sayas B.E. y Pérez A.J., 2011. Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Res Int* 44: 1217-1223.
- Wright K. M., Chapman, S., McGeachy, K., Humphris, S., Campbell, E., Toth, I. K., and Holden, N. J. 2013. The endophytic lifestyle of *Escherichia coli* O157:H7: Quantification and internal localization in roots. *Phytopathology* 103:333-340.
- Zoppolo R. y Fasiolo C., 2015. Granadas: un cultivo para la Diversificación. *Revista INIA*.