

1998-A/2005-A

193198077

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



**“Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos
esenciales de orégano (*Lippia graveolens*), zacate limón
(*Cymbopogón citratus*) y ajo (*Allium sativum*), frente *Salmonella*
Typhimurium y *Escherichia coli*”**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

PRESENTA:

MARÍA DE JESÚS RAYGOZA GUTIÉRREZ

Las agujas, Zapopan, Jalisco, Abril del 2005.



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

132/ C. C. BIOLOGÍA

C. MARÍA DE JESÚS RAYGOZA GUTIÉRREZ
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : **"Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos esenciales de orégano (*Lippia graveolens*), zacate limón (*Cymbopogón citratus*) y ajo (*Allium sativum*), frente *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli*"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al **DRA. ROSALBA GUTIÉRREZ ROJO** y como asesor / a **DR. FERNANDO SANTACRUZ RUVALCABA**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 2 de Febrero del 2005

DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLÓGICA

DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. DRA. ROSALBA GUTIÉRREZ ROJO- Director del trabajo

Dr. Carlos Álvarez Moya.
Presidente del Comité de Titulación.
Carrera de Licenciado en Biología.
CUCBA.
Presente

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS E INFORMES**, opción Tesis con el título: "**Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos esenciales de orégano (*Lippia graveolens*), zacate limón (*Cymbopogón citratus*) y ajo (*Allium sativum*), frente *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli*"**, que realizó la pasante **Maria de Jesús Raygoza Gutiérrez** con número de código **193198077** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., 23 de febrero del 2005

Rosalba Gtz. R.
Dra. Rosalba Gutiérrez Rojo
DIRECTOR


Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba.
ASESOR

SINODALES

FIRMA

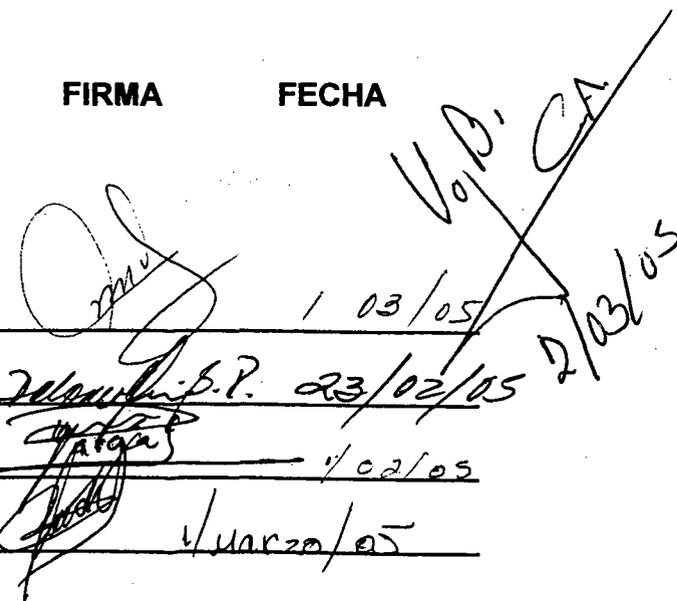
FECHA

1.- M. C. Rosa María Domínguez Arias

2.- BIOL. Dolores Marina Barragán Reynaga

3.- M. C. Pedro Macedonio García López

Supl. M. C. Luz Elena Claudio García.


Handwritten signatures and dates for the sinodales members, including a large signature and date '1 03/05' and another signature and date '23/02/05'.



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DEL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO

DIRECTOR: DRA. ROSALBA GUTIÉRREZ ROJO

Agradecimientos:

- ❖ Gracias a Dios por ser mi fortaleza y la luz que me ha guiado a realizar otra etapa mas de mi vida.
- ❖ A mis padres por su esfuerzo, confianza y amor. Mi mas grato cariño y respeto.
- ❖ A mis hermanos por ser mi ejemplo mas claro de superación en la vida.
- ❖ A la Dr. Rosalba Gutiérrez por que con su enseñanza, apoyo y paciencia contribuyo a la dirección y realización del presente trabajo.
- ❖ Al Dr. Jorge por su valiosa asesoría y apoyo brindado.
- ❖ A la Universidad de Guadalajara y al CIATEJ mi reconocimiento y respeto por prepararme académicamente.
- ❖ A todos mis amigos por su comprensión y cariño, en especial a Carmen Alvarez por su ayuda incondicional.

ÍNDICE

INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ANTECEDENTES	
II.1. ANTIMICROBIANOS.....	3
II.1.1. Aceites esenciales.....	5
Fuente de aceites esenciales.....	6
Propiedades físicas de los aceites esenciales.....	7
II.1.1.1. Ajo.....	7
Mecanismo de acción bacteriana de la alicina.....	9
II.1.1.2. Orégano.....	10
Mecanismo de Acción bacteriana del carvacrol y timol.....	12
II.1.1.3. Zacate limón.....	12
Mecanismo de acción bacteriana del citral.....	14
II.2 INOCUIDAD ALIMENTARÍA.....	14
II.2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	15
II.2.2. <i>E. coli</i>	17
II.2.3. <i>Salmonella</i>	19
II.2.4. Infecciones causadas por <i>Salmonella</i>	20
II.3. MÉTODOS PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	23
II.3.1. Método de difusión en agar.....	24
II.3.2. Método turbidimétrico.....	25
II.3.3. Método de E-test.....	25
II.3.4. Métodos automatizados (microdilución).....	26
III. JUSTIFICACIÓN.....	28
IV. HIPÓTESIS.....	30

V. OBJETIVOS	31
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	32
VI.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS	32
VI.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	32
VI.3. ENSAYO VISUAL PARA ESTIMAR LA VIABILIDAD CELULAR	33
VI.3.1. Preparación de diluciones de los extractos de aceites esenciales en caldo nutritivo adicionando un agente estabilizante.....	33
VI.3.2. Preparación de diluciones seriadas del inóculo (10^8-10^0 ufc ml ⁻¹).....	33
VI.4. EVALUAR EL RETO MICROBIANO (MEZCLA INÓCULO- ANTIMICROBIANO) EN LOS POCILLOS DE UNA PLACA DE ELISA.	34
VI.4.1. Efectuar lecturas en absorbancia a 570nm.....	34
VI.4.2. Correlacionar las lecturas en absorbancia, contra los logaritmos de UFC ml ⁻¹	35
VII. RESULTADOS	38
VII.1. ENSAYO VISUAL	38
VII.2. EVALUACIÓN DEL RETO MICROBIANO	40
VII.3. CORRELACIÓN DE LAS LECTURAS DE ABSORBANCIA, CONTRA LOS LOGARITMOS DE UFC ml⁻¹	41
VII.4. COMPARACIÓN DE LAS INHIBICIONES	43
VIII. DISCUSIÓN	50
IX. CONCLUSIONES	53
X. BIBLIOGRAFÍA	54

I.-RESUMEN

I.- RESUMEN

En el presente trabajo, se utilizó el método de micro-dilución en combinación con el método de reducción de colorante para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de orégano, zacate limón y ajo, con el objetivo de establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada extracto frente en el crecimiento de *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli*.

Un ensayo visual previo a la evaluación, que consistió en una batería de diluciones que contenían caldo nutritivo, agar bacteriológico al 0.15% y resazurina al 0.01%, nos permitió estimar la viabilidad celular, así como determinar la concentración de referencia a evaluar en el método de micro-dilución. Para establecer las concentraciones de los tratamientos se evaluaron rangos amplios de concentraciones en porcentajes de los aceites de estudio, diluidos en caldo nutritivo y al final se evaluaron las concentraciones que permitieron visualizar la tendencia de cero inhibición hasta inhibiciones de dos y tres logaritmos ó inhibiciones totales.

Los resultados de la inhibición se correlacionaron con las lecturas de absorbancia a 570 nm, realizadas en un lector de placa de ELISA. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que el extracto de orégano resultó ser el más efectivo en la inhibición del crecimiento de ambas bacterias en comparación con los extractos de ajo y zacate limón. La concentración mínima inhibitoria para el extracto de orégano fue de 0.1% para *E. coli* y 0.2% para *S. Typhimurium*, mientras que el extracto de zacate limón fue de 2.0% frente *E. coli* y 3.0% para *S. Typhimurium* y finalmente las concentraciones inhibitorias de crecimiento para el extracto de ajo fueron de 2.5% para *E. coli* y 3.5% para *S. Typhimurium*, respectivamente.

Aunque la mayoría los aceites derivados de plantas son reconocidos como seguros; es necesario realizar estudios de toxicidad antes de su uso *in vitro*

II.- ANTECEDENTES

II.1 ANTIMICROBIANOS

La utilización de compuestos orgánicos en el tratamiento de la infección se conoce desde la antigüedad. Los extractos de ciertas plantas medicinales se han utilizado durante siglos. También existe evidencia de la utilización de ciertas sustancias antimicrobianas, sintéticas o naturales que en algunos casos se generan durante la maduración de productos lácteos, cárnicos o vegetales (Fernández, 2000), que son utilizadas para matar o inhibir el crecimiento de virus, bacterias, etc. Estas sustancias han permitido mejorar la salud de la población. (<http://www.members.tripod.com/fotografia/textos/antibioticos.htm>, 2002).

No obstante, algunos microorganismos han desarrollado una resistencia a dichos agentes debido a una utilización excesiva e incontrolada que pone en peligro los avances médicos realizados.

Actualmente existe por parte de los consumidores un interés por evitar el consumo de sustancias químicas adicionadas a los alimentos, su empleo en la industria es cotidiano, incluso con tendencia al incremento. Algunos compuestos que intencionalmente se incorporan en la formulación de productos procesados industrialmente, existen de manera natural en muchos alimentos. Casi todos estos son metabolizables, lo que no suele ocurrir con el resto. La lista de compuestos antimicrobianos de uso común comprende a los ácidos orgánicos, sales inorgánicas, bacteriocinas, compuestos naturales y misceláneos (Fernández, 2000).

Tanto en los alimentos de origen vegetal como animal, es posible encontrar sustancias constitutivas que exhiben un manifiesto efecto antimicrobiano (Hamer y col., 1999) un ejemplo son; eugenol del clavo, alicina (disulfuro y trisulfuro de dialilo) del ajo, timol del orégano y ácido hidroxicinámico en las frutas y verduras. La presencia de estas sustancias contribuye a seleccionar el tipo y abundancia de microflora presente en el alimento. En las

frutas, los ácidos presentes en el mesocarpio funcionan como un mecanismo protector contra la eventual invasión microbiana a las semillas (Fernández, 2000).

Las hierbas y las especias han sido empleadas durante siglos para aumentar la vida útil de los alimentos. (<http://www.members.tripod.com/fotografía/textos/antibioticos.htm>, 2002). Diversos han sido los estudios tendientes a demostrar la actividad antimicrobiana de este tipo de sustancias. Entre ellas se ha descrito el poder antioxidante, especialmente del tomillo, el orégano y el ajo, plantas empleadas corrientemente para el especiado de alimentos en la cuenca mediterránea, y que constituyen una parte importante de la tradición culinaria en nuestro país (Tassou y col., 1995).

Hierbas y especias son sinónimo de tradición que se mantiene viva desde tiempos inmemoriales en la cultura culinaria de prácticamente todo el mundo. Básicamente, por el aroma y sabor que confieren a los platos, cocinados o no, además de una potente acción conservadora para muchas de ellas y un valor nutricional muy apreciado. A todas estas características, en los últimos tiempos se ha sumado un poder antioxidante que ha incrementado positivamente el nivel de apreciación del consumidor (Hammer y col., 1999).

La existencia de una acción antioxidante, curiosamente, parecía estar reñida con la conservación, ya que la presencia de cantidades apreciables de tocoferoles (sustancias con acción vitamínica E), en todos estos productos se asocia de forma natural con el mantenimiento de la vida celular y con su destrucción (Sánchez Escalante y col., 2003). El efecto conservador parece que hay que atribuirlo a la elevada concentración de ácidos grasos de cadena corta, es decir, las moléculas normalmente responsables del aroma intenso de estas plantas, grupos fenólicos y otras sustancias con acción irritativa como son los picantes (Hakki y col., 2003).

En este sentido, se señala que el empleo de aceites esenciales podría prolongar y mejorar la vida útil de muchos productos elaborados por diversas tecnologías alimentarias, entre ellos, la congelación (Adler y Beuchat, 2002). Ésta es una tecnología que suele facilitar la oxidación de los componentes grasos de los alimentos, por lo que la inclusión de aceites esenciales de especias mediterráneas entre la composición de alimentos congelados grasos podría favorecer su conservación, mantener el sabor habitual de los alimentos y evitar pérdidas nutricionales. Por este motivo, en la actualidad se está considerando la suplementación rutinaria con antioxidantes naturales, especialmente en productos sensibles, como pescado, carne y cualquier otro, sobre todo si se comercializa congelado (Botsoglu y col., 2003). Añadir aceites esenciales no necesitaría diseñar acciones tecnológicas especiales, ya que los extractos de plantas se disuelven en la propia estructura del alimento, especialmente en las membranas celulares (Sivropoulou y col., 1996).

II.1.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos volátiles, en su mayoría insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales. Por lo general, no son oleosos al tacto. Pueden agruparse en cinco clases, dependiendo de su estructura química: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y lactonas y óxidos (Lawless, 1995).

El término aceite esencial se aplica también a las sustancias sintéticas similares preparadas a partir del alquitrán de hulla, y a las sustancias semi-sintéticas preparadas a partir de los aceites naturales esenciales.

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados; Ej., alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc., sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos

no frecuentes derivan biológicamente del ácido mevalónico; se les cataloga como terpenos: monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15) (Conner y col.,1984).

Las propiedades físico-químicas de los aceites esenciales o esencias son muy diversas, puesto que el grupo engloba substancias muy heterogéneas, de las que en la esencia de una planta, prácticamente puede encontrarse solo una (como la de canela contiene más de 85 % de cinamaldehído) o más de 30 compuestos como en la de jazmín o en la de manzanilla. El rendimiento de esencia obtenido de una planta varía de unas cuantas milésimas por ciento de peso vegetal hasta 1-3%. La composición de una esencia puede cambiar con la época de la recolección, el lugar geográfico o pequeños cambios genéticos (Seymour, 2003). En gimnospermas y angiospermas es donde aparecen las principales especies que contienen aceites esenciales, distribuyéndose dentro de unas 60 familias. Son particularmente ricas en esencias, las pináceas, lauráceas, mirtáceas, labiáceas, umbelíferas, rutáceas y asteráceas (Conner y col.,1984).

Estos aceites han demostrado ser eficaces en diferentes productos en estudios realizados a escala de laboratorio. Es por ello que se están evaluando diferentes plantas o sus extractos, que podrían ser parte de las dietas tradicionales, su potencial uso para facilitar la conservación de los alimentos, mejorar su vida útil y retomar los aromas y sabores tradicionales de la dieta mediterránea (Jones,1996).

Fuentes de aceites esenciales

Los aceites esenciales proceden de las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza de los vegetales y se forman en las partes verdes (con clorofila) del vegetal y al crecer la planta son transportadas a otros tejidos, en concreto a los brotes en flor. Se desconoce la función exacta de un aceite

esencial en un vegetal; puede ser para atraer los insectos para la polinización, o para repeler a los insectos nocivos, o puede ser simplemente un producto metabólico intermedio (<http://www.plantasmedicinales.org>).

Los aceites esenciales se obtienen mediante uno de los métodos siguientes:

Destilación en corriente de vapor

Extracción con disolventes volátiles.

Extracción a mano .

Extracción a máquina.

Hoy los aceites esenciales sintéticos u obtenidos de fuentes naturales por cualquiera de esos cuatro métodos, se purifican normalmente por destilación al vacío (<http://www.plantasmedicinales.org>).

Propiedades físicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente, muy raramente tienen color y su densidad es inferior a la del agua (la esencia de sazafrán o de clavo constituyen excepciones). Casi siempre dotadas de poder rotatorio, tienen un índice de refracción elevado. Solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, son liposolubles y muy poco soluble en agua, son arrastrable por el vapor de agua (Seymour, 2003).

II.1.1.1 Ajo

El ajo (*Allium sativum*), es una planta que ya se conocía 3000 años a. c. Su cultivo se remonta a los tiempos de Babilonia y muchos han sido las personalidades históricas que han recomendado su uso. En «La Odisea», Homero relata cómo Ulises encontró en él fuerzas para protegerse de la magia de Circe. Hipócrates lo recomendaba para toda suerte de infecciones, heridas, cáncer, lepra o problemas digestivos. Se trata de un tegumento rico en vitamina

A, vitaminas del complejo B, vitamina C, bromo, yodo, silicio y azufre (www.nutriservice.cl/pdf/ALICINA.pdf).

Los primeros pasos para identificar los constituyentes activos del ajo datan de la mitad del siglo pasado. En 1844, Tehodor Werthiem extrajo alicina de *Allium sativum* y la llamo allim, y cuatro años mas tarde, Luis Pasteur demostró que *Allium sativum* inhibía el crecimiento de bacterias. Cien años mas tarde un científico llamado Caballito, demostró las propiedades antibacteriana de la planta y luego recibió una patente por comprobar el efecto de la alicina para controlar hongos (Naganawa y col., 1996).

El aceite de ajo se produce comercialmente mediante el calentamiento de sus dientes a 100° C y la reducción de los vapores destilados, proceso en el cual la alicina se convierte en dialil sulfuros y otros compuestos, posteriormente, esta sustancia se diluye con aceite en una porción 200:1 (Tsao y Yin, 2001).

El ajo posee esencias volátiles (una de ellas contiene azufre que es la que le proporciona su olor característico), grasas, aminoácidos, y azúcares con una cantidad elevada. El principal compuesto químico presente es "allim" también llamado oxido de dialyl disulfido cuando la planta es cortada o machacada una enzima llamada allinasa es liberada y transformada en alicina también llamada dialyl-thiosulfinato o 2-propenyl propenothiosulfinato (Ross y col., 2001).

La alicina es una molécula muy reactiva por sus enlaces disulfidos soluble en agua y alcohol. La energía del enlace $\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$ se ha determinado en 140 kcal/mol. La densidad electrónica de los sulfuros en la molécula es débil, haciendo que el enlace S-S sea menos estable y fácil de romper, la energía del S-S está aumentada por la presencia de un oxígeno electronegativo (Tsao y Yin, 2001).

En los bulbos, y en la proporción de 0,1 a 0,3%, se presenta el aceite esencial enxofrado del ajo con 6% de disulfureto de alil-propilo, 60% de disulfureto del dialilo, cantidades reducidas de disulfureto de dietilo y tetrasulfureto de dialilo y 20% de trisulfureto de dialilo, alicina, albumina, ácido fosfórico libre, sulfureto de alila, aliina, ajoenos E y Z, bioflavonóides, desoxialiina, ácido aliilsulfínico, isosulfocianato de alilo, heterósidos sulfurado (escoldina A y B), vitaminas A, C, B1 y B8, glucosa, fructosa, sacarosa, fructosanas, mucílago, pectina, enzimas (aliinasa, lisozima, peroxidasa, catalasa) y proteínas. La combinación de todos ellos le confiere una serie de propiedades, entre ellas las de tipo antiséptico. Esta propiedad ha sido ampliamente estudiada (Naganawa y col., 1996), y se ha establecido, por ejemplo, su valor para impedir el crecimiento de esporulados, así como también el de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. En estos casos la acción antimicrobiana se estimula a temperaturas comprendidas entre 20° C y 37° C, por lo que la adición de aceites especiados y ajo macerado contribuyen a reducir significativamente los niveles de contaminación, así como de la presencia de algunos patógenos (Naganawa y col., 1996; Tsao y Yin, 2001).

Mecanismos de acción bacteriana de la alicina

La alicina reacciona específicamente con grupos tiol libres de numerosas proteínas, produciendo la inactivación de una variedad de enzimas como la papaína, calpasa y alcohol deshidrogenasa. La alicina también reacciona con el tiol libre, contenido en moléculas como glutatión (Ross y col., 2001). Posee una alta reactividad con uniones S-H, presenta gran difusión y penetración a través de membranas celulares, no induce fusión o agregación de membranas. Su fuerte difusión incrementa considerablemente la interacción intracelular con grupos tiol (Ross y col., 2001; Gara y col., 2000).

La alicina bloquea paquetes enzimáticos de hongos y bacterias dañinas, inhibiendo cualquier actividad. Cuando las bacterias se hacen resistentes a antibióticos, la alicina puede ser una alternativa importante y efectiva, ya que los microorganismos no pueden cambiar su batería enzimática para volverse resistentes (Gara y col., 2000).

II.1.1.2 Orégano

La palabra orégano deriva de la unión de 2 palabras griegas: "oros" que significa monte, y "granos" belleza vistosa.

Desde la antigüedad, el orégano ha tenido un buen uso en la cocina romana. Su uso ha continuado también en los siglos sucesivos. Además de su uso culinario se utilizaba, por su perfume penetrante, como desinfectante de ambientes durante las epidemias, quemado en amplios braceros junto con el tomillo y la menta (Lambert y col., 2001).

El orégano (*Lippia graveolens*), se le atribuyen propiedades medicinales como tónico aperitivo, digestivo, carminativo, colerético, espasmolítico, expectorante, antiséptico de las vías respiratorias, tónico general y diurético. A nivel externo se considera analgésico, cicatrizante y antiséptico (Kalemba y kunicka, 2003), ya que reduce la proliferación de microorganismos y que poseen efectos antifúngicos, insecticidas y actividades antimicrobianas (Janssen y col., 1987).

El orégano, contiene sustancias antioxidantes como los tocoferoles, carvacrol y timol por lo que se utiliza para especiar aceites o productos grasos, ya que prolonga su vida útil de anaquel (Sánchez-Escalante y col., 2003). El carvacrol y al timol, las dos sustancias fenólicas mayoritarias en el aceite esencial de orégano (aproximadamente entre el 72-82%), son responsables de su aroma y acción antibacteriana. Además, se pueden detectar otras sustancias

como los monoterpenos. Es posible que todas estas sustancias actúen conjuntamente y no por separado (Hakki y col., 2003).

La hierba seca contiene varios ingredientes activos, como el aceite volátil (hasta el 3%), que también contiene carvacrol, timol y borneol, además de flavonoides, ácido rosmarínico y triterpenoides como los ácidos ursólico y oleanólico (Aligiannis y col., 2001).

La obtención de los aceites esenciales se realiza mediante la disolución de un polvo deshidratado obtenido a partir de flores de orégano, en solventes orgánicos. Posteriormente, se eliminan los restos no disueltos y se evapora el solvente orgánico. De esta manera se obtiene un residuo que puede ser a su vez disuelto en una mezcla oleosa concentrada.

Mediante métodos de extracción y de separación, actualmente se ha conseguido el aislamiento e identificación por métodos espectroscópicos de timol y carvacrol, fenoles volátiles monoterpénicos, como principales sustancias responsables de la actividad antimicrobiana (Sivropoulou y col., 1996).

Entre el grupo diverso de componentes químicos en los aceites esenciales, el carvacrol ejerce una acción antimicrobiana distinta. Carvacrol es el componente mayor del fragmento de aceite esencial de orégano (60 a 74% carvacrol) y en tomillo aproximadamente (45% carvacrol) .

Los compuestos como el carvacrol actúan directamente en las membranas biológicas. La membrana citoplasmática de las células tiene como funciones principales: la función de la barrera y transducción de energía, permite formar las pendientes iónicas, y forman la matriz para las proteínas incluidas en la membrana (Lambert y col., 2001).

Mecanismos de acción bacteriana del carvacrol y timol

La exposición de las células al carvacrol provoca la disminución del pH, afecta las concentraciones de adenosintrifosfato (ATP) intracelular, inhibe varias enzimas, influyendo a su vez en la síntesis de ácido desoxirribonucleico (AND), reduce la actividades metabólicas, y otros procesos en la célula.

El carvacrol actúa recíprocamente con las membranas cambiando su permeabilidad para los cationes como H^{+1} y K^{+1} . La dispersión de pendientes de iones, deterioro de procesos esenciales en la célula y finalmente produce la muerte celular.

Numerosos estudios muestra que el carvacrol y timol son bactericida frente a patógenos y en particular a *E. coli* en cultivos puros. Se ha mostrado que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de carvacrol y timol es de 3 mm y 1 mm para *E. coli* y *Salmonella* Typhimurium, respectivamente. Una combinación de carvacrol y timol parece ser bactericida frente a coliformes fecales (Sivropoulou y col., 1996).

Estos químicos, como la mayoría de los aceites derivados de plantas, generalmente son reconocidos como seguros; sin embargo, cualquier químico puede ser ambientalmente inseguro cuando se usa en concentraciones altas. Es factible que el carvacrol y timol volatilice en basuras o se metabolice por los microorganismos de la tierra (Ultee y col., 1999).

II.1.1.3 Zacate limón

El *Citratius cymbopogon*, normalmente conocido como el té de limón se ha usado, durante muchos años, y principalmente en África Oriental con propósitos medicinales, es un aceite volátil que se produce principalmente en sus hojas (Marjorie, 1999).

El hombre que vive en el área rural ha dado importancia a esta planta por sus usos medicinales y porque la ha usado en barreras vivas para la conservación de suelos. Los usos de los aceites esenciales del zacate limón son muy antiguos, se le ha usado en perfumería, en medicina y en la industria para aromatizar productos industriales como los desinfectantes, jabones, aerosoles (Amaya y col., 1983). También se ha utilizado para la conservación de suelos, ya que tiene rápido crecimiento y es un material vegetativo que se adapta a diversas condiciones de suelo (<http://www.plantasmedicinales.org>).

En la India, un té preparado del zacate limón se usa como un sedativo para el sistema nervioso central.

El aceite esencial de zacate limón también es usado para tratar una gran variedad de condiciones de salud como el acné, el pie de atleta, la transpiración excesiva, la flatulencia, dolores del músculo etc. En el aceite esencial de zacate limón su principalmente componente es el citral (aproximadamente, 65-80%) (Marjorie, 1999).

Por métodos de cromatografía y métodos de espectrografía se ha encontrado al citral como principio activo del aceite del zacate limón, proporcionándole a este las propiedades antibacterianas, inhibiendo a microorganismos gram-negativos y gram-positivos, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Diplococcus*, *Proteus*, *Shigella*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Brucella*, *Listeria*, *Pasteurella*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomona*, *Trichophyton interdigital*, y hasta contra protozoarios (Raman y col., 1995).

El citral constituye aproximadamente 3% de los compuestos oxigenados contiene también aldehídos y ácidos carboxílicos (Chan y Loudon, 1998).

Mecanismo de acción bacteriana del citral:

El citral actúa por contacto, a través del sistema de citoplasmosis, exterminando los microorganismos patógenos al romper y "explotar" su pared celular y su citoplasma. Dañando de esta manera el ciclo vital de la célula e interrumpiendo su multiplicación.

1. Penetración a través de la pared celular y destrucción parcial de la misma.
2. Deficiente regulación de la concentración catiónica.
3. Desorganización de las reacciones bioquímicas.
4. Muerte celular (Chan y Loudon, 1998).

II.2 INOCUIDAD ALIMENTARIA

En la actualidad la inocuidad alimentaria se ha convertido en una prioridad, tanto para la salud pública como para asegurar la competitividad y posicionamiento de productos en el mercado internacional, por esta razón, surge la necesidad de implementar buenas prácticas de manufactura (GMP's) en el proceso de elaboración de los alimentos. Un alimento inocuo es aquel que no representa ningún riesgo para la salud, brinda seguridad al consumidor y representa un apoyo fundamental en salud pública, porque se reducen los índices de intoxicaciones causadas por su consumo. El proceso de fabricación y manipulación de alimentos, requiere un control de calidad higiénico muy estricto debido a que las materias primas son de origen animal o vegetal y por lo general siempre están contaminados. Por lo tanto entre las cualidades deseables para la calidad de los alimentos está la excepción de microorganismos infecciosos. Si bien es imposible conseguir una tolerancia cero para todos los microorganismos con los procedimientos correctos de fabricación (GMP's), la producción de alimentos con un número más bajo de microorganismos infecciosos es el objetivo deseable (Fernández, 2000).

Los procedimientos clásicos para controlar la calidad microbiológica se basan principalmente en las determinaciones microbiológicas tanto en las materias primas como en los productos acabados, aunque para algunos productos el tiempo necesario para obtener resultados es excesivamente largo (James, 1992).

El Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) es el método que tiene como objetivo garantizar la inocuidad de los alimentos desde la granja hasta las casas particulares. Los criterios microbiológicos consisten en normas, especificaciones y recomendaciones que minimizan los peligros, y han sido útiles para asegurar la inocuidad y la calidad de los alimentos (James, 1992).

II.2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. Se ha comprobado que los alimentos son una vía de transmisión de numerosos agentes patógenos de origen bacteriano, parasitario y viral. También puede ser el sitio de almacenamiento de varios productos químicos tóxicos, producidos naturalmente o como resultado de la contaminación (Adams y Moss, 1995). La contaminación de los alimentos puede ser endógena, o bien ocurrir en algún punto de su transformación. Por tanto, el agente etiológico debe existir en los animales, vegetales o en el ambiente donde se almacena, maneja o procesa el alimento (Adams y Moss, 1995).

Existen aproximadamente 250 enfermedades producidas por alimentos contaminados, donde los síntomas son variados y dependen del agente etiológico. Los agentes más frecuentes son: *Salmonella ssp.*, *Campylobacter sp.*, *E.coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sp.*, *Yersinia*

enterocolítica, Clostridium sp., Vibrio cholerae, virus y parásitos (Ekperigin y Nagaraja, 1998).

Generalmente, los microorganismos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades, y deben encontrar en ellos las condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse, hasta alcanzar los niveles necesarios para ser infectantes o producir la suficiente toxina para causar la enfermedad (ICMSF, 1980). Las manifestaciones de las tóxico infecciones alimentarias son generalmente de tipo gastrointestinal aunque en algunos casos el cuadro clínico es de tipo extraintestinal. Cada vez se presenta con más frecuencia la transmisión de patógenos por alimentos en síndromes tóxicos, respiratorios y enfermedades crónicas (James, 1992). Organismos patógenos de reconocida importancia se han aislado de alimentos en los que se creía no proliferarían. Algunos de ellos han mostrado resistencia a las técnicas de procesamiento y almacenamiento que antes se consideraban seguras, lo que representa una preocupación para la industria alimentaria; esto determina que la protección alimentaria sea una prioridad para la salud pública, para la cual se deberían realizar grandes esfuerzos en busca de la prevención de estas enfermedades. Las dos herramientas más importantes a este respecto son la investigación y la vigilancia (James, 1992).

Asimismo, las dos décadas pasadas se ha registrado un incremento importante en el consumo de frutas y vegetales frescos en países industrializados como Estados Unidos. Eso se ha dado debido a un marcado incremento en la distribución global de producto hortofrutícola (Brooks, 1969). Sin embargo, instituciones de salud pública han documentado incrementos significativos en el número de enfermedades asociado al consumo de vegetales frescos. De acuerdo al centro de control de enfermedades (CDC), el número de brotes relacionados al consumo de producto fresco contaminado por microorganismos patógenos reportados por año, ha sido el doble durante el periodo de 1988-1992. Comparado con el periodo 1973-1987. Datos de brotes

de enfermedades relacionaron infecciones por *Salmonella* Staley en germinados de alfalfa, *Salmonella* Harford en jugo de naranja, *Shigella* spp. en lechuga, *Escherichia coli* O157:H7, en variedades de lechuga y virus de hepatitis A, en tomate (Wilkins y Baltimore, 1994). Durante los años 1991 y 1992, se han registrado nuevos brotes infecciosos relacionando *Cryptosporidium* con jugo de manzana no pasteurizada, y virus de hepatitis A, en fresas. Estos son solo unos ejemplos de brotes de enfermedades identificadas como resultado del consumo de vegetales frescos o mínimamente procesados (James, 1992).

En respuesta a la creciente preocupación acerca de las frutas y vegetales como fuentes de enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos, en 1995, la Food and Drug Administration (FDA) solicitó al comité asesor en criterios microbiológicos en alimentos de los Estados Unidos (NACMCF) investigar y caracterizar la asociación de enfermedades causadas por el consumo de alimentos y, microorganismos patógenos con vegetales frescos que han documentado la epidemiología y ecología microbiana de organismos relacionados con brotes asociados al consumo de producto fresco, y ha revisado las practicas actuales relacionadas al cultivo, cosecha, empaque y distribución de frutas y vegetales frescos (Adams y Moss, 1995).

II. 2. 2 *Escherichia coli*

Características generales:

E. coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999). Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1985). Ella está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia

distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados (Neidhardt, 1999).

E. coli es la especie tipo del género *Escherichia*, incluye gérmenes generalmente móviles, que producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Producen reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer. Son inhibidos por KCN e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía. Son H₂S, ureasa y fenilalanina negativos, pero en general son indol positivos y decarboxilan la lisina. Se clasifican en más de 170 serogrupos O, según las características antigénicas de su lipopolisacáridos, y serotipos por la combinación de antígenos O y H flagelares. Otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación (Ewing, 1985; Nataro y Kaper, 1998).

E. coli coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio (Drasar y Hill, 1974). Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes".

E. coli puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización (Nataro y Kaper, 1998), que se

transmiten por vía fecal-oral de persona a persona o a través del agua y alimentos.

II.2.3 Salmonella

Características generales

El género *Salmonella* es uno de los más extensamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. Ello se debe a la frecuencia con la cual el germen participa en los brotes y casos individuales de gastroenteritis.

El nombre dado a este microorganismo fue introducido por Lignieres en 1900 en honor al doctor Salmón, descubridor del germen. El primer brote de salmonelosis se descubrió en Alemania e 1888, entre 50 personas que habían consumido carne cruda molida proveniente de una vaca moribunda (Tauxe, 1991; ICMSF, 1996). El padecimiento se mantiene endémico en todos los países, incluidos los más industrializados en donde de vez en cuando se presentan brotes masivos (Fernández, 2000).

Salmonella es un género de la familia *Enterobacteriaceae* (Brenner, 1984). Son bacilos gram-negativos, generalmente móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos, no esporulados. El género *Salmonella* fue objeto de sucesivas modificaciones, a través de los años, en lo que respecta a su nomenclatura y taxonomía. Sin embargo, todavía siguen vigentes las ideas desarrolladas por P. R. Edward y H. W. Ewing, en la década del 40, cuando definieron e identificaron las primeras cepas del género *Salmonella* y de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Estudios de ADN mediante técnicas de hibridación mostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies *Salmonella* Enterica y *Salmonella* Bongori. *Salmonella* Enterica está compuesta por 6 subespecies *Salmonella* Enterica subespecie Enterica, *Salmonella* Enterica subespecie Salamae, *Salmonella* Enterica subespecie

Arizonae, *Salmonella* Enterica subespecie Diarizonae, *Salmonella* Enterica subespecie Houtenae y *Salmonella* Enterica subespecie Indica. A su vez las subespecies de *Salmonella* Enterica y la especie *Salmonella* Bongori se dividen en más de 2400 serovariedades, que están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H.

Con el desarrollo de las técnicas de análisis antigénico y su aplicación a los microorganismos en la década de los años 20, se describieron muchos tipos diferenciales serológicamente, de modo que actualmente el grupo de *Salmonella* esta constituido por muchos cientos de serotipos (Ferreraz, 1996). Se ha determinado una sola especie, *Salmonella* Enterica con numerosos serovares (Le Minor y Popoff, 1987). Bajo este nuevo sistema, la bacteria S. Enteritidis se designa correctamente *S. enteritidis* subespecie *enterica*, serovar Enteritidis (Breneer y col., 2000).

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie Enterica, subespecie I (Gibson y col., 1992).

Los miembros del género *Salmonella*, están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales (García del Portillo, 2000; Le Minor y Popoff, 1987).

Infecciones causadas por *Salmonella*

Los principales síndromes originados por *Salmonella* son:

1.- Gastroenteritis: consecuencia de la ingestión de células viables de origen alimentaría. El periodo de incubación varia desde 5 horas a 5 días; los signos y

síntomas empiezan 12-36 horas después de la ingestión de un alimento contaminado y son: diarrea, náuseas, dolor abdominal, fiebre ligera y escalofríos. El síndrome solo dura 2-5 días (ICMF, 1996).

2.- Fiebre tifoidea: únicamente afecta a la especie humana. El agente etiológico es casi siempre *Salmonella* Typhi, cuando no está producida por la *Salmonella* Typhi, se habla de fiebre paratifoidea, provocada por *Salmonella* Paratyphi. El periodo de incubación varía desde 7-28 días. Los síntomas son: malestar cefalalgia, fiebre alta persistente, dolor abdominal, dolores en el cuerpo y debilidad, generalmente acompañados de una diarrea parecida al puré de guisantes o de estreñimiento. A veces, en el tronco, en el dorso y en el tórax, aparecen manchas de color rosa. Otras veces se observan con ritmo cardíaco lento, abdomen sensible y dilatado, aumento del tamaño del bazo y en ocasiones hemorragia intestinal o nasal. La convalecencia es lenta de 1- 8 semanas (ICMSF, 1996).

3.- Bacteriemia con metástasis sépticas o sin ellas: la bacteriemia o septicemia es causada por la presencia de *Salmonellas* en la sangre. Esta puede aparecer por metástasis cuando el sitio inicial de la infección es el tracto intestinal u otros focos. Los síntomas son fiebre alta y persistente, dolor en el dorso, abdomen y en el tórax, escalofríos, sudoración, malestar, anorexia y pérdida de peso. El estado puede ser pasajero o crónico. Las secuelas identificadas incluyen: apendicitis, artritis, colecistitis, endocarditis, abscesos locales, meningitis, osteomielitis, osteoartritis, pericarditis, peritonitis, pleuritis, neumonía e infección de las vías urinarias (Ferreraz, 1996).

4.- Portador asintomático: se define con la persistencia de *Salmonella* spp. en heces, durante más de un año. La incidencia de portador fecal después de una enteritis por *Salmonella* spp. es del 0,2-0,6% el foco crónico de infección suele ser el árbol biliar. La dificultad de erradicarla reside en la presencia de cálculos biliares. Algunos serotipos se relacionan con mayor frecuencia con un

determinado síndrome. Así, *S. Newport* y *S. Anatum* originan predominantemente gastroenteritis; *S. Typhi* y *S. Paratyphi A, B, C* son los responsables de la fiebre tifoidea; *S. Choleraesuis* causa a menudo bacteriemia (Ferreraz, 1996; Freeman, 1989).

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. La tasa de incidencia de la infección es mayor en los lactantes y en niños de corta edad. Epidemiológicamente, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo, el 60 - 80% de los casos son esporádicos; a veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternales, geriátricos y restaurantes (Adams y Moss, 1995).

Es una enfermedad fundamentalmente de origen alimentario, la fuente más frecuente de infección son los alimentos contaminados. También puede ocurrir la transmisión de persona a persona. A pesar de todos los controles que se han puesto en práctica, las infecciones por *Salmonella* debidas al consumo de alimentos contaminados continúa siendo un problema serio con millones de casos que ocurren anualmente en todo el mundo, provocando grandes pérdidas económicas. En 1989, se estimó que solamente en los Estados Unidos, el costo de las salmonelosis producidas por alimentos llegaba a la cifra de 3.990.000.000 dólares. La vigilancia de *Salmonella* en todas las etapas de la cadena de procesamiento de los alimentos constituye un elemento importante en la investigación de la epidemiología de la salmonelosis transmitida por alimentos y en el desarrollo e implementación de estrategias eficientes de control de la misma. En programas de monitoreo y control es esencial contar con métodos de laboratorio eficientes para el aislamiento, identificación y tipificación de *Salmonella* (Ferreraz, 1996).

El método microbiológico utilizado para la detección de *Salmonella* en alimentos describe cinco fases principales que son:

1.- Pre-enriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.

2.- Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

3.- Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas (Vassiliadis, 1983).

4.- Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

5.- Serotipificación, que permite la identificación específica de *Salmonella* mediante el empleo de sueros específicos (NOM-114SSAI-1994).

II.3. METODOS PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los métodos para evaluar actividad antimicrobiana han sido ampliamente utilizados en todo el mundo, durante muchos años ya que son técnicas cómodas, fáciles, económicas y mantiene una fiabilidad alta, la cual les ha permitido continuar en el mercado (Bauer y col.,1996). De acuerdo con la farmacopea el método de difusión en agar y el método turbidimétrico son los dos métodos de referencia utilizados para determinar la potencia del antibiótico (Merino, 1994).

II.3.1 Método de difusión en agar

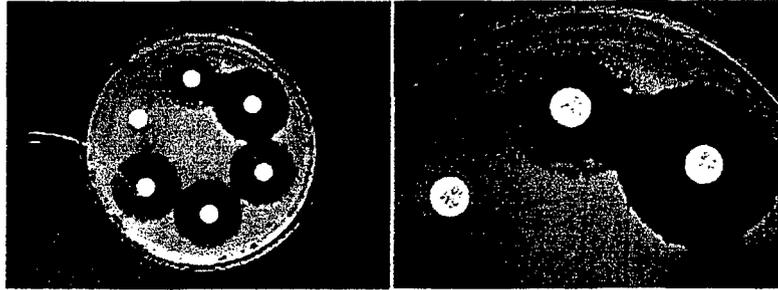
Se basa en la difusión del compuesto desde el punto de aplicación, a través de una superficie de agar inoculado con el microorganismo de prueba. La difusión origina zonas de inhibición del microorganismos, cuyo tamaño (diámetro) esta en relación con la concentración del antibiótico (Merino, 1994).

Este método fue modificado en 1947 por Bondi y colaboradores incorporando el agente antimicrobiano a discos de papel de filtro. Fue un paso adelante gigantesco ya que el uso de los discos de papel permitía preparar un gran número de pruebas idénticas y almacenarlas para uso futuro.

En 1966, después de los estudio realizados por Bauer, Kirby, Sherris y Turk, ensayando diferentes cepas bacterianas, el empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad fue estandarizado y correlacionado definitivamente con las CMI correspondientes.

Durante muchos años, y a pesar de ser una técnica puramente cualitativa, el método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido, y aún es, uno de los más utilizados en los laboratorios de todo el mundo (Baker y col., 1991).

El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos (Merino, 1994). Se incuban las placas durante 16-24 horas a 35° C y al cabo de este tiempo se estudia el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias oportunas publicadas por el NCCLS. Con esta referencia podemos informar si el microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente (S, I, R) a cada uno de los antibióticos ensayados en las placas (Baker y col., 1991).



II.3.2 Método turbidimétrico

Este método se efectúa en un medio de cultivo líquido inoculado con el microorganismo de prueba, al que se le agrega concentraciones crecientes del antibiótico. Después del periodo de incubación, se determina la turbiedad producida por el crecimiento microbiano, el cual está en función de la concentración del compuesto (Merino, 1994).

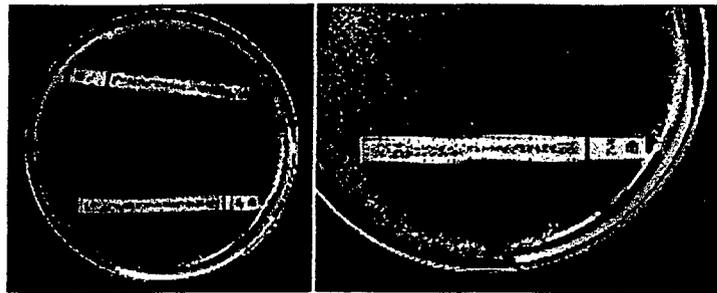
II.3.3 Método de e-test

Es una modificación del método de difusión en agar. Se trata de una técnica cuantitativa en placa que permite obtener una lectura directa de CMI en $\mu\text{g/ml}$, ya que se emplean tiras plásticas impregnadas en concentraciones crecientes de antibiótico indicadas en una escala graduada sobre la propia tira (Rosser y col., 1999).

Una de sus grandes ventajas, dadas sus características, es que resulta un método ideal para estudiar cualquier tipo de microorganismo, aerobio o anaerobio, incluyendo aquellos llamados "fastidiosos" o los que tengan requerimientos especiales para crecer.

El microorganismo a investigar se inocula en una placa y sobre ella se deposita la tira del antibiótico (o antibióticos) a ensayar. Tras la incubación de

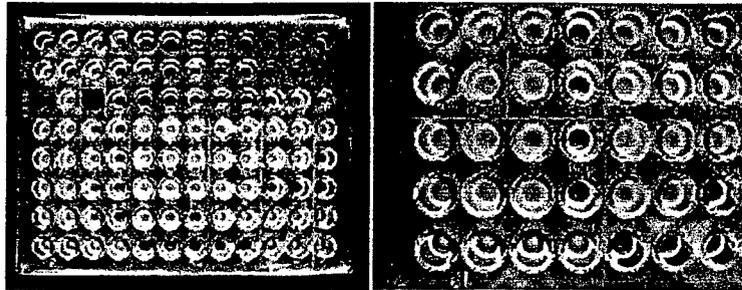
16-24 horas a 35° C, se observan las placas y se valora la zona de inhibición, de forma elíptica, alrededor de cada tira. La CMI se lee directamente observando el punto más bajo de la elipse que presente crecimiento (Baker y col., 1991).



II.3.4 Métodos automatizados

La mayoría de estos novedosos métodos utilizan sistemas de micro dilución en medio líquido sobre micro placas con pocillos en "U" e interpretan el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un auto analizador (mediciones por turbidez o fluorescencia) o, en el caso de los sistemas más sencillos, por simple lectura óptica del técnico a través de un visor invertido de espejo.

Su manipulación suele ser fácil y rápida, generalmente automatizada o semi automatizada, lo que los convierte en métodos ideales para grandes volúmenes de trabajo. Una de sus grandes limitaciones es que sólo ofrecen garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y que no tengan requerimientos especiales (Baker y col., 1991).



El presente trabajo utiliza una adaptación del método de microdilución incorporando la reducción de colorante, mediante el empleo del azul de resazurina para determinar viabilidad celular. El método de reducción de colorante se basa en los cambios de color que experimentan determinados compuestos en solución, bajo la actividad reductora de algunos microorganismos. Para su realización se añaden a las muestras de interés soluciones patrón de azul de metileno o de resazurina, cuya coloración cambia (el azul de metileno vira de azul a blanco y la resazurina de azul apizarrado a rosa o blanco). El tiempo necesario para la reducción del colorante depende de la actividad enzimática bacteriana y está inversamente relacionado con el número de microorganismos presentes en la muestra (Mann y Markham, 1998).

El ensayo de viabilidad celular proporciona un método homogéneo para estimar el número de células viables presentes en los pocillos de la placa multicanal. Las células viables tienen la habilidad de retención y así reducir la resazurina en resorufin, originando el cambio de color azul a rosa. Las células no viables rápidamente pierden la capacidad metabólica y no reducen el colorante del indicador, permaneciendo con el color azul original del indicador (Guerin y col., 2001).

III.- JUSTIFICACIÓN

III.- JUSTIFICACIÓN

Los productores preocupados por el posible efecto negativo sobre la salud de algunos consumidores de alimentos que han incrementado su uso a nivel industrial en la búsqueda de productos con un vida de anaquel más larga, han presionado a los industriales en el uso de alternativas naturales que aseguren la inocuidad de los alimentos. Por lo tanto, es necesario ampliar la búsqueda de sustancias preferentemente de origen natural que permitan su utilización como agentes antimicrobianos tanto a nivel industrial como su uso agrícola.

El empleo de sustancias naturales prolonga y mejora la vida de muchos productos elaborados por diversas técnicas entre ellas la congelación, ya que es una técnica que suele facilitar la oxidación de los compuestos grasos de los alimentos, su utilización favorecen su conservación, mantiene el sabor habitual de los alimentos y evita pérdida nutricionales, no crea resistencia microbiana a diferencia de los antibióticos convencionales, mantiene un poder antioxidante elevado; gracias a ello ha incrementado positivamente el nivel de apreciación del consumidor.

Considerando lo anterior el presente trabajo pretende evaluar los extractos naturales de orégano, zacate limón y ajo, frente a *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*, con la finalidad de establecer dosis de aplicación efectivas, que puedan ser utilizadas en la industria alimenticia, sistemas de descontaminación de frutas y hortalizas, así como su empleo como aditivos en conservación de alimentos, para prolongar su vida útil.

Es importante destacar el impacto económico que representa en nuestro país, el empleo de estas plantas, ya que su cultivo es relativamente sencillo, de fácil manejo y crecimiento. A todas estas características se suma la posibilidad de incrementar los ingresos, teniendo en cuenta que el precio de la planta en

seco es de aproximadamente 1 dólar por kilogramo, el del aceite en bruto es de 8 dólares el kilogramo y el del aceite fraccionado es de 200 dólares el kilogramo.

IV.- HIPOTESIS

IV HIPÓTESIS

Los extractos naturales de orégano, zacate limón y ajo, aplicados a una concentración adecuada, pueden funcionar como antimicrobianos con actividad específica frente a *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli*.

V.- OBJETIVOS

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de aceites esenciales de orégano, ajo y zacate limón, frente a *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli* utilizando el método de micro-dilución.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de orégano, zacate limón y ajo.
2. Comparación de la CMI de los extractos probados contra cada una de las bacterias.

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico:

El estudio se realizó empleando dos bacterias: *Escherichia coli* (ATCC) 8739 y *Salmonella* Typhimurium (ATCC) 14028. Las cepas se adquirieron del Laboratorio de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

VI.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS

La revitalización de los microorganismos se realizó en caldos de enriquecimiento. Para *Escherichia coli*, se utilizó el caldo nutritivo Nutrient broth, (DIFCO). En el caso de *Salmonella* Typhimurium, se empleó caldo Rappaport Vassiliadis.

Para estimar y estandarizar el número de microorganismos, tanto de los cultivos puros como de las diluciones, se realizaron siembras en PCA (Plate Count Agar). La incubación se realizó en un agitador orbital a 37° C, durante 24 h. Finalmente, el número de colonias crecidas en las placas se cuentan, manualmente. Todo el material y los medios para el cultivo de microorganismos fueron esterilizados a 121 lb, durante 20 min.

VI.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Los aceites esenciales fueron extraídos en la planta piloto de la División de Transformación del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. La extracción se realizó de fuentes naturales y el método utilizado fue destilación en corriente de vapor. La purificación se realizó por destilación al vacío.

VI.3. ENSAYO VISUAL PARA ESTIMAR LA VIABILIDAD CELULAR

Para la preparación del ensayo, se toman 1.7ml de cada dilución a las cuales se les adicionan 200µl de agar bacteriológico al 0.15%, posteriormente, se adiciono 100µl resarzurina al 0.01%, que es un colorante que permite estimar la viabilidad celular. Los tubos son incubados por 4h a 37° C en un agitador orbital, después de este tiempo en las alícuotas se observa el cambio de color de azul (oxida) a lila y rosa (reduce), la reducción del color en los tubos es testigo para definir el concentración de referencia a evaluar en el reto microbiano mediante el método de microdilución y el punto de referencia; es un logaritmo abajo del tubo cuya concentración experimente el cambio de color de azul a lila (Figura 1).

VI.3.1. Preparación de diluciones de los extractos de aceites esenciales en caldo nutritivo adicionado un agente estabilizante:

Las diluciones de los extractos de aceites esenciales, se realizaron en caldo nutritivo, al cual se le adiciono agar bacteriológico al 0.15% como agente estabilizador para mantener el contacto entre el aceite y el inóculo. Los porcentajes a probar fueron rangos amplio para poder determinar a que concentraciones se podía observar la inhibición de los microorganismos.

VI.3.2. Preparación de diluciones seriadas del inóculo ($10^8 - 10^0$ ufc ml⁻¹).

Se emplearon 10 tubos de vidrio aséptico (13X100), para las diluciones seriadas (10^8-10^0) que contienen 1800µl de caldo nutritivo; a las cuales se les añadió 200µl del inóculo original. Posteriormente, de las últimas diluciones que son 10^3 a 10^0 se toma 100µl y se siembran en PCA (Plate Count, Difco), con la finalidad de confirmar la concentración original del inóculo. La incubación de estas placas se realiza en un agitador orbital a 37° C, durante 24h.

VI.4. EVALUAR EL RETO MICROBIANO (MEZCLA INÓCULO-ANTIMICROBIANO) EN LOS POCILLOS DE UNA PLACA DE ELISA.

Para la evaluación del reto microbiano es necesario preparar el inóculo y el tratamiento de la misma manera que se describe en los apartados (VI.3.1 y VI.3.2) para el ensayo visual, además de haber estimado la concentración de referencia.

En los pocillos de una placa de ELISA que cuenta con 12 columnas y 8 filas, se depositan 170 μ l de cada dilución en las columnas 1 a 9 (10^8 a 10^0 ufc ml⁻¹) y el blanco en la columna 10. En las posiciones de las filas se rotulan las concentraciones del aceite a probar y se depositan 20 μ l de tratamiento. Se incuban en un agitador orbital a 37° C durante 4h. Este tiempo representa el periodo mayor de inhibición del aceite en la prueba. Debe ser suficiente para permitir que las densidades bacterianas no inhibidas alcancen su densidad de reducción de la resazurina. Después de la incubación, se agregaron 10 μ l de solución del resazurina a todos los pocillos excepto a la columna del blanco, a la cual se le agregó 10 μ l de agua destilada. Posteriormente, se incuban 2h a 37° C. Este periodo representó el tiempo máximo en que las células son más activas para metabolizar la resazurina. Este segundo tiempo de incubación es necesario ya que hay organismos más lentos para reducir la resazurina.

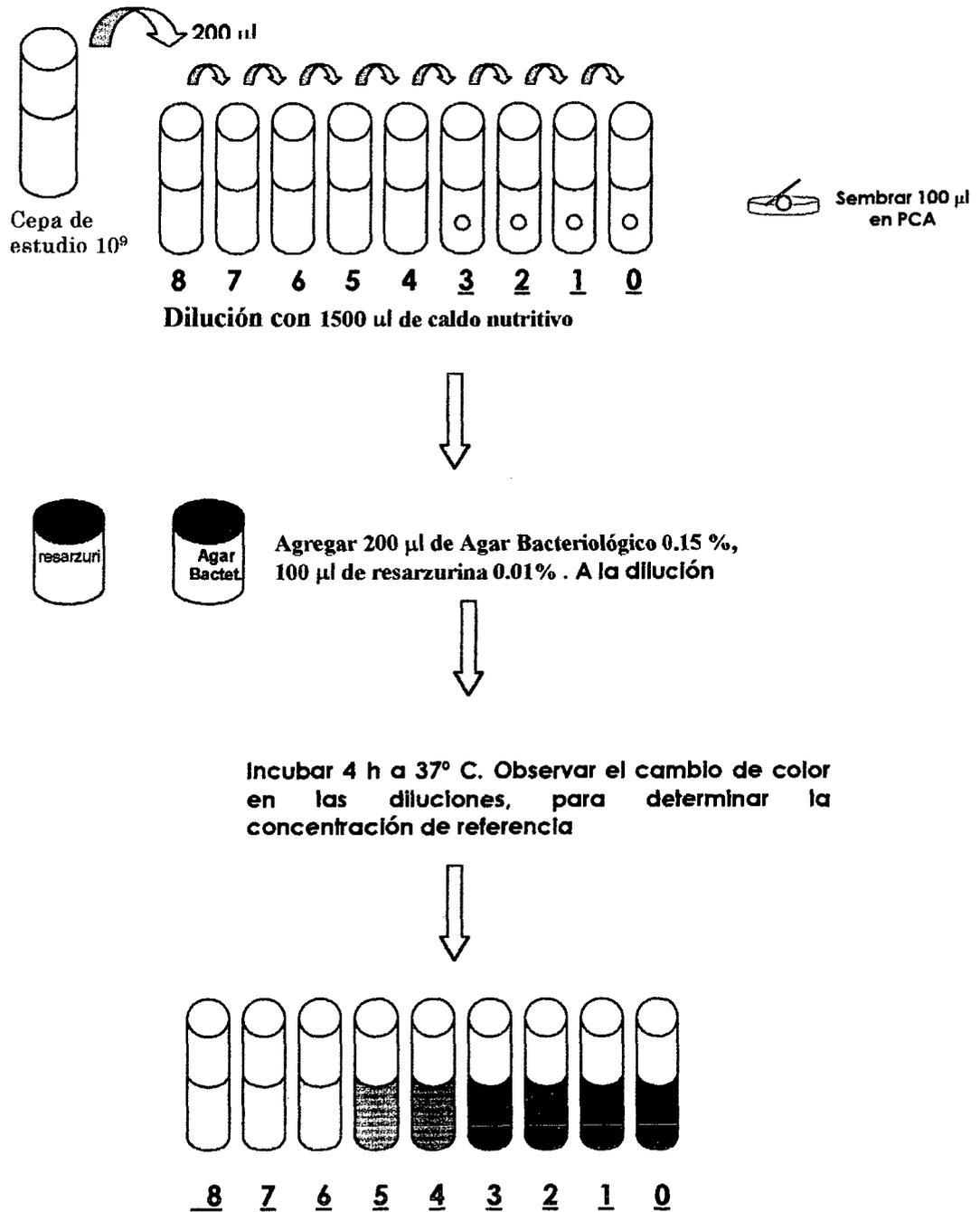
VI.4.1. Efectuar lecturas en absorbancia a 570nm

Después de la incubación, la placa de ELISA que contiene todos los ensayos de los tratamientos, la absorbancia se lee a 570 nm en un lector de placas de ELISA Modelo de Biorad 35550. Posteriormente, se realizan diluciones de la concentración de referencia con cada uno de los tratamientos; se siembran 100 μ l en PCA y se incuban en un agitador orbital a 37° C por un intervalo de tiempo de 16-18h, para estimar el número de UFC y los logaritmos que se redujeron con el tratamiento

VI.4.2. Correlacionar las lecturas en absorbancia, contra los logaritmos de ufc ml⁻¹.

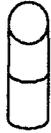
Después de la incubación se realiza la cuenta manual de las placas de (PCA), identificando la concentración en la cual el organismo de estudio fue inhibido por la dilución del aceite utilizado. Posteriormente, se grafican los resultados de las concentraciones de los aceites utilizados, las absorbancia y la unidades formadoras de colonia de cada cepa, identificando en la grafica el punto donde se encuentra la Concentración Mínima Inhibitoria.

FIGURA 1. ENSAYO VISUAL



ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA

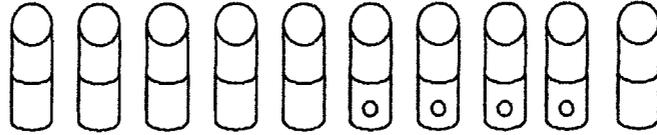
S. Typhimurium



E. coli

Inoculo 10⁹

200 μ l



10⁸ 10⁷ 10⁶ 10⁵ 10⁴ 10³ 10² 10¹ 10⁰ Bco

Sembrar
100 μ l en
PCA

Agregar a cada tubo 200 μ l de agar bacteriológico y 100 μ l de resazurina.

Depositar 170 μ l por pocillo de cada dilución, en posición de fila.



Agregar 20 μ l del agente antibacteriano, en posición de columna.
Incubar 4 h a 37 °C

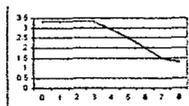
Agregar 10 μ l de resazurina a cada pocillo de la placa e incubar 2 h a 37 °C.
Excepto el blanco. Leer las absorbancia a 570 nm.



Sembrar en PCA las diluciones correspondientes al concentración de referencia



Incubar de 18 a 24 h a 37 °C. Realizar recuento microbiano y graficar el espectro de inhibición bacteriana



VII.- RESULTADOS

VII. RESULTADOS

VII.1. ENSAYO VISUAL

Como se describió anteriormente, el ensayo visual permite estimar la concentración de referencia de cada microorganismo para ser evaluada posteriormente en el método de micro dilución.

Los resultados obtenidos en el ensayo visual para *E. coli*, se muestran en la Figura 3, donde podemos apreciar que el cambio de color experimentado por la bacteria se realizó en la concentración correspondiente a 10^6 UFC ml^{-1} , por lo tanto la concentración de referencia para ser evaluada en el método de micro dilución será para *E. coli* 10^5 UFC ml^{-1} .

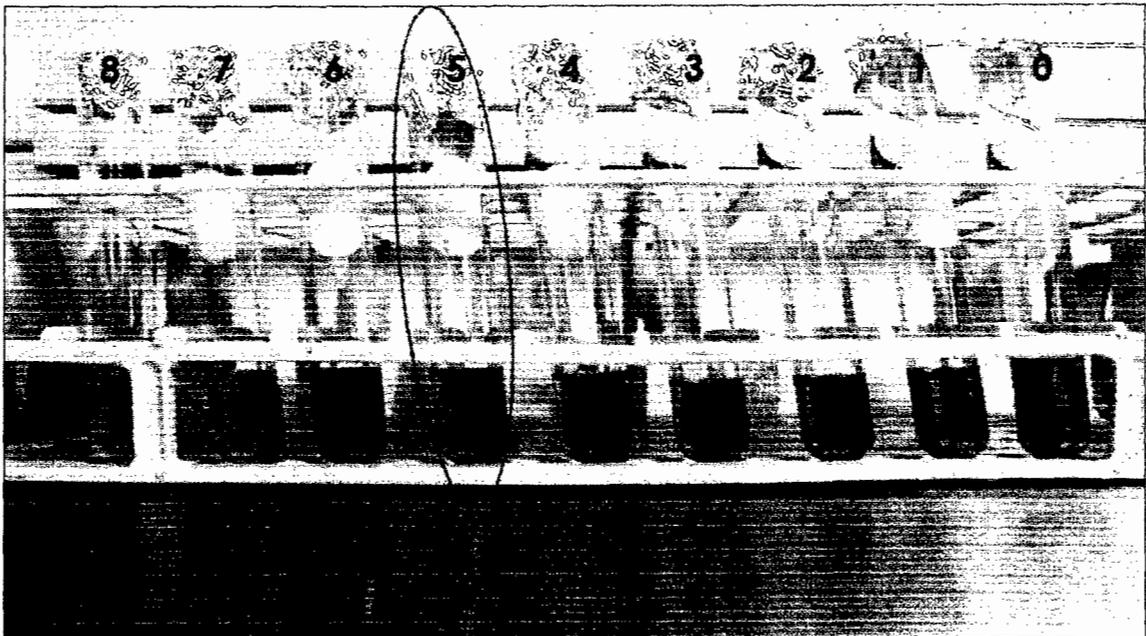


Figura 3. Ensayo visual de *Escherichia coli*

Por otra parte, los resultados del ensayo visual realizado para *S. Typhimurium* se muestra en la Figura 4, donde podemos apreciar que el cambio de color experimentado por la bacteria, se realizo en la concentración correspondiente a 10^5 UFC ml^{-1} , por lo tanto la concentración de referencia para ser evaluada en el método de micro dilución será para *S. Typhimurium* 10^4 UFC ml^{-1}

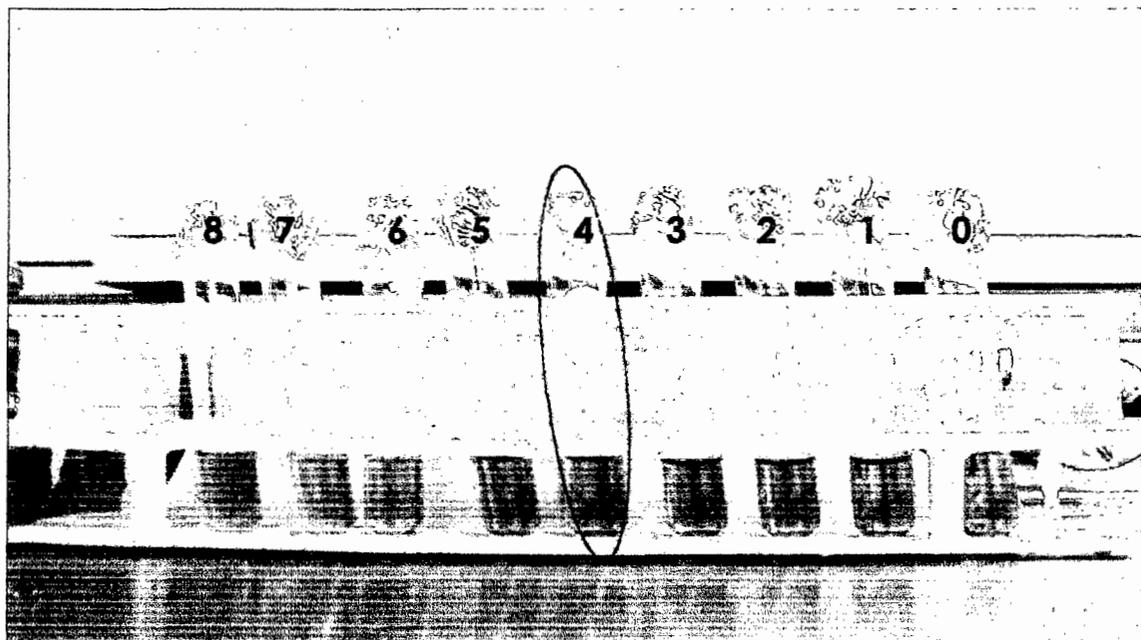


Figura 4.- Ensayo visual de *Salmonella Typhimurium*.

VII.2 EVALUACIÓN DEL RETO MICROBIANO

En el cuadro 1, se muestran los porcentajes utilizados de los aceites de orégano, ajo y zacate limón, así como la concentración original y el espectro de inhibición que tienen estos aceites frente a *E. coli*.

Como se puede observar, las concentraciones probadas para el aceite de orégano van de 0.1, 0.2, 0.3 a 0.4% debido a que a estas concentraciones fue posible observar que al 0.1% disminuye un logaritmo a la concentración de referencia, al 0.2% disminuye dos logaritmos, al 0.3% inhibe tres logaritmos y al 0.4% la inhibición fue total. Con el aceite del ajo el rango evaluado fue mas alto, partiendo de 2.0, 2.5, 3.5, 4.0 y 4.5%; en donde al 2.0% se mantiene el crecimiento bacteriano, y al 2.5% se logra inhibir un logaritmo, a la concentración original, al 3.5 y 4.0 % del aceite ya se tiene una inhibición de dos logaritmo y al 4.5% inhibe de tres logaritmos. En el aceite de zacate limón se evaluó un rango de 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, y 4.0 % en donde se obtiene los siguientes resultados al 1.5% se mantiene el crecimiento bacteriano de la concentración original; al 2.0% se logró la inhibición de un logaritmo; a las concentraciones 2.5, 3.0 y 3.5% se inhibe dos logaritmo y a la concentración de 4.0% inhibe tres logaritmos.

Cabe mencionar que los aceites de ajo y zacate limón, no fueron evaluadas con concentraciones más altas, hasta conseguir la inhibición total, debido a que las concentraciones requeridas para tal fin, ya no sería posible su uso en alimentos pues modificaría el sabor y olor original del mismo, además no son remunerable económicamente el uso de las concentraciones tan elevadas.

Aceite	% de Tratamiento	Concentración inicial	Espectro de inhibición
Orégano	0.1	10^5	10^4
	0.2	10^5	10^3
	0.3	10^5	10^1
	0.3	10^5	--
Ajo	2.0	10^5	10^5
	2.5	10^5	10^4
	3.5	10^5	10^3
	4.0	10^5	10^3
	4.5	10^5	10^2
Zacate limón	1.5	10^5	10^5
	2.0	10^5	10^4
	2.5	10^5	10^3
	3.0	10^5	10^3
	3.5	10^5	10^3
	4.0	10^5	10^2

Cuadro 1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de orégano, ajo y zacate limón, frente a *Escherichia coli*.

En el cuadro 2, se muestran los resultados obtenidos al evaluar los extractos de orégano, ajo y zacate limón frente a *S. Typhimurium*. Como podemos observar el rango utilizado para el aceite del orégano fue de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4%; donde se aprecia que al 0.1% el crecimiento bacteriano se mantiene; 0.2% logra la inhibición de un logaritmo y al 0.3% se logra inhibir dos logaritmos, siendo mas efectiva al 0.4% ya que se observa una inhibición total. Al utilizar el aceite del ajo, las concentraciones fueron mas altas en comparación con el aceite del orégano. En este caso se evaluó un rango que va de 2.0, 2.5, 3.5, 4.0%; en donde al 2.0% se mantiene el crecimiento bacteriano de la concentración original; al 2.5 y 3.0%, se logra la inhibición de un logaritmo; al 3.5% inhibe dos logaritmos y al 4.0% inhibe tres logaritmos. Para el aceite del

zacate limón los porcentajes evaluados fueron de 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0%, en donde se aprecia que al 1.5%, 2.0% y 2.5% no hay inhibición el crecimiento bacteriano, solo se mantiene a la concentración original; al 3% del aceite utilizado, se inhibe un logaritmo; al 3.5% dos logaritmos y al 4.0% la inhibición es total. Cabe mencionar que para el aceite de ajo no fue evaluado con concentraciones más altas hasta conseguir la inhibición total, debido a que las concentraciones requeridas para tal fin, ya no sería posible su uso en alimentos pues modificaría el sabor y olor original, además no son remunerable económicamente.

Aceite	% de Tratamiento	Concentración inicial	Espectro de inhibición
Orégano	0.1	10^4	10^4
	0.2	10^4	10^3
	0.3	10^4	10^2
	0.4	10^4	--
Ajo	2.0	10^4	10^5
	2.5	10^4	10^4
	3.0	10^4	10^4
	3.5	10^4	10^3
	4.0	10^4	10^2
Zacate limón	1.5	10^4	10^4
	2.0	10^4	10^4
	2.5	10^4	10^4
	3.0	10^4	10^3
	3.5	10^4	10^2
	4.0	10^4	---

Cuadro 2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de orégano, ajo y zacate limón, frente a *Salmonella Typhimurium*.

VII.3 CORRELACION DE LAS LECTURAS DE ABSORBANCIA, CONTRA LOS LOGARITMOS DE UFC ml⁻¹.

Los resultados obtenidos de las lecturas de absorbancias y unidades formadoras de colonias, se grafican con la finalidad de establecer la CMI, de cada extracto con su respectiva bacteria. Entendiéndose por CMI, la concentración más baja del compuesto que es capaz de inhibir el desarrollo del organismo problema (Southewell y col., 1993).

Escherichia coli frente orégano

% Tratam.	570nm	UFC
0.1	0.232	10 ⁴
0.2	0.235	10 ³
0.3	0.222	10 ¹
0.4	0.231	10 ⁰

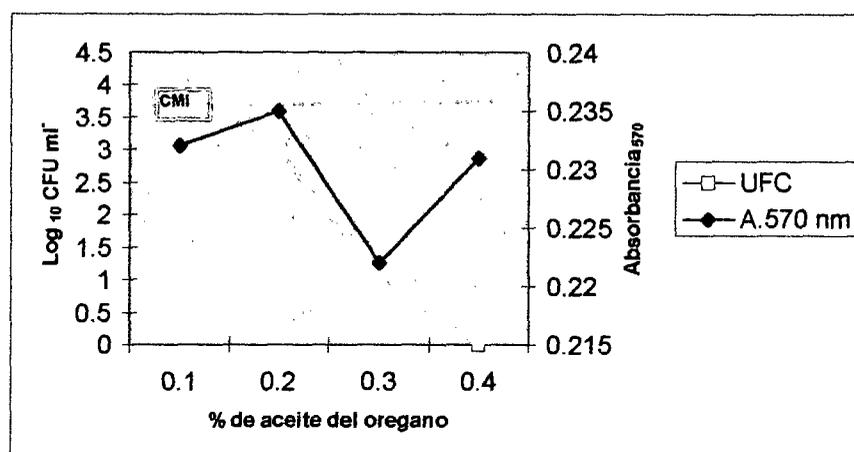


Figura 5. Comparación de los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución y los recuento en UFC resultado de la inhibición de las concentraciones de extracto de orégano (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 %), frente a *E. coli*. Densidad del inóculo 10⁵ UFC ml⁻¹. □ Log₁₀ cfu ml⁻¹. ● A_{570nm}-(CMI) Concentración Mínima Inhibitoria.

Escherichia coli frente a zacate limón

% Tratam.	A 570nm	UFC
1.5	0.635	10 ⁵
2.0	0.716	10 ⁴
2.5	0.694	10 ²
3.0	0.713	10 ²
3.5	0.680	10 ¹
4.0	0.645	10 ⁰

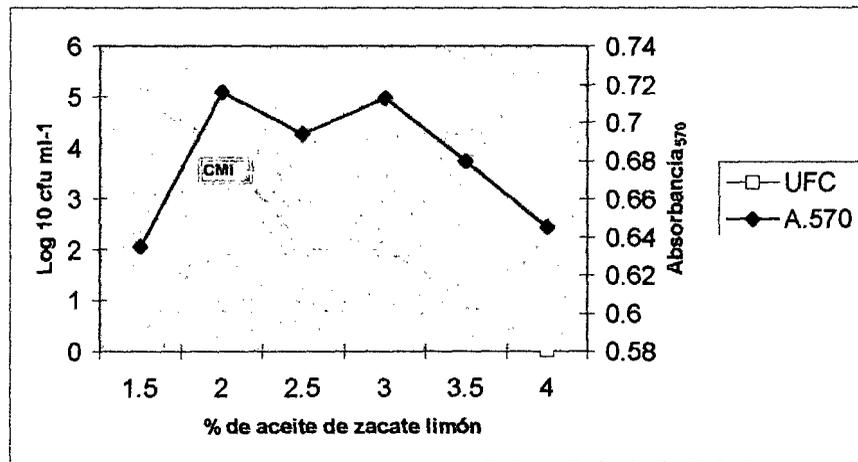


Figura 6. Comparación de los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución y los recuento en UFC resultado de la inhibición de las concentraciones de extracto de zacate limón (1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 %), frente a *E. coli*. Densidad del Inóculo 10⁵ UFC ml⁻¹. □ Log₁₀ cfu ml⁻¹. ◼ A_{570nm}. (CMI) Concentración Mínima Inhibitoria.

Escherichia coli frente ajo

% Tratam	A 570nm	UFC
2.0	0.168	10 ⁵
2.5	0.173	10 ⁴
3.5	0.186	10 ³
4.0	0.190	10 ³
4.5	0.186	10 ²

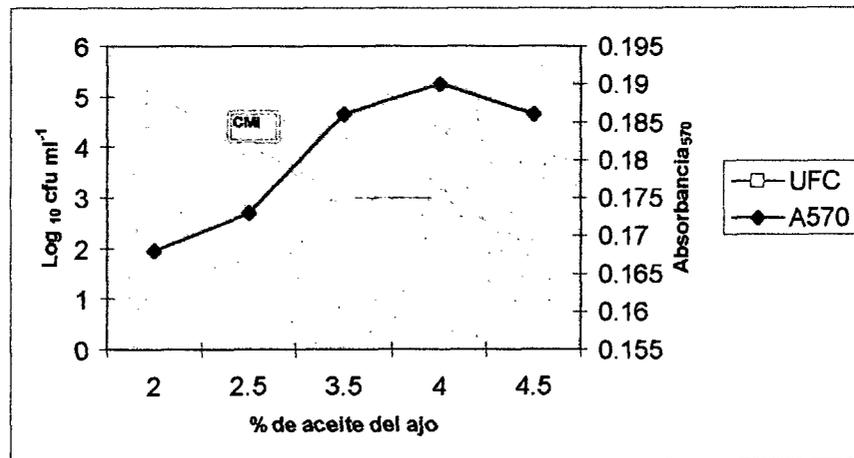


Figura 7. Comparación de los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución y los recuento en UFC resultado de la inhibición de las concentraciones de extracto de ajo (2, 2.5, 3.5, 4, 4.5 %), frente a *E. coli*. Densidad del inóculo 10⁵ UFC ml⁻¹. □Log₁₀ cfu ml⁻¹. □A_{570nm}. (CMI) Concentración Mínima Inhibitoria.

Salmonella Typhimurium frente orégano

% Tratam.	A 570 nm	UFC
0.1	0.205	10 ⁴
0.2	0.397	10 ³
0.3	0.515	10 ²
0.4	0.532	10 ⁰

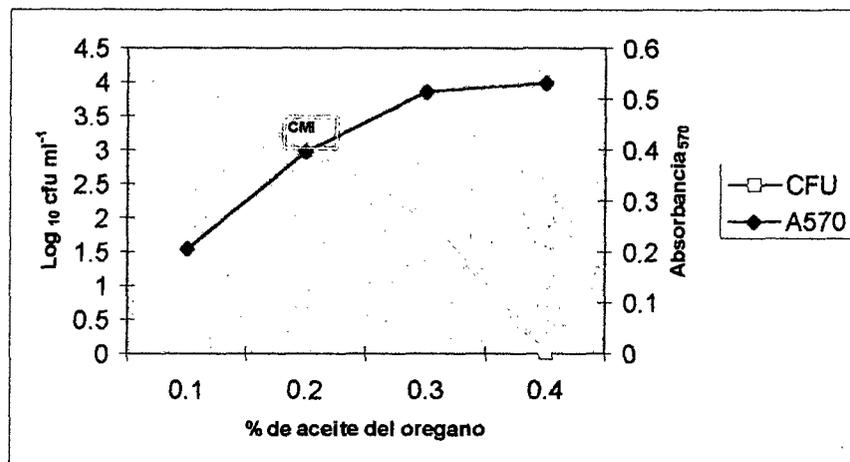


Figura 8. Comparación de los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución y los recuento en UFC resultado de la inhibición de las concentraciones de extracto de orégano (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, %), frente a *S. Typhimurium*. Densidad del inóculo 10⁴ UFC ml⁻¹. □ Log₁₀ cfu ml⁻¹. ■ A_{570nm}. (CMI) Concentración Mínima Inhibitoria.

Salmonella Typhimurium frente zacate limón

% Tratam.	A 570nm	UFC
1.5	0.143	10 ⁴
2.0	0.147	10 ⁴
2.5	0.15	10 ⁴
3.0	0.149	10 ³
3.5	0.154	10 ²
4.0	0.157	10 ⁰

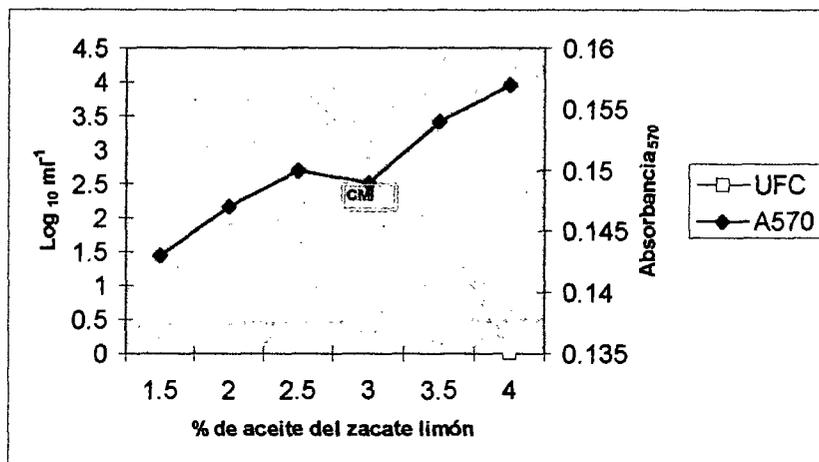


Figura 9. Comparación de los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución y los recuento en UFC resultado de la inhibición de las concentraciones de extracto de zacate limón (1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4,%), frente a S. Typhimurium. Densidad del inóculo 10⁴ UFC ml⁻¹. □ Log₁₀ cfu ml⁻¹. ● A_{570nm}. (CMI) Concentración Mínima Inhibitoria.

Salmonella Typhimurium frente ajo

% Tratam	A 570nm	UFC
2.0	0.576	10 ⁵
2.5	0.556	10 ⁴
3.0	0.572	10 ⁴
3.5	0.575	10 ³
4.0	0.612	10 ²

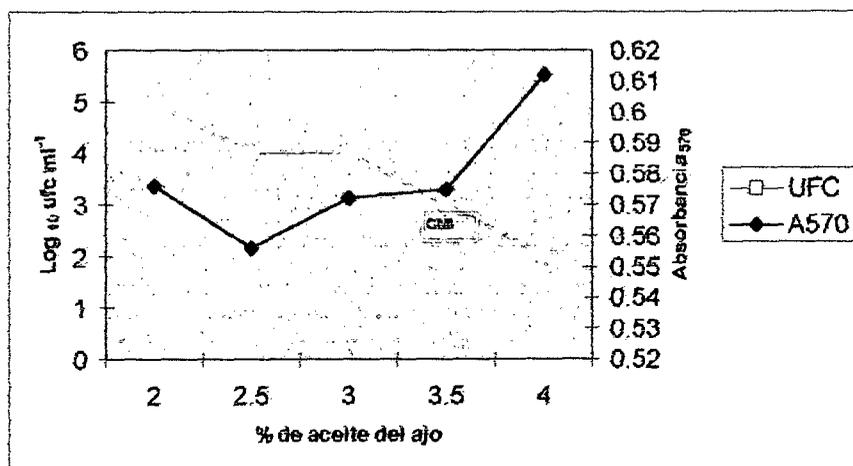


Figura 10. Comparación de los resultados obtenidos en el ensayo de microdilución y los recuento en UFC resultado de la inhibición de las concentraciones de extracto de ajo (2, 2.5, 3, 3.5, 4,%), frente a *S. Typhimurium*. Densidad del inóculo 10⁴ UFC ml⁻¹. □Log₁₀ cfu ml⁻¹. ◆A_{570nm}. (CMI) Concentración Mínima Inhibitoria.

VII.4 COMPARACIÓN DE LAS INHIBICIONES

En el cuadro comparativo se puede observar que el tratamiento mas efectivo para cada una de las cepas utilizadas. Mostrándose así que para *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium* el más efectivo es el aceite del orégano a una concentración muy baja en comparación con el aceite de ajo y zacate limón.

<i>E.coli</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
Orégano	0.1%	Orégano	0.2%
Zacate limón	2.0%	Zacate limón	3.0%
Ajo	2.5%	Ajo	3.5%

Cuadro 3. Comparación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los extractos de orégano, zacate limón y ajo frente a *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*.

VIII.- DISCUSIÓN

VIII DISCUSIÓN

Los compuestos antimicrobianos derivados de plantas son reconocidos hace cientos de años debido a su poder de inhibición frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Hammer y col., 1999).

Numerosos artículos y revistas describen las propiedades antimicrobianas, de compuestos como carvacrol y timol, (Varel y Miller, 2001), alicina (Cutter, 2000) y citral (Wuryatmo y col., 2003); estos reportes provienen de estudios realizados *in vitro* que describen sus propiedades antimicrobianas, composición y modo de acción (Janssen y col., 1987).

Los aceites de especies concentradas destruyen las células bacterianas en un tiempo de minutos a horas; siendo la tasa de muerte proporcional a la concentración (Varel y Miller, 2001). En la actualidad existen mas de 1340 plantas que producen compuestos antimicrobianos y aproximadamente 80 productos comestibles de origen vegetal contienen una alta concentración de antimicrobianos (10-100%) entre los que destacan el clavo, la cebolla, el ajo, cilantro, orégano, mostaza, vainilla y la canela (Hammer y col., 1999).

El intentar hacer un comparativo de los resultados obtenidos al hacer evaluación de extractos con actividad antimicrobiana resulta muy difícil, debido a que existen muchos factores a considerar por mencionar algunos de estos, influyen en el análisis comparativo, las plantas utilizadas, los métodos de extracción (Janssen y col., 1987), las condiciones climáticas y geografía en la que las plantas fueron cultivadas (Sivropoulou y col., 1995), el tipo de microorganismo, la solubilidad del extracto, entre otros. Estos y otros elementos hacen que los resultados en las CMI's obtenidas sea muy variables.

Los métodos más frecuentemente utilizado en la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas, son el método de difusión en

agar, utilizando discos sensibilizados (Smith-Palmer y col., 1998) y el método de dilución en caldo (Janssen y col., 1987; Rios y col., 1988), estos métodos por lo general tiene ciertas limitaciones en su uso, por lo que en la actualidad se están desarrollando nuevas metodologías que combinan estos métodos con equipos que realizan mediciones fisicoquímicas, como es el método de microdilución. La combinación del método de micro-dilución y el ensayo visual realizados en este trabajo (Mann y Markham, 1998) nos permitió obtener mejores resultados con mayor reproducibilidad, en menor tiempo y costo en comparación con los métodos convencionales (Kim y col., 1995).

Con el desarrollo de este trabajo se logró determinar la concentración mínima inhibitoria de extractos de orégano, zacate limón y ajo frente a *E. coli* y *Salmonella Typhimurium*. El extracto de orégano mostró mayor actividad para conseguir la reducción *in vitro* de las 2 bacterias requiriendo concentraciones mínimas inhibitorias de 0.1% y 0.2% respectivamente. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores realizados por Marshall y colaboradores en 1995, quienes demostraron que los extractos que poseen compuestos fenólicos como el timol y carvacrol presentan mayor actividad antimicrobiana en comparación con otros que poseen compuestos terpénicos (proporciona olor y el sabor al aceite) como el citral.

Además, los resultados obtenidos con el extracto de orégano al evaluar concentración que produjera inhibición total (0.3% para *E. coli* y 0.4% para *Salmonella Typhimurium*) mostraron ser mejores que estudios previos realizados por Marshall y colaboradores en 1995 quienes al evaluar los principios activos timol y carvacrol frente a *Salmonella Typhimurium* obtuvieron como concentración bactericida el 1.5%; así mismo Hammer y colaboradores en 1999 obtuvieron actividades bactericidas de extractos de orégano y zacate limón al 2% frente a *E. coli* y *Salmonella Typhimurium*.

Por otra parte los extractos de zacate limón y ajo dieron actividades más bajas con concentraciones mínimas inhibitorias de 2% para *E.coli* y 3% para *Salmonella* en el caso del zacate limón. El Ajo, fue el extracto que mostro la actividad antimicrobiana mas baja con CMI de 2.5% para *E. coli* y 3.5% para *Salmonella Typhimurium*.

Otro aspecto importante a destacar de los resultados es que *Salmonella Typhimurium* resulto ser más sensible a los 3 tratamientos que *E. coli*.

Cabe mencionar que el estudio realizado es solo una evaluación *in vitro* y que antes de pensar en su posible aplicación en tratamientos de descontaminación o en los alimentos para prolongar su vida útil, es necesario realizar todos los estudios de toxicidad antes de poder recomendar su uso así como continuar con las evaluaciones *in vivo*.

Es importante destacar que este tipo de estudios tendientes a buscar nuevas alternativas mediante el uso de extractos naturales tiene un futuro promisorio ya que pueden encontrar usos en industria alimenticia en la preservación de alimentos; y en tratamientos de descontaminación de frutas y hortalizas (Hammer y col., 1999); así mismo, mencionar el impacto económico que representa para los productores de nuestro país, el empleo de estas plantas, ya que su cultivo es relativamente sencillo, de fácil manejo y crecimiento.

IX.- CONCLUSIONES

IX. CONCLUSIONES

- 1.- El método de micro-dilución, en combinación con el método de reducción de colorante, desarrollados en este trabajo, permitió establecer la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de orégano, zacate limón y ajo, frente *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli*.
- 2.- La CMI para el aceite del orégano es de 0.1% para *E. coli* y 0.2% para *S. Typhimurium*, para el aceite del zacate limón la CMI fue de 2.0% para *E. coli* y 3.0% para *S. Typhimurium* y para el aceite del ajo la CMI fue de 2.5% para *E. coli* y 3.5% para *S. Typhimurium*.
- 3.- El aceite del orégano resultó ser el más efectivo para *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*, a una concentración muy baja en comparación con el aceite de zacate limón y el menos efectivo fue el aceite de ajo a unas concentraciones muy elevadas y al no lograr la inhibición total para las cepas utilizadas.
- 4.- *E. coli* resultó ser el microorganismo más susceptible a los tres aceites probados en comparación con *S. Typhimurium*.

X.- BIBLIOGRAFÍA

X BIBLIOGRAFÍA

Adams, M. R. and Moss, M. O. (1995). Microbiología de Los alimentos. Ed. Acribia. 175-181, 241-251.

Adler, B. B. and Beuchat, L. R. (2002). Death of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in garlic butter as affected by storage temperature. *Journal of Food Protection*. 65:1976-1980.

Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Chinou, I., Mitakou, S., Gikas, E. and Tsarbopoulos, A. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of sideritis from greece. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 49(2):811-815.

Amaya, O. M., Cruz, G. M. and Polanco, F. J. (1983). Características importantes del zacate limón. *CENTA*. 52(2): 31-33.

Baker, C. N., Stocker, S. A., Culver, D. H. and Thornberry, C. (1991). Comparison of E-Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 29:533-538.

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. and Turck, M. (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Journal of Clinical Pathology*. 45:493-496.

Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Florou-Paneri, P., Christaki, E. and Spais, A. B. (2003). Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation. *Food Research International*. 36:207-213.

Brenner, D. J. (1984). Facultatively anaerobic gram-negative rods', Krieg, N. R. and Holt, J.C. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (vol.1) Baltimore: Williams and Wilkins. 408-516.

Brener, F. W., Villar, R. G., Angulo, R. T. and Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(7): 2465-2467.

Brooks, M. A. (1969). General relationships between microorganisms and insects. Proc. Symp. Bio. Contam. Grain Anim. Byprod. 17-20. Agric. Ext. Serv., Dep. Entomolo. Fish. Wildl. Univ. Minnesota, Minneapolis.

Chan, C. and Loudon, K. (1998). Activity of tea oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*. 39(3):244-245.

Conner, D. E., Beuchat, L. R., Worthington, R. E. and Hitchcock, H. L. (1984). Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 1:63-74.

Cutter, N. C. (2000). Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium associated with beef. *Journal of Food Protection*. 63:601-607.

Drasar, B. S. and Hill, M. J. (1974). Human intestinal flora. Academic Press, London, UK.

Ekperigin, H. E. and Nagaraja, K. V. (1998). Microbial food borne pathogens. *Salmonella* K. *Vet. Clin. N. Am. Food Anm. Pract.* 14: 17-29.

Ewing, W. H. (1985). Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th. Edition. Elsevier.

- Fernández, E. E. (2000). Microbiología e inocuidad de los alimentos. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. 7, 10, 746, 789.
- Ferreraz, R. (1996). Medicina Interna. Mosby/Doyma libros. 13° edición. México. 2289-2295.
- Freeman, B. (1989). Microbiología de Burrows. Interamericana/McGraw-Hill. 22° edición. México. 526-532.
- Gara, E. A., Hill, D. J. and Maslin, D. J. (2000). Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. Applied and Environmental Microbiology. 66:2269-2273.
- García del Portillo, F. (2000). Molecular and cellular biology of *Salmonella* pathogenesis: 3-49. In: Microbial Foodborne Diseases. Cary, J.W., Linz J.E. and Bhatnagar, D. (Eds.) Technomic Pub. Co. Pensylvania, USA.
- Gibson, D. M., Coobs, P. and Pimbley, D. W. (1992). Automated conductance method for the detection of *Salmonella* in foods; collaborative study. Journal of the AOAC International. 75:293-302.
- Guerin, T. F., Mondido, M., Clenn, B. M. and Peasley, B. (2001). Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. Applied and Environmental Microbiology. 32:340-345.
- Hakki, M. A., Mavi, A., Yildirim, A., Digrak, M. and Hirata, T. (2003). Screening chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *origanum syriacum* l. Growing in Turkey. Biological Pharmaceutical Bulletin. 26(12) 1725-1729.

Hammer, K. A., Carson, C. F. and Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other extracts plant. *Journal of Applied Microbiology*. 86: 985-990.

International Commission of Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1980). *Ecología Microbiana de los Alimentos. Vol 2 productos alimenticios*. Ed Acribia. Zaragoza, España. 696-697.

International Commission of Microbiological Specifications for Foods (CMSF). (1996). *Microorganismos de os Alimentos. Características de los patógenos microbianos*. Acribia, Zaragoza, España. 263.

James, M. J. (1992). *Microbiología moderna de los alimentos. Tercera edición*. Ed. Acribia, 20-23, 28, 115-127, 145-176.

Janssen, A. M., Scheffer, J. J. and Baerheim, S. A. (1987). Antibacterial activity of essential oils. *Planta Medica*. 53(3): 395-398.

Jones, F. A. (1996). Herbs-useful plants. Ther role in history and today. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 8:1227-1231.

Kalembe, D. and Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10(10):813-829.

Kim, J. M., Marshall, M. R., Cornell, J. A., Preston, J. F. and Wel, C. I. (1995). Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*. 60:1364-1368.

Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J. and Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91:453-462.

- Lawless, J. (1995). The illustrated enciclopedia of essential oils. Element Book. 63-67.
- Le Minor, L. and Popoff, M. (1987). Designation of *Salmonella* Enteritica sp. Nov., Nom. Rev., as the type and species of the genus *Salmonella*. International Journal Systems Bacteriology. 37:465-468.
- Mann, C. M. and Markham, J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. Journal of Applied Microbiology. 84:538-544.
- Marjorie, M. C. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 12 (4):564-582.
- Merino, A. M. (1994). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Sexta Edición. 79-97.
- Naganawa, R., Iwata, N., Isikhawa, K., Fukuda, H., Fujino, T. and Suzuki, A. (1996). Inhibition of microbial growth a sulfur-containing compound derived from garlic. Applied and Environmental Microbiology. 62:4238-4242.
- Nataro, J. P. and Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Review. 11: 142-201.
- Neidhardt, F. C. (1999). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2nd edition. ASM Press, Washington. 672-678.
- NOM-114-SSAI-1994. Norma Oficial Mexicana, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

Raman, A. Weir, U. and Bloomfield, S. (1995). Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. Letters in Applied Microbiology. 21(4):242-245.

Rios, J. L., Recio, M. C. and Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. Journal of Ethnopharmacology. 23:127-149.

Ross, Z. M., Gara, E. A., Hill, D. J., Sleightholme, H. V. and Maslin, D. J. (2001). Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic sulfides and garlic powder. Applied and Environmental Microbiology. 67: 475-480.

Rosser, S. J., Alfa, M. J., Hoban, S., Kennedy, J. and Harding, G. K. (1999). E-test versus agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of viridans *Streptococci*. Journal of Clinical Microbiology. 37:26-30.

Sanchez-Escalante, A., Torrescano, G., Djenane, D., Beltrán, J. A. and Roncales, P. (2003). Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation. Food Research International. 36: 207-213.

Seymour, R. (2003). Additional properties and uses of essential oils. Journal of Clinical Periodontology. 5:19-21.

Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. (1995). Antimicrobial Activity of mint essential oils. Journal of Agriculture Food Chemistry. 43, 2384-2388.

Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 44, 1202-1205.

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

Southwell, I. A., Hayes, A. J., Markham, J. and Leach, D. N. (1993). The search for optimally bioactive Australian tea tree oil. *Acta Horticulturae* 334, 256-265.

Tassau, C. C., Drosinos, E. H. and Nychas. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha Piperita*) on *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 degrees. *Journal Applied Bacteriology*. 78 (6): 593-600.

Tauxe, R. T. (1991) *Salmonella* pathogen. *Journal of Food Protection*. 54:663-568.

Tsao, S. M. and Yin, M. (2001). *In vitro* antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and chinese leek oils. *Journal of Medicine Microbiology*. 50: 646-649.

Ultee, A., Kets, E. P. and Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 28:317-326.

Varel, V and Millerapplied, D. (2001). Plant-derived oils reduce pathogens and gaseous. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1366-1370

Vassiliadis, P. (1983). The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: an overview. *Journal of Applied Bacteriology*. 54:69-76.

Wilkins, E. and Baltimore, M. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Ed. Lippincott Williams. 186-187.

Wuryatmo, E., Klieber, A. and Scott, E. (2003). Inhibition of citrus postharvest pathogens by vapor of citral and related compounds in culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2637-2640

www.members.tripod.com/fotografia/textos/antibioticos.htm, 2002

www.nutriservice.cl/pdf/ALICINA.pdf

www.plantasmedicinales.org/farmacognosia/sep2002/aceites_esenciales.htm