



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Capsicum
annuum* COMO ANTIMICROBIANOS NATURALES
MEDIANTE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA**

TESIS

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS

PARA OBTENER EL GRADOS DE :

DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

ARTURO MIGUEL RAMÍREZ TORRES.

DIRECTORES DE TESIS: **DRA. LIDIA DORANTES ALVAREZ**

DR. GERARDO APARICIO OZORES



MÉXICO, DF.

2010

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica en Alimentos y en el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Lidia Dorantes Alvarez y del Dr. Gerardo Aparicio Ozores, con el apoyo de los proyectos 20070575, 20080904, 20090520, 20100575, financiados por el IPN. También se recibió apoyo del proyecto PICS8-15, financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del D.F. Este trabajo de investigación fue realizado con una beca otorgada por el CONACYT en el período 2006-2010.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	III
INDICE DE CUADROS	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Tecnología de Barreras Múltiples	4
1.2 Selección de los Antimicrobianos	5
1.3 Componentes fenólicos	7
1.4 El genero <i>Capsicum</i>	8
1.5 Factores que influyen en la extracción de ingredientes activos (constante dieléctrica y fuerza iónica)	9
1.6 Microbiología predictiva	11
1.7 Análisis estadístico	12
2 JUSTIFICACIÓN	14
3 OBJETIVOS	15
4 MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 Preparación de las sales del ácido cinámico, ferúlico, cumárico y caféico	16
4.2 Bacteria y Condiciones de cultivo	16
4.3 Efecto de la sales del ácido cinámico e hidroxicinámico, ácido ferúlico y p-cumárico en curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> O157, <i>Salmonella</i> Typhi, <i>Salmonella</i> Choleraesuis, <i>Salmonella</i> Gallinarum, <i>Bacillus cereus</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	16
4.4 Estimación de los parámetros de las curvas obtenidas	17
4.5 Aplicación de las ecuaciones de Gompertz y Gompertz modificado para describir la inhibición observada	18
4.6 Análisis estadístico de los resultados (comparación del comportamiento entre bacterias y sales)	19

4.7 Análisis de la ultraestructura de bacterias sometidas a tratamiento con diferentes fenilpropanoides por microscopía electrónica de transmisión (TEM	20
4.8 Metodología para la obtención de los extractos con disolventes	21
4.9 Pruebas de supervivencia de bacterias en medio de cultivo TSB adicionando extracto de chile	21
4.10 Pruebas de supervivencia de <i>E.coli</i> O157 y <i>S. Gallinarum</i>	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	22
5.1 Efecto de la formación de las sales y el pH del medio en la solubilidad de los compuestos en los grupos ionizables de los ácidos cinámico e hidroxycinámicos	22
5.2 Comparación de la actividad antibacterial de las sales sódicas de cinamato, ferulato, cumarato y cafeato en <i>E.coli</i> O157, <i>S. Gallinarum</i>, <i>S. Typhi</i>, <i>S. Choleraesuis</i>, <i>S. aureus</i> y <i>B. cereus</i>	24
5.3 Efecto del cafeato de sodio	24
5.4 Efecto del ferulato de sodio	33
5.5 Efecto del cumarato de sodio	41
5.6 Efecto del cinamato de sodio	49
5.7 Efecto del ácido ferúlico y cumárico	58
5.8 Evaluación de los daños y cambios morfológicos en la ultraestructura de las bacterias <i>E. coli</i> O157, <i>Salmonella</i> Gallinarum y <i>S. aureus</i>	68
5.9 Efecto de la constante dieléctrica en la obtención de los extractos de chile	77
5.10 Efecto de la fuerza iónica en la obtención de los extractos de chile	78
5.11 Efecto de la concentración sobre el crecimiento/supervivencia de <i>E. coli</i> O157 y <i>S. Gallinarum</i> en jugo de carne	79
6 CONCLUSIONES	81
7 BIBLIOGRAFÍA	83

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura de algunos compuestos con actividad antimicrobiana	6
Fig. 2. Curva de crecimiento microbiana	18
Fig. 3. Curva de inactivación microbiana con los parámetros biológicos.	18
Fig. 4. Cinética de supervivencia de 6 bacterias patógenas expuestas a diferentes concentraciones de cafeato de sodio	25
Fig. 5. Gráfica de los modelos ajustados contra los datos experimentales del cafeato de sodio al 1%	32
Fig. 6. Cinética de supervivencia de 6 bacterias patógenas expuestas a diferentes concentraciones de ferulato de sodio	33
Fig. 7. Gráfica de los modelos ajustados contra los datos experimentales del ferulato de sodio al 1%.	40
Fig. 8 Cinética de supervivencia de 6 bacterias patógenas expuestas a diferentes concentraciones cumarato de sodio	41
Fig. 9. Gráfica que representa el modelo matemático contra los datos experimentales del cumarato de sodio al 1%	48
Fig. 10. Cinética de supervivencia de 6 bacterias patógenas expuestas a diferentes concentraciones de cinamato de sodio	49
Fig. 11. Gráficas que representan los modelos matemáticos contra los datos experimentales de cinamato de sodio al 1%	57
Fig. 12. Cinética de supervivencia de 4 bacterias patógenas expuestas a diferentes concentraciones de ácido ferúlico y cumárico	58
Fig. 13. Gráficas de los modelos matemáticos contra los datos experimentales de los ácidos hidroxicinámicos al 1%.	67
Fig. 14. Micrografía electrónica de transmisión de <i>E. coli</i> O157 creciendo en presencia de cumarato al 0.6% en caldo soya	68
Fig. 15. Micrografía electrónica de transmisión de <i>E. coli</i> O157 en presencia de cumarato al 1% en caldo soya	69
Fig. 16. Micrografías electrónicas de transmisión de <i>S. Gallinarum</i> crecida en TSA con ferulato a una concentración de 0.2%	70

Fig. 17. Micrografía electrónica de transmisión de <i>S. Gallinarum</i> crecida en TSA con ferulato a una concentración de 0.6%	71
Fig. 18. Micrografía electrónica de transmisión de <i>S. Gallinarum</i> crecidas en TSA con ferulato a una concentración de 1%	72
Fig. 19. Micrografía de <i>S. aureus</i> con cafeato a una concentración de 0.8%	73
Fig. 20 Micrografía de <i>S. aureus</i> con ferulato a una concentración de 0.8%.	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Hierbas, plantas y especias con su respectivo componente antimicrobiano.	7
Cuadro 2. Constante dieléctrica de algunas sustancias	10
Cuadro 3. Solubilidad de los ácidos ferúlico,caféico, cumárico y cinámico en agua	22
Cuadro 4. Máximas solubilidades obtenidas en las sales sódicas	22
Cuadro 5. Por ciento de disociación de los ácidos cinámico, ferúlico, p-cumárico y caféico a pH 7	23
Cuadro 6. Parámetros biológicos del cafeato de sodio	30
Cuadro 7. Ecuaciones de los modelos matemáticos a la concentración de 1% de cafeato de sodio	31
Cuadro 8. Parámetros biológicos de ferulato de sodio	38
Cuadro 9. Ecuaciones de los modelos matemáticos a la concentración de 1% de ferulato de sodio	39
Cuadro 10. Parámetros biológicos del cumarato de sodio	46
Cuadro 11 Ecuaciones de los modelos matemáticos a la concentración de 1% de cumarato de sodio.	47
Cuadro 12. Parámetros biológicos de cinamato de sodio	55
Cuadro 13. Ecuaciones de los modelos matemáticos a la concentración de 1% de cinamato de sodio	56
Cuadro 14 Parámetros biológicos de los ácidos hidroxicinámicos (A)	64
Cuadro 15. Parámetros biológicos de los ácidos hidroxicinámicos (B)	65
Cuadro 16. Ecuaciones de los modelos matemáticos a la concentración de 1% de los ácidos hidroxicinámicos.	66
Cuadro 17. Pruebas de reto microbiano con extracto de chile serrano	77
Cuadro 18. Pruebas de reto microbiano con chile guajillo utilizando como agente extractor agua	77
Cuadro 19. Resultados microbiológicos de extracto de chile guajillo obtenidos con diferentes didisolventes utilizando S. Typhi	78
Cuadro 20- Resultados microbiológicos de extracto de chile guajillo utilizando diferentes concentraciones de cloruro de sodio	78
Cuadro 21. Resultados microbiológicos de los testigos a diferentes concentraciones de cloruro de sodio utilizando S. Typhi	79

Cuadro 22. Resultados microbiológicos utilizando jugo de carne como alimento usando sales sódicas con <i>E. coli</i> O157	79
Cuadro 23 Resultados microbiológicos utilizando jugo de carne como alimento real usando sales sódicas con <i>S. Gallinarum</i>	80

RESUMEN

La inocuidad alimentaría tiene una gran importancia en el mundo, debido a los incidentes globales que están asociados a las enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con patógenos. Por esta razón, la investigación en antimicrobianos naturales tiene una gran relevancia debido a la aportación de nuevas alternativas para eliminar la presencia de bacterias dañinas para la salud. Las plantas son una importante fuente de compuestos con actividad antibacteriana, entre ellos cabe resaltar a *Capsicum annuum*, de la cual se han aislado los ácidos cinámico, ferúlico, p-cumárico y caféico con actividad antimicrobiana demostrada. El objetivo de este estudio fue evaluar por pruebas microbiológicas, morfológicas y microbiología predictiva la actividad antimicrobiana de compuestos presentes en extractos de *C. annuum*. Los cuatro ácidos analizados en este estudio presentan una baja solubilidad en agua. Por esto último, se decidió formar la sal sódica de estos compuestos y probar para cada uno cinco concentraciones con el fin de observar si mantenían sus propiedades antibacterianas contra los patógenos: *Escherichia coli* O157:H7, tres serovariedades de *Salmonella*, y dos bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Al término de las cinéticas se determinó una actividad correspondiente entre las formas de sal sódica y de ácido, y que mantuvieron la siguiente función antibacteriana: cafeato de sodio > cumarato de sodio > ferulato de sodio > cinamato de sodio. El cafeato de sodio, inclusive, logró eliminar las esporas de *B. cereus*. Estos resultados se corroboraron por medio de micrografías electrónicas, las cuales mostraron en la actividad bactericida un daño en la pared celular que provocó que el contenido de la misma saliera, produciendo la muerte de la bacteria; mientras que las concentraciones que tenían una actividad bacteriostática mostraron un alargamiento notorio de las células, pero sin pérdida de viabilidad. Se realizaron pruebas de las sales sódicas adicionadas a un alimento (jugo de carne), y retando con dos bacterias patógenas, logrando su inhibición, lo que significa que las sales pueden tener una utilización práctica en alimentos. Finalmente se utilizaron la ecuación de Gompertz y Gompertz modificado y las curvas experimentales se ajustaron a ambos modelos. Se concluye que este estudio refuerza la actividad antimicrobiana de las sales y ácidos fenólicos, lo que abre la posibilidad de usarlos en la preservación de los alimentos.

ABSTRACT

Food safety is of great importance in the world due to global events that are associated with diseases transmitted by food contaminated with pathogens. For this reason, research on natural antimicrobials is of great importance due to the contribution of new alternatives to eliminate the presence of bacteria harmful to health. Plants are an important source of compounds with antibacterial activity, including *Capsicum annuum*. Some authors have isolated cinnamic acids, ferulic, p-coumaric and caffeic with proven antimicrobial activity. The aim of this study was to evaluate the kinetics of survival of six bacteria, in the presence of compounds present in extracts of *C. annuum*. The four acids analyzed in this study have a low solubility in water, so it was decided to form the sodium salts of these compounds, which increased notably the solubility. Five concentrations of each compound were tested against *Escherichia coli* O157: H7, three *Salmonella* serovars, and two Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The kinetics of inactivation showed in decreasing order the antibacterial efficiency : sodium caffeate > coumarate sodium > sodium ferulate > sodium cinnamate. The sodium caffeate eliminated the spores of *B. cereus*. These results were corroborated by electron micrographs, which showed bactericidal activity. Damage of the cell wall and membrane was observed causing the death of the bacteria; while the concentrations that produced a bacteriostatic activity showed a remarkable elongation of the cells, but without loss of viability. A challenge test were conducted adding the sodium salts to a beef soup and challenging with two pathogenic bacteria. Death of both bacteria was obtained when sodium coumarate was present, while ferulate caused death of *S. Gallinarum*, which means that the salts can be of practical use in food. Finally we used the Gompertz equations to obtain equations that described the inhibition phenomena. We conclude that this study reinforces the knowledge of the antimicrobial activity of phenolic acids and their salts, which opens the possibility for their use in food preservation.

1 INTRODUCCIÓN

Los incidentes globales provocados por enfermedades causadas por alimentos son difíciles de estimar, pero en el 2000 han sido reportados alrededor de 2.1 millones de muertes en el mundo producidas por enfermedades diarreicas, una gran proporción de estos casos han sido atribuidos a alimentos y aguas contaminadas, adicionalmente, la diarrea es la principal causa de malnutrición en niños y adolescentes. En países industrializados, el porcentaje de personas que sufre enfermedades producidas por alimentos por ejemplo los Estados Unidos es del 30%, alrededor de 76 millones de casos resultaron en 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes se estima que ocurren cada año. (FAO, 2002).

Las enfermedades producidas por alimentos que son esporádicas, frecuentemente no son reportadas, pero las epidemias producidas por alimentos, pueden tomar proporciones masivas, por ejemplo en 1994 una epidemia de salmonelosis que se encontraba en helados ocurrida en EU afectó aproximadamente a 224,000 personas, en 1988 una epidemia de hepatitis A, resultado del consumo de almejas contaminadas afectó a 330,000 individuos en China. (FAO, 2002).

De acuerdo al Boletín Epidemiológico Nacional. En el año 2008 y 2007 se reportaron 43,000 casos de fiebre tifoidea en el país y en el 2006 se presentaron 36,000 lo cual significa que los casos aumentaron y se estabilizó la cifra, esta enfermedad sigue teniendo importancia en nuestro país por la cantidad de casos que se presentan y la tendencia a la alza que ha tenido en años recientes. La fiebre tifoidea producida por *S. Typhi* es una enfermedad exclusiva del hombre, el no ser posible reproducirla en ninguna otra especie animal, hace difíciles los estudios experimentales sobre su patogenia. FDA (2007).

Las bacterias entericas comprenden un grupo relativamente homogéneo que se caracteriza fenotípicamente por lo siguiente: Gram. negativos, bacilos no esporulados, no móviles o si lo son es por flagelos de inserción peritrica, anaerobios facultativos, oxidasa negativa, con requerimientos nutricionales relativamente simples y fermentan azúcares con diversos productos finales.

Entre las bacterias entericas se encuentran especies patógenas para el hombre, animales y plantas también hay otras muy importantes desde el punto de vista industrial. (Madigan,2004).

La *Salmonella* puede prosperar en muchos alimentos porque necesitan de muy pocos requerimientos nutricionales y tiene la habilidad de crecer bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas además de que pueden existir en diversos rangos de pH y temperatura, son sensibles al calor, sin embargo algunas serovariedades aisladas en huevo y carne exhiben cierta resistencia al calor, la refrigeración tampoco logra eliminarlas, algunas cepas pueden crecer a temperaturas bajas-moderadas sobre los 4°C. (Miller,1993).

Aunque se sabe el rol que tienen tanto el agua como los alimentos contaminados en las epidemias atribuidas a *Escherichia coli* O157. Solo en años recientes la industria de los alimentos a puesto nuevamente atención en *E. coli* O157 por la alta morbilidad y mortalidad que a tenido en epidemias producidos por alimentos, este patógeno produce verotixinas. (Bell,2002).

Una amplia variedad de alimentos ha sido implicados en epidemias causadas por *E. coli* O157 en alimentos, entre los alimentos implicados en estas epidemias son: derivados lácteos como quesos franceses, Camembert, quesos hechos con leches sin pasteurizar: productos cárnicos como hamburguesa, carnes no asadas, salmón enlatado (Bell,2002). Los alimentos con bajos pH, también han sido implicados en epidemias tales como el yogurt, jugo de manzana sin pasteurizar. Reinders et al (2001) en estudios hechos para observar la inhibición que produce el ácido caféico en jugo de manzana ha realizado una hipótesis en la cual explica el porque de las epidemias asociadas con jugos de manzana y sidra sin pasteurizar han ocurrido en octubre y noviembre es por que el ácido caféico en esas fechas decae de 1.3 mg/Kg a 0.1 mg/Kg en las manzanas. Es de suponer que un deficiente tratamiento térmico una falla en las buenas prácticas de manufactura en la producción de alimentos son la causa principal de las epidemias. Sin embargo la presencia de algunos compuestos antimicrobianos pueden constituir una barrera adicional para evitar la supervivencia de *E. coli* O157.

Existen algunas bacterias patógenas que producen grandes pérdidas económicas al sector alimenticio por la alta mortalidad que tienen en algunas especies domesticadas, tal es el caso de *Salmonella Gallinarum* la cual produce tifoidea en las aves acompañada por una alta mortalidad en aves de corral de todas las edades además de que se han encontrado en pasados ocasiones dentro de la cadena de alimentos y causado enfermedades en los humanos (Barrow,1994). Las aves progenitoras y reproductoras juegan un papel muy importante en la erradicación de la enfermedad principalmente afecta a gallinas domésticas y pavos, aunque también puede llegar a afectar a patos, faisanes, pavo reales, gallina de Guinea y aves silvestres.(SSA.2008).

Otro microorganismo de importancia de veterinaria e industrial es *Salmonella Choleraesuis* que ataca principalmente a los cerdos, en nuestro país en el año de 2007 aún se mantenían siete estados en fase de erradicación ya que se habían presentado brotes, estos estados son: Chiapas, Distrito federal, Estado de México, Guerrero, Morelos, Oaxaca y Tabasco (Sagarpa,2008).

También existen microorganismos Gram positivos que producen enfermedades transmitidas por alimentos entre ellos se encuentra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* que a continuación se presentan sus características principales:

Bacillus cereus es un microorganismo gran positivo aeróbico facultativo esporiforme que causa enfermedad al consumir alimentos con está bacteria. Los alimentos que presentan mayor susceptibilidad son: la carne, vegetales, pescado, salsa, pudín y sopas, resiste concentraciones de NaCl menores al 5% y su intervalo de tolerancia de pH es de 6.1 a 7.5. (FDA, 2007).

Staphylococcus aureus es una bacteria esférica es un organismo gran positivo, capaz de producir toxinas que tienen una alta resistencia al calor y que causan enfermedades a los seres humanos. Los alimentos que están involucrados son productos avícolas, huevos, atún, papas, productos de panadería que utiliza crema pastelera, chocolates, sándwich, no es una bacteria termodurica, mantiene una supervivencia a la temperatura de refrigeración y es osmotolerante. (FDA,2007).

1.1 Tecnología de Barreras Múltiples

La seguridad microbiana y la estabilidad además de la calidad sensorial y nutricional es la base de la aplicación de factores de conservación combinados (llamados barreras). Esto es verdad en la elaboración de alimentos tradicionales con barreras empíricas inherentes pero también aplica para los nuevos productos (Leistner, 1995a).

Las más importantes barreras utilizadas en la preservación de alimentos son: temperatura (alta o baja), actividad de agua, acidez, potencial redox, conservadores y competitividad entre microorganismos. Sin embargo existen más de 60 potenciales barreras en los alimentos las cuales involucra la estabilidad y/o la calidad del producto (Leinster, 1999a).

Algunas barreras podrían tener influencia en la seguridad y en la calidad de los alimentos porque tienen propiedades antimicrobianas y al mismo tiempo le dan sabor al producto. También las barreras podrían tener efectos positivos o negativos en los alimentos dependiendo de su intensidad, por ejemplo es el pH en salsas fermentadas el cual debido a la acidez debería de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas pero esta acidez afecta el sabor. Por esta razón la tecnología de barreras debe de conservarse en un intervalo óptimo en el que se debe considerar la calidad y la seguridad (Leistner, 1994a).

Para poder comprender el efecto de barrera se define como: El conjunto de barreras combinadas deliberadamente las cuales proveen estabilidad microbiana y calidad sensorial en el alimento además de tener propiedades nutricionales. Esta tecnología de barreras ayuda a proveer una calidad total en el alimento y su aplicación es muy extendida (Leistner and Gorris, 1994).

En los países industrializados la tecnología de barreras se aplica principalmente en los alimentos minimamente procesados en los cuales se aplica un calor muy suave o en productos fermentados. En los países en vías de desarrollo la aplicación de la tecnología de barreras para los alimentos produce, estabilidad, seguridad, se conserva el sabor y el almacenamiento en refrigeración es de vital importancia especialmente en América latina con el desarrollo de los alimentos minimamente procesados por la alta humedad de

las frutas. Sin embargo es de bastante interés que la tecnología de barreras esta emergiendo para los productos cárnicos en china (Leistner,2000).

La preservación del alimento implica que el microorganismo se encuentre en un ambiente hostil y así inhibir su crecimiento o disminuir su supervivencia o causarle la muerte. La posible respuesta del microorganismo a este ambiente hostil, determinara si sobrevive o muere. Para este es necesaria más investigación, sin embargo recientes avances se han hecho para considerar la homeostasis, estrés metabólico, y la reacción de estrés de los microorganismos en relación con la tecnología de barreras, además de incluir un nuevo concepto de conservación por multiobjetivos para tener una conservación efectiva (Leistner, 1995a).

Las principales tecnologías en la preservación de alimentos pueden ser clasificadas en aquellas donde el objetivo principal es la prevención o la reducción del crecimiento microbiano (temperaturas bajas, reducción de actividad de agua , atmósferas modificadas, adición de antimicrobianos), otras, son aquellas que son inactivadoras de microorganismos (pasteurización, esterilización, microondas, radiación ionizante, alta presión hidrostática) también las hay para minimizar o prevenir la entrada de microorganismos a los alimentos (manipulación aséptica del material de empaque).Gould (1995).Sofos (1998).

Todos estos factores y técnicas pueden inhibir o inactivar a los microorganismos. Una de las herramientas que se utilizan para prevenir las enfermedades producidas por alimentos contaminados son las sustancias antimicrobianas, por tal motivo el presente trabajo está encaminado al uso de antimicrobianos naturales de los chiles.

1.2 Selección de los Antimicrobianos

No es fácil seleccionar el antimicrobiano apropiado para un producto en particular. El patógeno o microorganismo deteriorador debe ser identificado en primer lugar y que el posible sistema de conservación debe ser evaluado por modelos, generalmente la combinación de estos conservadores químicos y otros métodos de preservación son necesarios para la inocuidad del alimento

(Leistner, 2000). La selección del antimicrobiano depende de diferentes factores primarios entre los cuales se incluyen: El espectro antimicrobiano, las propiedades químicas del antimicrobiano, las propiedades fisicoquímicas y la composición del alimento, además del tipo de preservación o proceso y almacenamiento del sistema usado. (Davidson, 2005).

Plantas y hierbas se han extraído aceites esenciales y de estos se han aislado compuestos que contienen una larga número de sustancias que son consideradas como inhibidores de la actividad metabólica de varias microorganismos como bacterias, levaduras y que muchas de estas sustancias han sido explotadas completamente Wilkins (1989) han reportado más de 1340 plantas que son conocidas que tienen un potencial de componentes antimicrobianos naturales A continuación se muestran algunas estructuras:

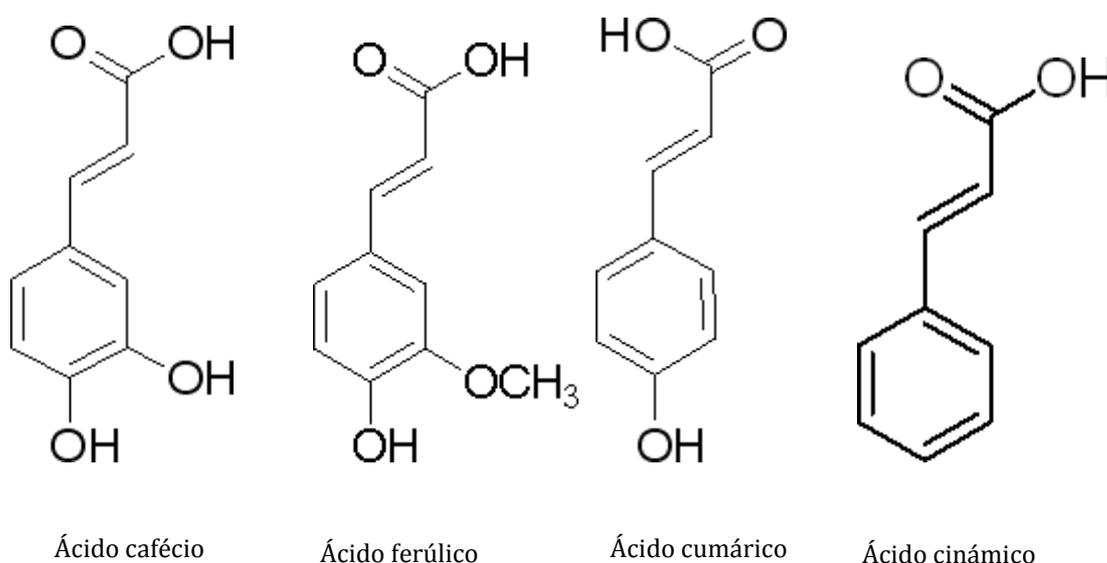


Figura 1. Estructuras de algunos compuestos que tienen actividad antimicrobiana.

Los componentes antimicrobianos en plantas contienen fracciones de aceites esenciales de estos, en diferentes partes como son las hojas (romero, salvia), de flores y de botones de las flores(clavo), bulbos (Ajo, cebolla) y frutas (pimienta) en el siguiente cuadro se muestran una lista de plantas, especias y hierbas que son reportados que contienen productos antimicrobianos. (Conner,1993).

Cuadro 1. Hierbas, plantas y especias con su respectivo componente antimicrobiano.

Planta, hierba o Especia	Componentes	Cita bibliografica
Ajo	Disulfitos	Grahan,1987
Canela	Aldehído cinámico	Sebti et al,1994
Vainilla	Vainillina	Cerruti,1996
Orégano	Timol, Carvacrol	Paster et al ,1990
Chiles	Fenilpropanoides	Dorantes te al 2000
Clavo	Eugenol	Cerruti,1996

Estos componentes pueden ser letales para las células microbianas o simplemente pueden inhibir la producción de sus metabolitos (Beuchant,1994).

Los principales componentes con actividad antimicrobiana en plantas, hierbas y especias son los compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides, estos componentes han sido reportados con actividad antimicrobianos de los aceites esenciales depende de la estructura química de los componentes y su concentración, Shelef (1983) menciona que los compuestos derivados del fenol simples y complejos son los principales agentes antimicrobianos en los aceites esenciales de las especias. Katayama y Nagai (1960) reconocen al eugenol, carvacrol, timol y vainillina como componentes con actividad antimicrobiana en aceites esenciales de plantas.

1.3 Componentes fenólicos

Los componentes fenólicos han sido utilizados como agentes antimicrobianos desde 1867 como sanitizantes (Dadvison,2005). Algunos de estos derivados de fenoles se encuentran en forma natural (polifenólicos, fenoles), Parabenos (metil, propil y etil ester y el ácido p-hidroxibenzoico) y en muchos países son

permitidos el uso directo como antimicrobianos para alimentos. Antioxidantes fenólicos, butirato hidroxitolueno (BHT), butirato hidroxianisol (BHA) son aprovechados como antioxidantes en alimentos y evita la rancidez en grasas, aceites y alimentos lipídicos(Shahidi,1995). Todos estos componentes han sido identificados por su actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos, virus y protozoarios.

1.4 El genero *Capsicum*

Una de las plantas de gran importancia dentro de la cocina mexicana son los chiles, que pertenecen a la familia *Solanaceae*, genero *Capsicum* con dos variedades *C. annuum* y *C. frutescens* y diversas variedades (*C. annuum conides*),

C. annuum acuminat, *C. annuum longum*, *C. annuum grossum*, *C. annuum cabbreviatum*, *C. annuum ceraciforme*); siendo estas las primeras plantas cultivadas en México aún anteriores al maíz. Junto con éste y los frijoles forman parte de la alimentación campesina y popular tradicional (De´Angeli,1994)

De un modo muy general puede decirse que se trata de plantas en su mayoría anuales o semiherbáceas, de hojas alternas y flores pequeñas, blancas, verdosas o violáceas; el fruto es una baya por lo común alargada, cuya pulpa tiene un sabor más o menos picante. Los chiles no solamente rebosan historia asociada a la comida, sino que de acuerdo a lo reportado por Cichewicz(1996), diversos estudios de la farmacopea botánica de los habitantes de Mesoamérica señalan que los chiles se han incorporado a lo largo de la historia de este pueblo a diversas preparaciones medicinales que se aplicaban a una gran variedad de afecciones que incluían problemas respiratorios, dolores de oído, garganta, entre otros.

Adicionalmente, se ha observado actividad antimicrobiana de extractos de esta planta contra diversos microorganismos de importancia en alimentos. A este respecto, Dorantes y col (2000). Empleando el método de difusión de agar, comprobaron el efecto que los extractos de chile (*C. annuum*) habanero, serrano y pimiento morrón ejercieron sobre *Listeria monocytogenes*,

Staphylococcus aureus, *Salmonella* Typhimurium y *Bacillus cereus*; encontrando que dichos extracto inhibían el desarrollo de los cuatro microorganismos y que de estos *L. monocytogenes* fue la más sensible, mientras que *S. Typhimurium* fue la más resistente.

Por otro lado la actividad de los compuestos fenólicos han sido probados en varias bacterias, reconociendo que los microorganismos Gram positivos son generalmente más sensibles a estos compuestos. Los compuestos derivados de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámicos están presentes en forma predominante en alimentos y plantas en forma natural. Los ácidos cinámicos e hidroxicinámicos son los compuestos intermediarios en la síntesis de los fenilpropanoides, comenzando con la fenilalanina que se convierte en ácido cinámico, p-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico, En el caso del ácido caféico es el ácido hidroxicinámico predominante en muchas frutas. Este compuesto constituye el 75% del total de los ácidos hidroxicinámico que se encuentra en ciruelas, manzanas, chabacanos, zarzamoras, y jitomates. Sin embargo el ácido p-cumárico es el ácido hidroxicinámico dominante en frutas cítricas como la piña (Shahidi and Naczk,1995).

El ácido cinámico e hidroxicinámico son también los compuestos intermediarios en la síntesis de la capsaicina que se encuentra en diferentes variedades de chile (Acero et al ,2005). La actividad antibacteriana de estos compuestos son las bacterias Gram positivas como el caso de *Listeria monocytogenes*. Una de las limitaciones en el uso de estos compuestos es la baja solubilidad que tiene en sistemas acuosos.

1.5 Factores que influyen en la extracción de ingredientes activos (constante dieléctrica y fuerza iónica)

Muchas de las moléculas que se encuentran en las células, entre ellas las macromoléculas como el DNA y las proteínas tienen una carga eléctrica neta. Además de estas moléculas, la célula contiene abundantes iones pequeños, tanto cationes como Na^+ , K^+ y Mg^{2+} , como aniones como Cl^- , HOPO_3^{2-} . Todas estas entidades con carga ejercen fuerza sobre las demás. En una célula siempre están separadas por agua o por otras moléculas. La existencia de este

medio dieléctrico entre las cargas tiene el efecto de obstruir de las otras, este efecto se expresa añadiendo a la ecuación de la ley de Coulomb un número sin dimensión: la constante dieléctrica. (Van Holden,2002)

Toda sustancia que actúe como un medio dieléctrico tiene un valor característico. Cuanto más elevado es este valor más débil es la fuerza entre las cargas separadas y está dada por la siguiente expresión matemática:

$$F = k(q_1q_2)/ \epsilon r^2$$

A continuación se mencionan las constantes dieléctricas del etanol, propanol, metanol y agua.

Cuadro 2. Constante dieléctrica de algunas sustancias.

Compuesto	Constante Dieléctrica
Agua	80.2
Metanol	32.7
Etanol	24.6
Isopropanol	19.9

Los polielectrólitos grandes como los ácidos nucleicos y las proteínas, se clasifican como macroiones, la interacción de los macroiones se modifica enormemente por la presencia en la misma disolución de iones pequeños como los de las sales disueltas. Cada macroión recoge sobre él una atmósfera contraiónica con abundantes iones pequeños con carga opuesta, y esta nube tiende a ocultar a las moléculas unas de otras, una de las variables que afecta este fenómeno y que está en función de la concentración de los iones pequeños, es la fuerza iónica. (Van Holde,2002).

El efecto de obstrucción ayuda a explicar una observación general relacionada con la solubilidad de las proteínas, el aumento de la fuerza iónica (hasta un determinado punto) aumenta la solubilidad e incluso el punto isoeléctrico.

La fuerza iónica está representada por la siguiente expresión:

$$I = 0.5 \sum_i M_i Z_i^2$$

El aumento de las concentraciones hasta niveles muy elevados causa el efecto opuesto. En soluciones salinas muy concentradas, gran parte del agua que solvataría y ayudaría a solubilizar a la molécula de la proteína está enlazada en la capa de hidratación de numerosos iones salinos, impidiendo una hidratación suficiente de las proteínas. (Van Holde 2002).

1.6 Microbiología predictiva

La microbiología predictiva es un campo de estudio que combina elementos de la microbiología, matemáticas y estadística para desarrollar modelos que describan y predigan matemáticamente el crecimiento o muerte de microorganismos cuando se les somete a condiciones medioambientales específicas (Whiting, 1995).

La microbiología predictiva está basada en la premisa de que las respuestas de poblaciones de microorganismos a factores medioambientales son reproducibles y que por lo tanto es posible, interpolando entre puntos, predecir el comportamiento de estos microorganismos para condiciones que no han sido ensayadas. Las condiciones medioambientales incluyen tanto a factores intrínsecos (pH, a_w , concentraciones de NaCl), como los extrínsecos (temperatura o composición gaseosa) (Ross y McMeekin, 1994).

Se han propuesto varias clasificaciones de los modelos microbiológicos. La más comúnmente aceptada es la que diferencia en modelos de crecimiento y modelos de inactivación/supervivencia; y cada uno de ellos es categorizado a su vez en nivel primario, secundario y terciario.

Modelos de nivel primario: Describen los cambios en el número de microorganismos a lo largo del tiempo. Este modelo puede cuantificar unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml), formación de toxinas, productos

metabólicos, absorbancia e impedancia. En ellos una ecuación matemática describe el cambio de una respuesta a lo largo del tiempo y con un grupo de valores de unos parámetros determinados (Whiting 1995)

Modelos de nivel secundario: Describen la respuesta de parámetros de los modelos primarios a cambios en las condiciones medioambientales como son la temperatura , pH, a_w (Whiting 1995).

Modelos terciarios: Son programas de ordenador que transforman los modelos de nivel primario y secundario en programas de fácil manejo para usuarios finales del modelo, en la forma de software de aplicación y sistemas expertos. Estos programas pueden calcular respuestas de los microorganismos a condiciones cambiantes, comparar los efectos de diferentes o contrastar el comportamiento de varios microorganismos (Whiting 1995).

1.7 Análisis estadístico

El Análisis de varianza de un factor somete a prueba la igualdad de las medias de la población cuando la clasificación se realiza mediante una sola variable. Por lo general, la variable de clasificación, o factor, tiene tres o más niveles (el ANOVA de un factor con dos niveles es equivalente a una prueba t), donde el nivel representa al tratamiento aplicado. El procedimiento de un factor permite examinar las diferencias entre las medias utilizando múltiples comparaciones. El Análisis de varianza de dos factores ejecuta un análisis de la varianza para someter a prueba la igualdad de las medias de las poblaciones cuando la clasificación de los tratamientos se realiza mediante dos variables o factores. En el ANOVA de dos factores, los datos deben ser balanceados (todas las celdas deben tener el mismo número de observaciones) y los factores deben ser fijos. (Hayter, 1984)

El método de Tukey utilizado en el análisis ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre medias de los niveles de factor mientras controla el nivel de significancia por familia en un nivel que usted especifique. Es importante considerar el nivel de significancia por familia al realizar múltiples comparaciones, porque las posibilidades de cometer un

error de tipo I para una serie de comparaciones son mayores que el nivel de significancia para cualquier comparación individual. Para contrarrestar este nivel de significancia más alta, el método de Tukey ajusta el intervalo de confianza para cada intervalo individual, de manera que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor que se especifiquen.(Hayter, 1984)

El método de comparaciones múltiples es un método de comparaciones múltiples diseñado para identificar los mejores niveles de factor, los insignificativamente diferentes del mejor y los significativamente diferentes del mejor. Se puede definir "mejor" como la media más alta o la media más baja. Este procedimiento se utiliza generalmente como seguimiento a un ANOVA para analizar con mayor precisión las diferencias entre las medias de los niveles.(Schilling,1990).

El método de diferencia significativa mínima de Fisher se utiliza en el ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de factores, mientras controla el nivel de significancia individual para que permanezca en un nivel que se especifique. Posteriormente, el método de Fisher utiliza el nivel de significancia individual y varias comparaciones para calcular el nivel de confianza simultáneo para todos los intervalos de confianza. Este nivel de confianza simultáneo es la probabilidad de que todos los intervalos de confianza contengan la diferencia verdadera.(Schilling,1990)

2. JUSTIFICACION.

Bacterias Gram negativas como *Salmonella enterica*, serovariedades: Typhi, Choleraesuis y Gallinarum, *Escherichia coli* O157:H7; así como las Gram positivas *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* se pueden asociar con el hombre causando enfermedades transmitidas por los alimentos. Esto lleva a pérdidas económicas muy serias, que plantean la necesidad de desarrollar en los alimentos barreras naturales que eviten el establecimiento y la diseminación de los microorganismos patógenas que pudieran alcanzarlo. Las plantas producen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana que las protegen de las infecciones, lo que se ha demostrado en *Capsicum annuum*, el cual produce fenoles que contienen un anillo de benceno con uno o más radicales hidroxilo, destacando los ácidos: caféico, ferúlico, p-cumárico y cinámico. Sin embargo, estos ácidos orgánicos presentan una baja solubilidad en medio acuoso, lo que hace necesario el preparar sus derivados en forma de sales e investigar si conservan sus propiedades antimicrobianas. Además, es necesario analizar la actividad antibacteriana a través del tiempo, para lo cual se deben desarrollar cinéticas de supervivencia o muerte, que permitan conocer si las bacterias sufren efectos bactericidas, bacteriostáticos o ninguno del todo. Esto último, también puede corroborarse siguiendo métodos predictivos, que permitan determinar el comportamiento de las bacterias patógenas frente a estos compuestos. Una de las herramientas para dilucidar el daño que sufre una estructura bacteriana es por medio de la micrografía de transmisión electrónica, con las que se puede correlacionar el sitio blanco de los compuestos analizados. Una vez que los compuestos aislados han demostrado sus propiedades, se deben establecer las condiciones que permitan obtener extractos activos de *C. annuum* y saber si comparten sus propiedades antimicrobianas con los compuestos aislados, para finalmente probarlos en un alimento. Por estos motivos, en esta investigación se pretenden caracterizar las propiedades antimicrobianas de los compuestos aislados y extractos de *C. annuum*.

HIPOTESIS

El aumento de la solubilidad de los ácidos cinámico e hidroxicinámicos, sin recurrir a alcoholes, mediante la formación de sus sales, permitirá el estudio de las cinéticas del efecto inhibitorio sobre bacterias patógenas, y su validación en un alimento.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar por pruebas microbiológicas, morfológicas y microbiología predictiva la actividad antimicrobiana de compuestos presentes en forma natural en extractos de *Capsicum annuum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar las sales sódicas de los ácidos: cinámico, ferúlico, p-cumárico y caféico, que están presentes en forma natural en extractos de *C. annuum*.
- Elaborar cinéticas de crecimiento, supervivencia y/o muerte de seis bacterias patógenas: *Salmonella enterica* serovariedad Typhi, *Salmonella enterica* serovariedad Gallinarum, *Salmonella enterica* serovariedad Choleraesuis, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* al estar en presencia de los compuestos de *C. annuum*.
- Determinar los factores biológicos de la interacción bacterias patógenas compuestos de *C. annuum* por microbiología predictiva, aplicando las ecuaciones de Gompertz y Gompertz modificada.
- Observar alteraciones en la ultraestructura de bacterias Gram positivas y Gram negativas que son expuestas a cinamato, ferulato, cumarato y cafeato.
- Obtener extractos de chile utilizando diferentes valores de fuerza iónica y constante dieléctrica y determinar su actividad antimicrobiana.
- Realización de pruebas de reto microbiano en un alimento, empleando bacterias de importancia en la salud humana y animal.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparación de las sales del ácido cinámico, ácido ferúlico , cumárico y caféico

Para conseguir la solubilidad de los compuestos con actividad antimicrobiana, se prepararon las sales de los ácidos correspondientes, haciendo reaccionar la cantidad estequiométrica de los ácidos: caféico, p-cumárico (SIGMA, Rockville, Maryland, USA), ferúlico, trans-cinámico (Aldrich, Saint Louis, M.O, USA) con hidróxido de sodio (Fermont, Monterrey México). Al término de la reacción se midió el pH de la solución resultante, obteniéndose un valor en el intervalo de 7 a 7.5. Para cada sal se prepararon soluciones a concentraciones de: 1, 0.8, 0.6, 0.4, y 0.2%, en volúmenes de 50 mL de caldo soya tripticaseína (TSB) (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA). El ácido ferúlico y cumárico se preparó también a concentración de 0.2,0.4,0.6,0.8 y 1% pero la solución se hizo en 1ml adicionando etanol de tal manera que quedara al 2% en el volumen de 1 ml.

4.2 Bacteria y Condiciones de cultivo

La cepa de *E. coli* O157, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Typhi, *Bacillus cereus* así como *Staphylococcus aureus* fueron obtenidas del cepario del laboratorio de bacteriología médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México. La bacterias se conservaron en TSB con glicerol al 30% y a -70° C. Cada mes se propagó en agar soya y tripticaseína (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) a partir de donde se realizaron los experimentos.

4.3 Efecto de la sales del ácido cinámico e hidroxicinámico, ácido ferúlico y p-cumárico en curvas de crecimiento de *E. coli* O157, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Gallinarum, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*

Para evaluar la actividad antibacteriana de las cuatro sales sobre las 6 bacterias, diseñamos para cada una de las bacterias un experimento de reto en

5 concentraciones diferentes de las sales y los correspondientes testigos sin sales. La metodología utilizada consistió en preparar para cada sal 6 matraces con 50 ml de TSB, uno que correspondió al testigo y los restantes con las concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1%. Posteriormente, cada matraz fue inoculado con 10µl de un cultivo fresco de 24h de incubación del microorganismo (*E. coli* O157, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*) que fue ajustado a la turbiedad del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. Los matraces inoculados se incubaron a 37°C, a cada matraz se le realizó un recuento bacteriano por medio de la técnica de Miles and Misra (1938), tomando alícuotas de 100 µl por triplicado a las 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48horas, realizando 8 diluciones en tubos que contenían 900 µl de agua destilada estéril. De cada dilución se aplicó un inóculo de 10 µl en una placa de agar soya tripticaseína y se incubaron a 37° C por 24h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC). Los experimentos fueron hechos por triplicado. Con los logaritmos del número de bacterias obtenidas en cada ensayo, se construyeron las cinéticas de supervivencia/muerte con respecto al tiempo para cada ácido y para cada concentración probada. Al finalizar la cinética se tomó una alícuota de 100 µl y se colocó en un tubo con caldo soya tripticaseína y se incubó por 24h a 37°C a continuación se tomaron 10 µl del tubo y se sembraron en caja petri y se incubó por 24h.

4.4 Estimación de los parámetros de las curvas obtenidas

Cuando se observó el crecimiento del microorganismo y de acuerdo con lo reportado por Zwietering et al (1990) se consideraron tres zonas de la curva que corresponden a la fase Lag, fase Log y la de máximo crecimiento. DE estas tres zonas se estiman los parámetros biológicos don de A (máximo crecimiento, λ (duración de la fase Lag) y μ Velocidad de máximo crecimiento). Este valor corresponde al punto de inflexión de la curva. Figura .2

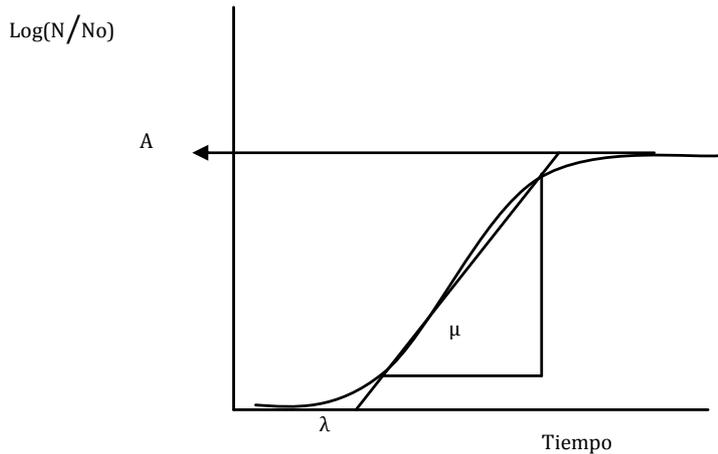


Figura 2. Curva de crecimiento microbiana

Por otra parte, en el caso de las curvas de supervivencia y muerte bacteriana, se consideraron tres zonas de la curva de inactivación que fueron la velocidad de reducción del microorganismo (b), la fase de desaparición (A) y el menor valor de la asintota (C) mismos que se muestran en la figura 3.

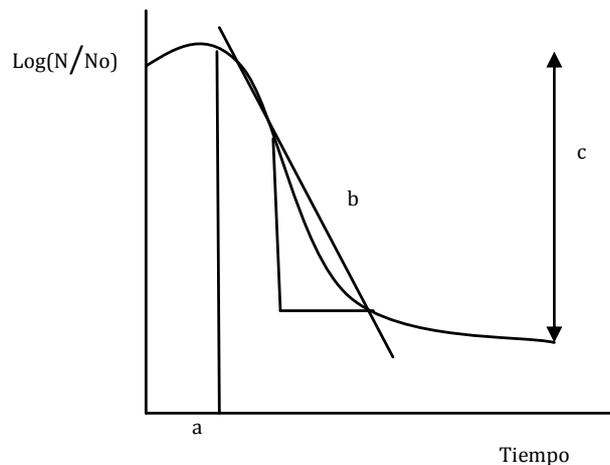


Figura 3. Curva de inactivación microbiana con los parámetros biológicos..

4.5 Aplicación de las ecuaciones de Gompertz y Gompertz modificado para describir la inhibición observada

Con objeto de obtener el modelo matemático que describe las curvas de crecimiento, los parámetros biológicos se transformaron los términos a,b y c de la ecuación de Gompertz. La transformación se realiza considerando las siguientes relaciones matemáticas:

$$a=A$$

$$b = 1 +(\mu*\lambda/A)$$

$$c = (b-1)/\lambda$$

Que corresponden a los coeficientes de la ecuación de Gompertz que es la siguiente:

$$y = a*\exp(-\exp(b-c*x))$$

donde $y = \log(N/N_0)$ y $x =$ tiempo (Buchanan y col.1989)

Para el caso de las curvas de supervivencia, se realizó el mismo procedimiento, pero en este caso se utiliza la ecuación de Gompertz modificado.

$$y = c* \exp(-\exp(a+b*x))-c*\exp(-\exp(a))$$

donde $y = \log(N/N_0)$ y $x =$ tiempo (Yamamoto et al, 2007)

Donde $a =$ Inicio de la curva muerte.(tiempo)

$b =$ Velocidad de muerte en el punto de inflexión.

$c =$ Menor valor de Log (N/N₀)

Finalmente y para obtener el modelo se procedió a alimentar al paquete estadístico Statgraphic ® Plus 5.1 con los coeficientes estimados, para que el programa arroje tanto los coeficientes de la ecuación de Gompertz con mejor ajuste a la gráfica correspondiente. Con estos coeficientes calculados estadísticamente por el programa, recalculamos los parámetros biológicos, siendo estos los resultados finales.

4.6 Análisis estadístico de los resultados (comparación del comportamiento entre bacterias y sales)

Para realizar el análisis de varianza de una sola vía y la comparación múltiple de Tukey con valores de $p < 0.05$ se usó el software MINITAB® 15, el tratamiento estadístico fue realizado a log de UFC/ml del crecimiento

microbiano a las cepas de *E. coli* O157, *S. Typhi*, *S. Choleraesuis*, *S. Gallinarum*, *S. aureus* y *B. cereus* a cinco concentraciones de ácidos y sales fenólicas con tres replicas y posteriormente se promediaron las replicas para realizar el análisis.

4.7 Análisis de la ultraestructura de bacterias sometidas a tratamiento con diferentes fenilpropanoides por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Debido a que este ensayo requiere un paquete celular grande, se sembraron 2 ml de la suspensión de *E. coli* O157 y *Salmonella* Gallinarum y *S. aureus* ajustada al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland en 20 ml de TSB adicionado de cada uno de los diferentes fenilpropanoides (Sal del ácido cinámico, ácido p- cumárico, ácido ferúlico y ácido caféico) a las concentraciones de 0.6% y 1%, y se incubaron a 37°C. Se tomaron alícuotas de 1.5 ml cada 2 h hasta llegar a 10h, y una alícuota final a las 24 h. Cada muestra fue centrifugada a 6000 rpm durante 5 min.

Las muestras se fijaron con glutaraldehído (Electronic Microscopy Science-EMS; Washington,USA) al 2.5% en regulador de fosfatos (pH 7.3) durante 1 hora y se lavaron 3 veces con la solución reguladora. Después se fijó cada muestra con tetraóxido de osmio (EMS; Washington,USA) al 1% en el mismo regulador por 1 hora. A continuación cada muestra se lavó con soluciones crecientes de etanol-agua al 40-90% por 10 minutos y finalmente con etanol al 100% (tres cambios de 10 minutos cada uno). Finalmente, las muestras en mezclas de resina Epon-óxido de propileno (EMS; Washington,USA) 1:2, 1:1 y 3:1 durante 2h cada una. Finalmente incluir en resina Epon al 100% con dos cambios de 2 h c/u. Se identifican las muestras y se incubaron por 24h a 60°C para la polimerización de la resina.

Las muestras polimerizadas se cortaron con un Ultramicrotomo Marca Leica Modelo Ultracut UCT, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron bajo el microscopio electrónico de transmisión Marca Jeol modelo JEM 1010 a un voltaje de aceleración de 60 Kv, Akishima, Japan. (Bozzola,1991).

4.8 Metodología para la obtención de los extractos con disolventes

Se obtuvieron los extractos de chile serrano y chile guajillo, a continuación pesó y se molió 20g de chile, luego se adicionó 80 ml de agua a la licuadora del termomix y se calentó a 70°C por 2 min., a continuación se adicionó los 20g de chile al termomix y se licuó a 70°C por 3 min. Posteriormente la solución se colocó en un vaso de precipitado y se adicionó 80 ml del solvente y se dejó reposar por 1 h. A continuación se colocó el extracto alcohólico en un matraz para el rotavapor, y se evaporó el solvente hasta eliminarlo, finalmente, se almacenó el extracto a -80°C.

4.9 Pruebas de supervivencia de bacterias en medio de cultivo TSB adicionando extracto de chile

Para el caso de los extractos de chile se toman 10 ml del mismo y se realizaron diluciones sucesivas del extracto a continuación se inoculó de tal manera que tengamos 10^3 bacterias, finalmente se toman muestras al inicio de la inoculación y a 24h de las misma.

4.10 Pruebas de supervivencia de *E.coli* O157 y *S. Gallinarum*

En esta prueba de reto microbiano se utilizaron las sales sódicas en un alimento y como nutriente se utilizó jugo de carne previamente cocida para tener un volumen final de 50 ml a continuación se inoculó y se tomaron muestras en el momento de la inoculación, a las 24 h y 48h. El jugo de carne se preparó de la siguiente manera: Se pesó 250g de carne magra, 500g de agua y 5g de sal refinada cocinada por 5 minutos en olla Express doméstica.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Efecto de la formación de las sales y el pH del medio en la solubilidad de los compuestos en los grupos ionizables de los ácidos cinámico e hidroxicinámicos

La falta de la solubilidad de compuestos con acción antibacteriana, en sistemas acuosos, como son la mayoría de los alimentos, limita notablemente su difusión y por lo tanto su función protectora. En el siguiente cuadro se puede observar la solubilidades de los ácidos en medio acuoso obtenidos a 23°C. Cuadro 3.

Cuadro 3. Solubilidades de los ácidos ferúlico, caféico, cumárico y cinámico en agua.

Compuesto	Solubilidad (%)
Ácido ferúlico	0.008
Ácido caféico	0.008
Ácido cumárico	0.008
Ácido Cinámico	0.5

Es por eso que se procedió a formar las sales de los ácidos cinámico, ferúlico, cumárico, y caféico y se observó un aumento notorio de la solubilidad, de menos de 0.1 a más de 5% en todos los casos. Cuadro 4

Cuadro 4. Máximas solubilidades obtenidas en las sales sódicas a 23 °C.

Compuesto	Solubilidad (%)
Ferulato de sodio	3.42
Cafeato de sodio	4.40
Cumarato de sodio	5.98
Cinamato de sodio	4.47

Es de gran importancia la disociación de los ácidos orgánicos que actúan como antimicrobianos por ejemplo el benzoato y el sorbato se utilizan en forma de sales por que son más solubles y su efectividad es mayor cuando no están disociados (el benzoato de sodio tiene un porcentaje de disociación de 93.5% a pH 3, y del sorbato del 58.2% a pH 3), sin embargo en las moléculas de estudio de nuestro trabajo se tienen dos grupos funcionales importantes, el grupo carboxilo y el grupo hidroxilo, entonces se calcularon el % de no disociación los grupos funcionales de los ácidos hidroxicinámicos a pH 7 ya que las pruebas se realizaron a ese pH, entonces empleando la ecuación de Henderson-Hasselbalch y teniendo los valores de pK se calculó la proporción del carboxilo disociado y en los hidroxilo(s) no disociados de los ácidos ferúlico cumárico y caféico.

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log (\text{base})/\text{ácido}$$

En el caso del ácido caféico, por contener dos hidroxilos también se calculó la proporción del segundo hidroxilo no disociado. La proporción del anión carboxilo en los cuatro ácidos es mayoritaria, igual o mayor del 99%, por lo que debe considerarse cuando se trata de explicar mecanismos. En el caso de los hidroxilos de los ácidos fenólicos, los hidroxilos no disociados constituyen más del 96% a pH=7, en todos los casos. Cuadro 5.

Cuadro 5. Porcentaje de disociación de los ácidos cinámico, ferúlico, p-cumárico y caféico a pH 7

Ácidos	Valores de pK_a	Carboxilo disociado (%)	Hidroxilos no disociados(%) pH 7
Cinámico	4.21	99.8	-
Ferúlico	4.45, 8.5	99.7	96.9
P-cumárico	4.57,8.7	99.4	96.9
Caféico	4.45,8.64,2.5	99.7	97.6,99.9

Dado que la proporción de forma disociada de los ácidos (anión) es mayoritaria a pH=7, para los cuatro compuestos activos, nos referimos a ellos como cinamato, ferulato, cumarato y cafeato. La razón de evaluar la supervivencia/muerte de las bacterias patógenas a un pH neutro es que la mayoría de las epidemias en que se involucra a *E. coli* O157 y *Salmonella spp.* han sido causadas por la ingestión de cárnicos, y lácteos con valor de pH más cercanos a la neutralidad (entre 5.5 y 7) aunque *Escherichia coli* O157:H7 puede sobrevivir en jugo de manzana con pH entre 3.2 a 5.0 (Wen et al, 2003).

5.2 Comparación de la actividad antibacterial de las sales sódicas de cinamato, ferulato, cumarato y cafeato en *E.coli* O157, *S. Gallinarum*, *S. Typhi*, *S. Choleraesuis*, *S. aureus* y *B. cereus*

En reportes previos sobre la actividad antibacteriana de los ácido fenólicos son frecuentemente contradictorios, porque se utilizan diferentes metodología experimentales, composición del medio y una limitada solubilidad de los ácidos fenólicos son responsables de los resultados contradictorios de la actividad antibacteriana de estos compuestos (Wen et al, 2003). Se puede observar una pequeña actividad o ninguna actividad cuando se utilizan placas de agar, donde la solubilidad es pobre. En el presente trabajo no se observaron problemas de solubilidad durante la formación de la sal.

5.3 Efecto del cafeato de sodio

A continuación se muestran los resultados de cafeato de sodio retado con distintos microorganismos.

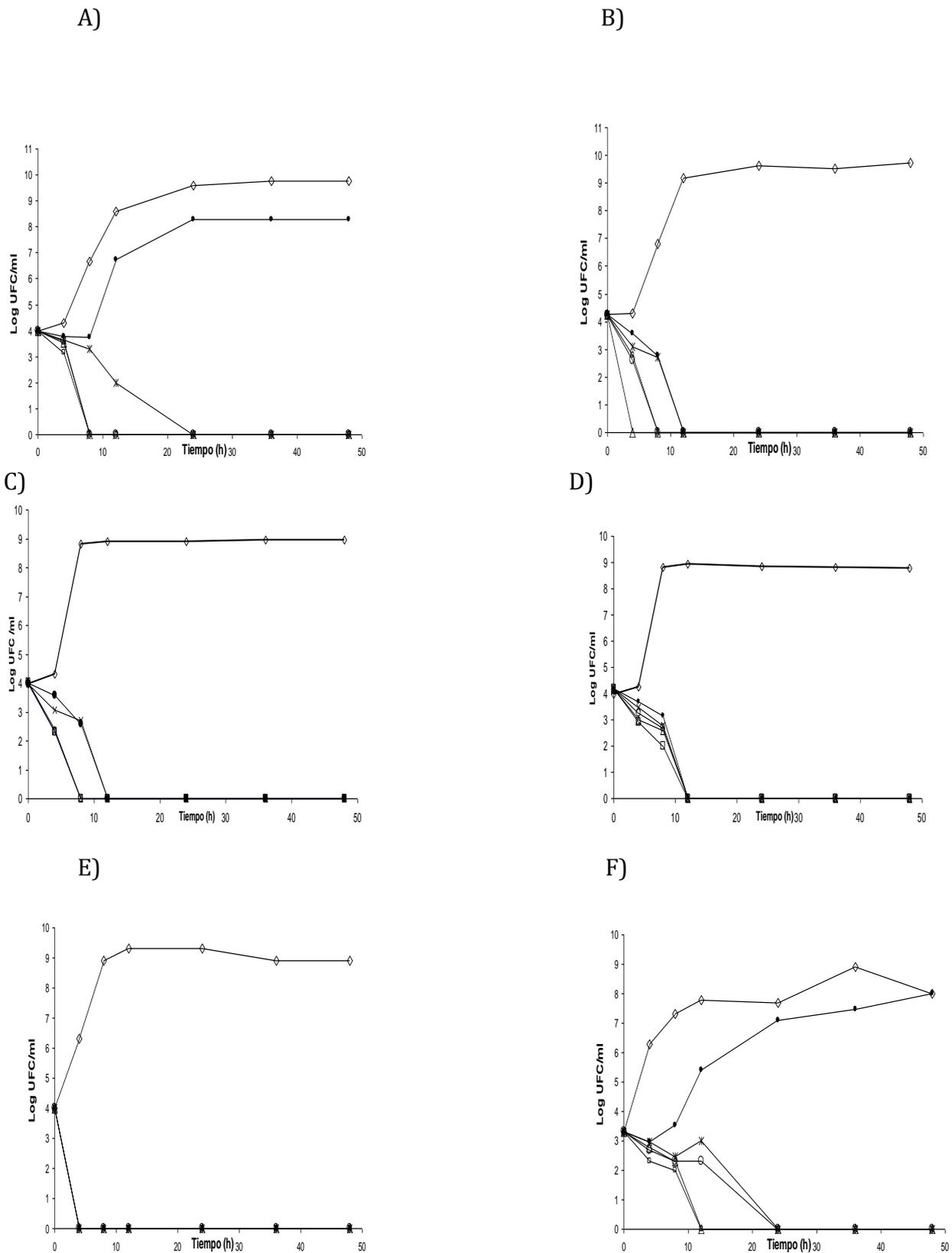


Fig. 4. Cinética de supervivencia de 6 bacterias patógenas expuestas a diferentes concentraciones de cafeato de sodio (1 % \square ; 0.8 % \triangle ; 0.6 % \diamond ; 0.4% \times ; 0.2 % \bullet ; control \circ). Las curvas se realizaron por triplicado. A) - *Escherichia coli* O157:H7; B) - *Salmonella* Typhi; C) - *Salmonella* Gallinarum; D) - *Salmonella* Choleraesuis, E) *S. aureus*., F) *B. cereus*.

Para el caso del cafeato de sodio (figura 4) se observaron diferencias significativas en la inhibición de *Escherichia coli* O157 y de *Salmonella* Gallinarum causadas por la presencia del cafeato de sodio en el medio. *E. coli* O157 no se vio afectada en la concentración de cafeato al 0.2%, en cambio *Salmonella* Gallinarum mostró una disminución drástica en el número de células vivas en las primeras 4 y 8 h de la misma concentración de cafeato. A las 12h se obtuvo una completa inhibición, no detectándose células vivas. Para *S. Typhi* y *S. Gallinarum* se tuvo una inhibición total de las bacterias a todas las concentraciones. Para el caso de *S. aureus* el cafeato inhibió completamente a esta bacteria en todas las concentraciones y para el caso de *B. cereus* la inhibición va desde la concentración de 1 a 0.4% por lo que se puede decir que afecto tanto a la forma vegetativa como a la forma esporulada de este microorganismo, así que afecta este compuesto tanto a bacterias Gram. positivas como a bacterias Gram. negativas.

En la figura 4 se muestran las curvas de muerte de *Salmonella* Gallinarum comparadas con el testigo (sin cafeato) se puede observar que a concentraciones de 0.8% y 1% la muerte de todas las células se consiguió en 8h y 12h respectivamente.

El ácido caféico es el ácido hidroxicinámico predominante en muchas frutas, es el constituyente principal y aproximadamente el 75% del total de ácidos hidroxicinámicos presentes en ciruelas, manzanas, chabacano, zarzamoras. Además también se encuentra en el chile Sal Luis en concentraciones de 0.1% en peso en base seca (Acero et al 2005).

La concentración del ácido caféico durante los meses de Julio sonde 1.3g/kg a 0.13 g/kg disminuyen hasta 0.1g/kg (0.01%) en el mes de octubre cuando la fruta esta madura. Es de suponer que los efectos inhibitorios del ácido caféico puede explicar por que la mayoría de las epidemias causadas por *E.coli* O157 en jugo de manzana sin pasteurizar suceden entre los meses de octubre y noviembre (Reinders et al 2001) cuando la concentración del ácido caféico decae a concentraciones < 0.01%.

El ácido caféico tiene actividad antibacteriana a concentraciones de 0.25% cuando es analizado el caldo utilizado la técnica de micro placas e incubadas

por 24h es reportada por Wen et al (2003). Acero et al 2005 demostró que la actividad antibacteriana de los fenil propanoides, el ácido caféico tenía mayor efectividad en reducir la población de *Listeria monocytogenes*.

Un resultado similar fue obtenido en este trabajo después de 24h de incubación con *E. coli* O157 y *Salmonella* Gallinarum. Aunque el ácido caféico muestra una actividad antibacteriana y esporostática (Bowles and Miller, 1994), todavía no ha sido aprobado como un aditivo en alimentos todavía.

A continuación se presenta el análisis estadístico y un ejemplo de cómo se realizaron los análisis de los resultados obtenidos con cafeato de sodio :

Resultados para: *E. coli* O157 Cafeato de sodio

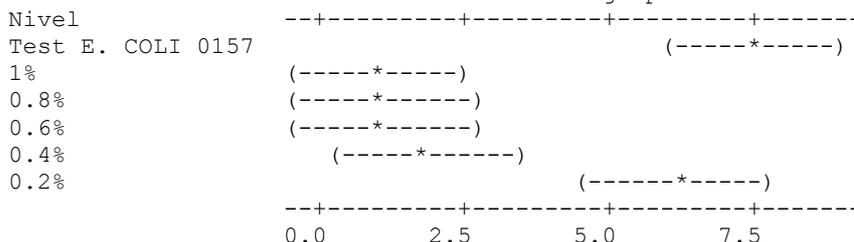
ANOVA unidireccional: Test Testigo, 1%, 0.8%, 0.6%, 0.4%, 0.2%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	5	301.51	60.30	14.54	0.000
Error	36	149.31	4.15		
Total	41	450.81			

S = 2.037 R-cuad. = 66.88% R-cuad.(ajustado) = 62.28%

Nivel	N	Media	Desv.Est.
Test E. COLI 0157	7	7.531	2.553
1%	7	1.021	1.761
0.8%	7	1.076	1.842
0.6%	7	1.086	1.858
0.4%	7	1.851	1.838
0.2%	7	6.166	2.245

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada



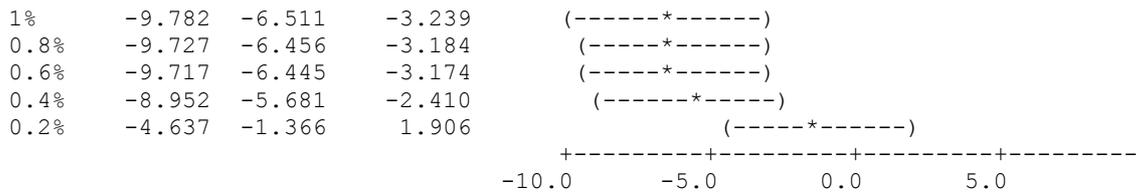
Desv.Est. agrupada = 2.037

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

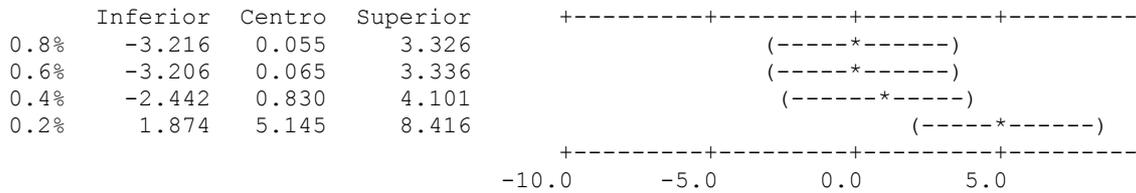
Nivel de confianza individual = 99.52%

Se restó Test E. COLI 0157 a:

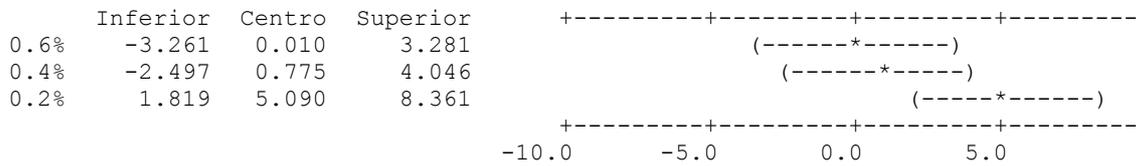
Inferior Centro Superior +-----+-----+-----+-----



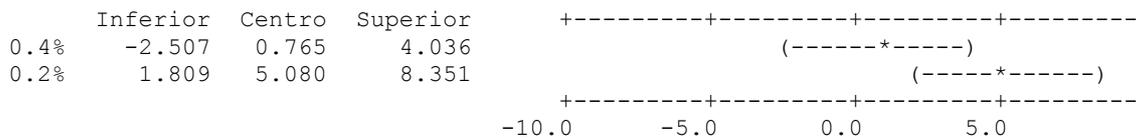
Se restó 1% a:



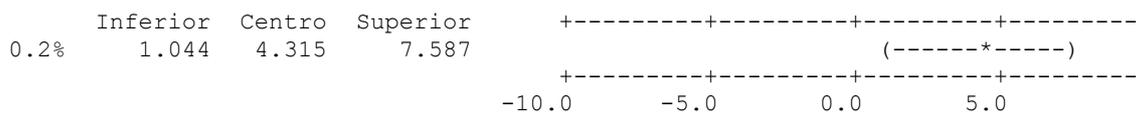
Se restó 0.8% a:



Se restó 0.6% a:



Se restó 0.4% a:



Análisis del efecto del cafeato de sodio sobre *E.coli* O157

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en las concentraciones de la sal de 1%, 0.8%, 0.6%, 0.4%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria *E. coli* O157. La concentración de 0.2% no hubo inhibición significativa. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cafeato de sodio sobre *S. Typhi*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en todas las concentraciones, fue inhibida la bacteria. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cafeato de sodio sobre *S. Choleraesuis*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en todas las concentraciones, fue inhibida la bacteria. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cafeato de sodio sobre *S. Gallinarum*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en todas las concentraciones, inhibió la bacteria. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cafeato de sodio sobre *S. aureus*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en todas las concentraciones, fue inhibida la bacteria. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cafeato de sodio sobre *B. cereus*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativas entre las concentraciones de la sal de cafeato en las concentraciones de 1% al 0.4%, la concentración del 0.2% no hubo una diferencia significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

A continuación se muestran los parámetros biológicos realizados para el cafeato de sodio:

Cuadro 6.. Parámetros biológicos de cafeato de sodio.

A) *E.coli* O157

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	1.87	9.6	9.7
0.2	1.4	7.9	8.1
0.4	-0.77	0	0
0.6	-0.89	0	0
0.8	-3.4	0	0
1.0	-3.4	0	0

B) *S. Typhi*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	6.74	9.5	9.6
0.2	-0.72	0	90
0.4	-0.72	0	0
0.6	-0.72	0	0
0.8	-0.75	0	0
1.0	-0.75	0	0

C) *S. Choleraesuis*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	7.49	8.8	8.9
0.2	-0.30	0	0
0.4	-0.304	0	0
0.6	-0.30	0	0
0.8	-0.31	-0	0
1.0	-0.31	0	0

D) *S. Gallinarum*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	9.23	9	9.9
0.2	-0.25	0	0
0.4	-0.25	0	0
0.6	-0.45	0	0
0.8	-0.45	0	0
1.0	-0.45	0	0

E) *S. aureus*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	3.28	9.1	9.5
0.2	-0.62	0	0
0.4	-0.624	0	0
0.6	-0.62	0	0
0.8	-0.62	-0	0
1.0	-0.62	0	0

F) *B. cereus*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	2.24	7.5	7.5
0.2	1.4	7	7
0.4	-0.11	0	0
0.6	-0.12	0	0
0.8	-0.9	0	0
1.0	-0.9	0	0

El cuadro 6 se muestran los resultados con cafeato de sodio, en el cual se observa que fueron eliminadas todas las bacterias en un periodo de 24h, las bacterias menos afectadas fueron *E. coli* O157 y *B. cereus*, ya que presentan un elevado crecimiento a la concentración de 0.2%. A continuación se muestran las ecuaciones donde hubo mayor inhibición con cafeato de sodio:

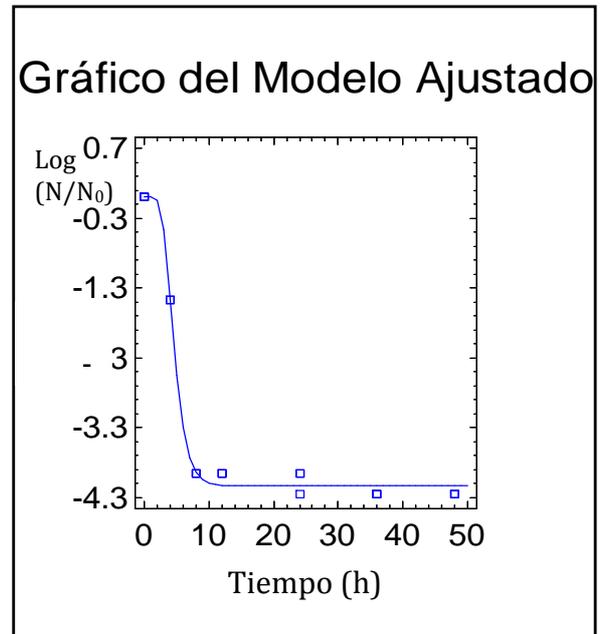
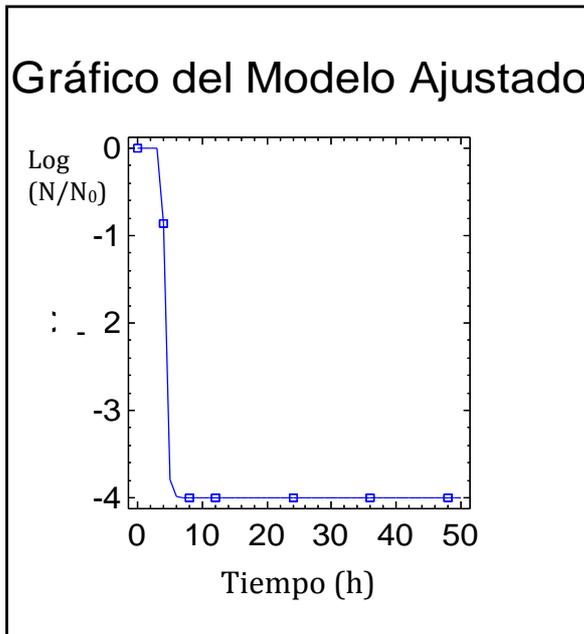
Cuadro 7 Ecuaciones de los modelos matemáticos a la concentración de 1% de cafeato de sodio

Concentración y Bacteria	Ecuaciones	R ²
Cafeato de sodio 1% con <i>E. coli</i> O157	$y = -4 * \exp(-\exp(13.8 + (-3.43 * x))) - (-4) * \exp(-\exp(13.8))$	99
Cafeato de sodio 1% con <i>S. Typhi</i>	$y = -4.13 * \exp(-\exp(3 + (-0.75 * x))) - (-4.13) * \exp(-\exp(3))$	99
Cafeato de sodio 1% con <i>S. Choleraesuis</i>	$y = -4.3 * \exp(-\exp(1.3 + (-0.31 * x))) - (-4.3) * \exp(-\exp(1.3))$	97
Cafeato de sodio 1% con <i>S. Gallinarum</i>	$y = -4 * \exp(-\exp(1.6 + (-0.45 * x))) - (-4) * \exp(-\exp(1.6))$	99
Cafeato de sodio 1% con <i>S. aureus</i>	$y = -4 * \exp(-\exp(0.17 + (-0.62 * x))) - c * \exp(-\exp(0.17))$	99
Cafeato de sodio 1% con <i>B. cereus</i>	$y = -3.32 * \exp(-\exp(1.7 + (-0.9 * x))) - (-3.32) * \exp(-\exp(1.7))$	99

A continuación se muestran las gráficas correspondientes al modelo matemático comparado con los resultados experimentales del cafeato de sodio:

A) *E.coli* O157

B) *S. Thyphi*



C) *S. Choleraesuis*

D) *S. Gallinarum*

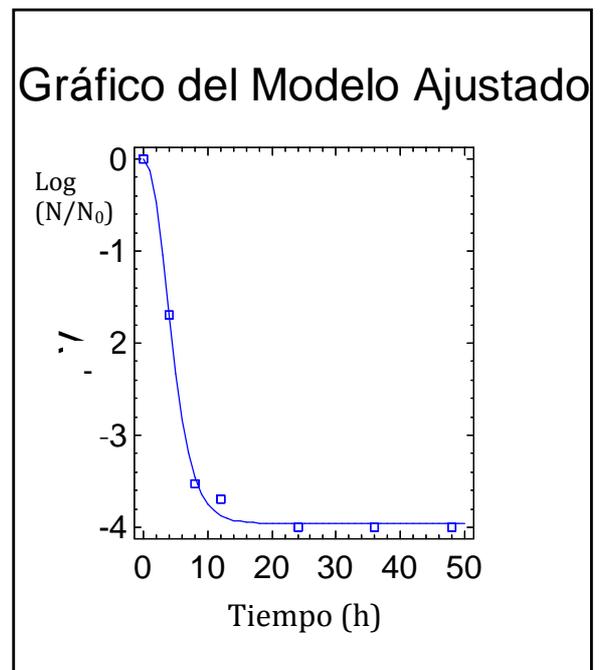
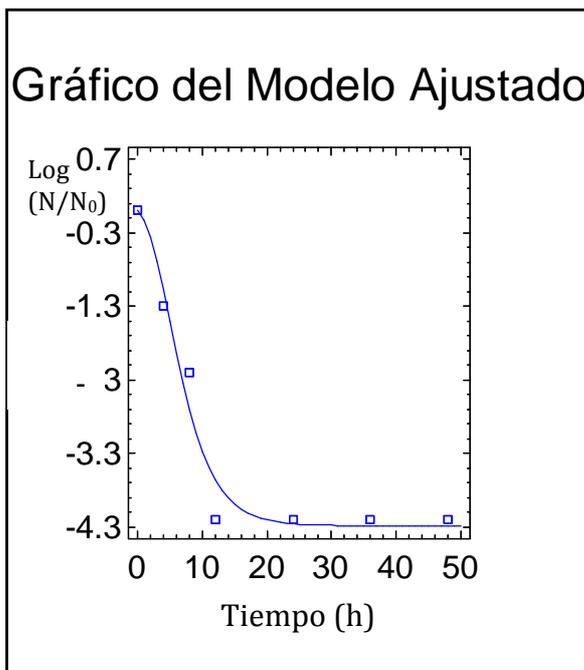


Figura 5 Gráfica de los modelos ajustados contra los datos experimentales del cafeato de sodio al 1%

5.4 Efecto del ferulato de sodio

A continuación se muestran los resultados obtenidos con el ferulato de sodio

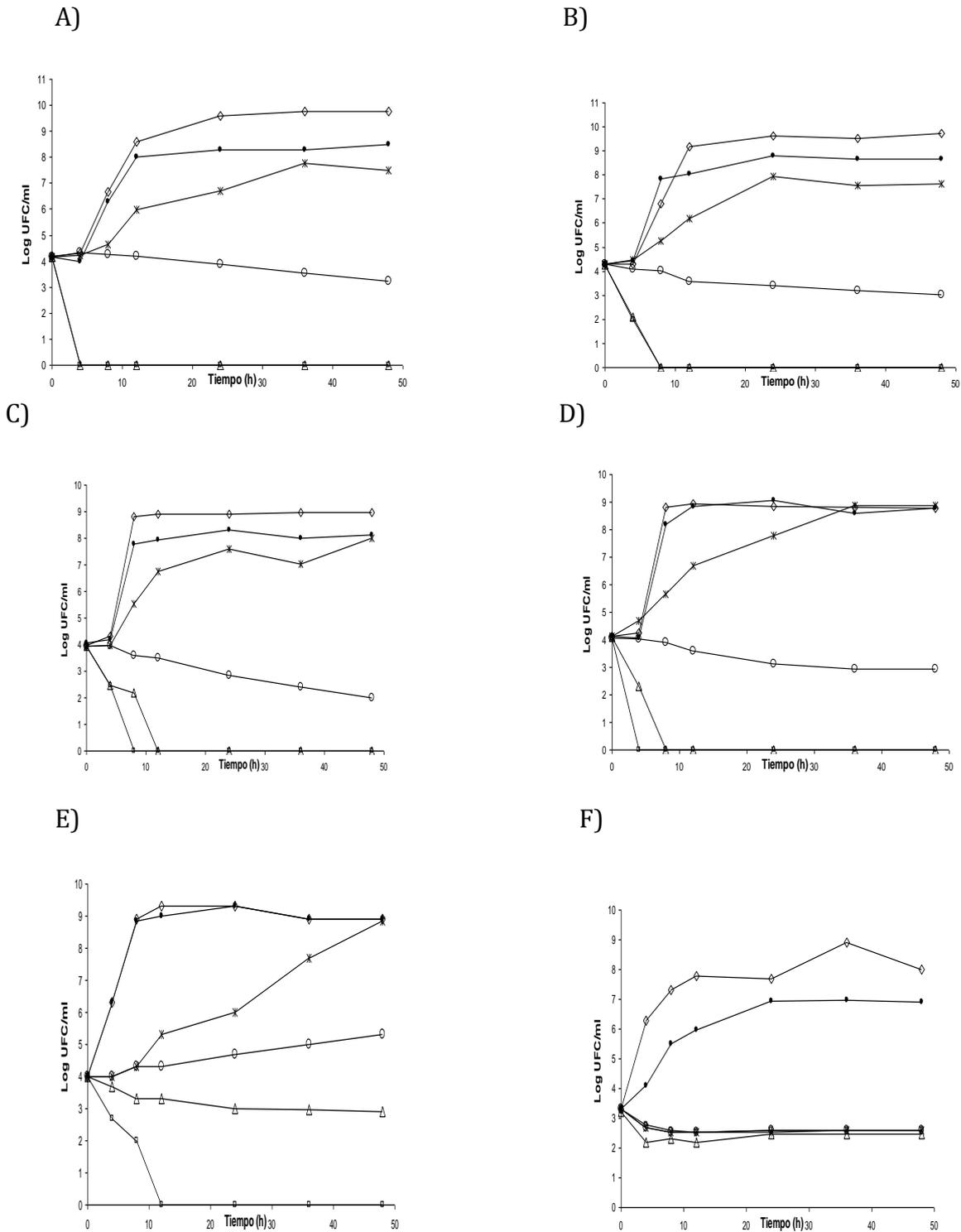


Fig. 6. Cinéticas de supervivencia de 6 bacterias patógenas expuestas a diferentes concentraciones de ferulato (1 % \square ; 0.8 % \triangle ; 0.6 % \circ ; 0.4% \ast ; 0.2 % \bullet ; control \diamond). Las curvas se realizaron por triplicado. A) - *Escherichia coli* O157:H7; B) - *Salmonella* Typhi; C) - *Salmonella* Gallinarum; D) - *Salmonella* Choleraesuis, E) *S. aureus*, F) *B. cereus*.

El impacto del ferulato (figura 6) sobre las curvas de supervivencia de *E.coli* O157 y de *Salmonella* Gallinarum depende de la concentración, es decir, se encontró un efecto bactericida en las concentraciones mayores (0.8 y 1%); un efecto bacteriostático en la concentración intermedia (0.6%) y una disminución en el crecimiento a las concentraciones menores (0.2y 0.4%). Para *S. Typhi* en presencia de ferulato se tiene una inhibición de las bacteria a concentración de 1 y 0.8% y una actividad bacteriostática a 0.6%, también se observó el mismo fenómeno para *S. Choleraesuis*, en el caso de *S. aureus* en presencia de ferulato se ve inhibida a una concentración de 1% y tiene una actividad bacteriostática a 0.8%, *B. cereus* cuenta con una actividad bacteriostática a concentraciones que van de 1 a 0.4%. Para el caso de *S. aureus* con ferulato de de sodio se vio afectada a la concentración de 1% y a la concentración de 0.8% presentó una actividad bacteriostática, *B. cereus* presentó una actividad bacteriostática a todas las concentraciones de ferulato.

A continuación se muestra un ejemplo de la realización de los análisis estadísticos de los resultados con ferulato

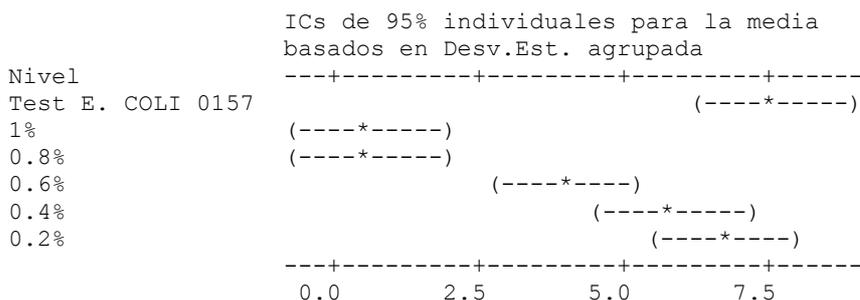
Resultados para: *E. Coli* O157 FERULATO DE SODIO

ANOVA unidireccional: Test Testigo, 1%, 0.8%, 0.6%, 0.4%, 0.2%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	5	327.44	65.49	22.15	0.000
Error	36	106.43	2.96		
Total	41	433.87			

S = 1.719 R-cuad. = 75.47% R-cuad. (ajustado) = 72.06%

Nivel	N	Media	Desv.Est.
Test E. COLI 0157	7	7.557	2.512
1%	7	0.591	1.562
0.8%	7	0.597	1.578
0.6%	7	3.948	0.419
0.4%	7	5.854	1.530
0.2%	7	6.788	1.995

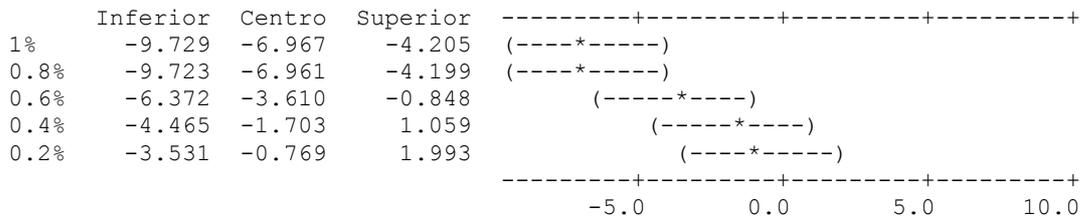


Desv.Est. agrupada = 1.719

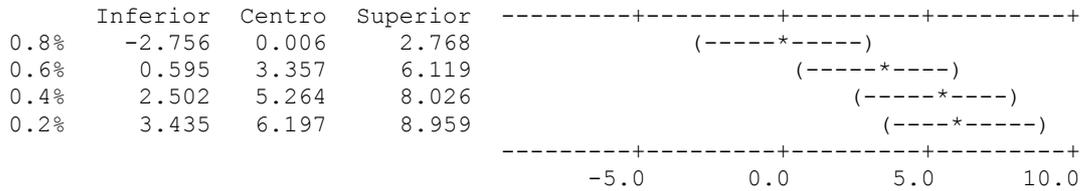
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 99.52%

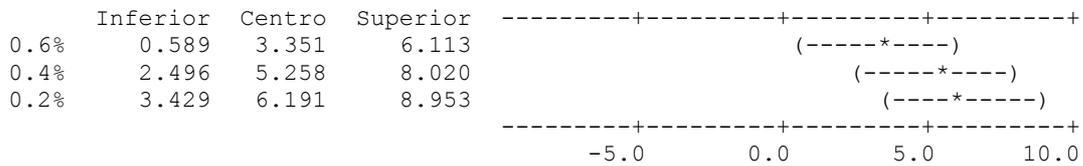
Se restó Test E. COLI 0157 a:



Se restó 1% a:



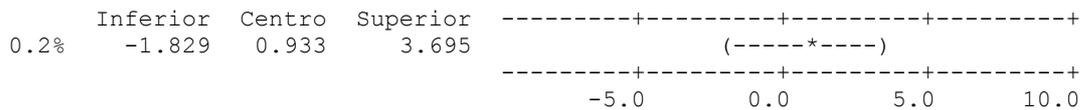
Se restó 0.8% a:



Se restó 0.6% a:



Se restó 0.4% a:



Análisis del efecto del ferulato de sodio sobre *E.coli* O157

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativas entre las concentraciones de la sal de ferulato de 1% y 0.8%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria *E. coli* O157. La concentración 0.6% de ferulato no inhibió el crecimiento pero si lo redujo significativamente en comparación con el testigo y las concentraciones de Ferulato de 0.4 y 0.2% no hubo inhibición significativa. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ferulato de sodio sobre *S. Typhi*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativas entre las concentraciones de la sal de ferulato de 1% y 0.8%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria *S. Typhi*. La concentración 0.6% de la sal, no inhibió el crecimiento pero si lo redujo significativamente en comparación con el testigo y las concentraciones de ferulato de 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ferulato de sodio sobre *S. Choleraesuis*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativas entre las concentraciones de la sal de ferulato de 1% y 0.8%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria *S. Choleraesuis*. La concentración 0.6% de la sal, no inhibió el crecimiento pero si lo redujo significativamente en comparación con el testigo y las concentraciones de Ferulato de 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ferulato de sodio sobre *S. Gallinarum*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativas entre las concentraciones de la sal de ferulato de 1% y 0.8%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria. La concentración 0.6% de ferulato no inhibió el crecimiento pero si lo redujo significativamente en comparación con el testigo y las concentraciones de ferulato de 0.4 y 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ferulato de sodio sobre *S.aureus*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza. No fue inhibida la bacteria. El valor de p-value de la tabla de Anova fue menor de 0.751, esto indica que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas

Análisis del efecto del ferulato de sodio sobre *B. cereus*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativas entre las concentraciones de la sal de ferulato de 1%, 0.8%, 0.6% Y 0.4% inhibiendo el crecimiento de la bacteria. La concentración 0.6% de ferulato no inhibió el crecimiento pero si lo redujo significativamente en comparación con el testigo y las concentraciones de ferulato de 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

A continuación se muestran los resultados de los parámetros biológicos del ferulato de sodio sobre diferentes bacterias:

Cuadro 8. Parámetros biológicos de ferulato de sodio

A) *E. coli* O157

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	1.87	9.6	9.7
0.2	1.4	8.2	8.4
0.4	1.5	8.3	7.5
0.6	-0.08	3	3.2
0.8	-0.62	-2	0
1.0	-0.64	-2	0

B) *S. Typhi*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	6.74	9.5	9.6
0.2	1.8	8.5	8.8
0.4	0.76	7.4	7.9
0.6	-0.06	2.5	3
0.8	-0.34	-0.6	0
1.0	-0.4	-0.6	0

C) *S. Choleraesuis*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	7.49	8.86	8.9
0.2	7	8.7	8.9
0.4	0.56	8.7	8.8
0.6	-0.14	2.8	2.9
0.8	-0.35	0	0
1.0	-0.87	0	0

D) *S. Gallinarum*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	9.23	9	8.9
0.2	3.2	8	8.3
0.4	0.05	7.6	8
0.6	-0.05	1.5	2
0.8	-0.15	-1.1	0
1.0	-0.37	-1.1	0

E) *S. aureus*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	3.28	9.12	9.5
0.2	3.2	9	9.2
0.4	0.31	9	9
0.6	0.1	5.3	5.2
0.8	-0.12	3.4	3.5
1.0	-0.23	0	0

F) *B. cereus*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	2.2	7.5	7.6
0.2	1.46	6.6	6.7
0.4	-0.48	2.4	2.3
0.6	-0.49	2.4	2.2
0.8	-0.5	2.4	2.3
1.0	-0.5	2.4	2.3

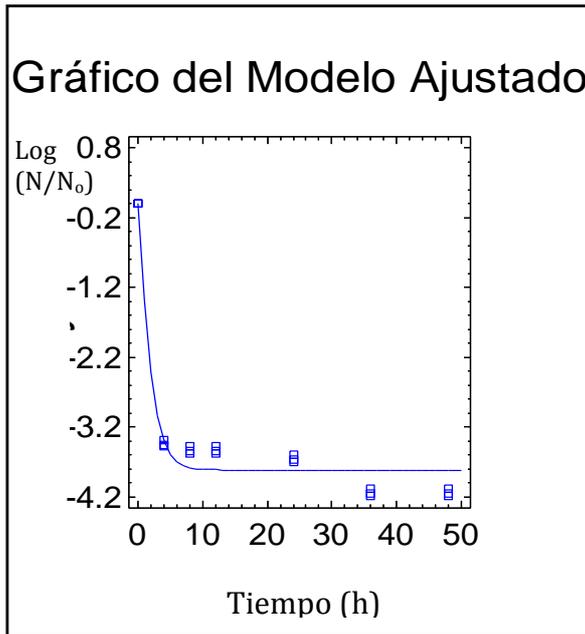
En el cuadro 8 podemos observar los resultados de los parámetros biológicos con ferulato de sodio, en el caso de las bacterias Gram negativas, se observan velocidades negativas en las concentraciones de 1y 0.8% lo cual nos indica que hay una inhibición de los microorganismos, para el caso de las concentraciones de 0.6% la velocidad es muy pequeña tendiendo casi a cero, lo cual nos indica una actividad bacteriostática, para el caso de las bacterias Gram. positivas únicamente se ven inhibida a la concentración de 1% el microorganismo *S. aureus*. A continuación se presentan las ecuaciones donde hubo mayor inhibición con el ferulato de de sodio:

Cuadro 9 Ecuaciones de los modelos matemáticos a la concentración de 1% de ferulato de sodio

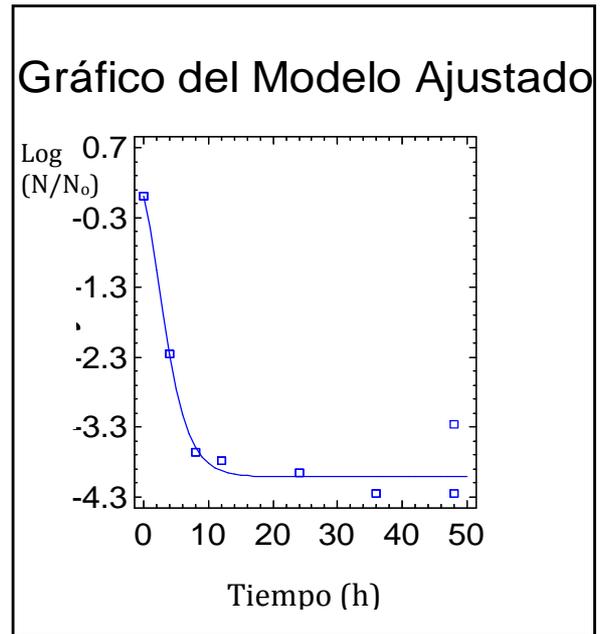
Concentración y Bacteria	Ecuaciones	R²
Ferulato de sodio 1% con <i>E. coli</i> O157	$y = -6 * \exp(-\exp(0.07 + (-0.64) * x)) - (-6) * \exp(-\exp(0.07))$	97
Ferulato de sodio 1% con <i>S. Typhi</i>	$y = -4.6 * \exp(-\exp(0.9 + (-0.4) * x)) - (-4.6) * \exp(-\exp(0.9))$	97
Ferulato de sodio 1% con <i>S. Choleraesuis</i>	$y = -4 * \exp(-\exp(3.3 + (-0.87) * x)) - (-4) * \exp(-\exp(3.3))$	96
Ferulato de sodio 1% con <i>S. Gallinarum</i>	$y = -5.1 * \exp(-\exp(0.6 + (-0.37) * x)) - (-5.1) * \exp(-\exp(0.6))$	99
Ferulato de sodio 1% con <i>S. aureus</i>	$y = -4 * \exp(-\exp(0.5 + (-0.23) * x)) - (-4) * \exp(-\exp(0.5))$	96
Ferulato de sodio 1% con <i>B. cereus</i>	$y = -0.1 * \exp(-\exp(2 + (-0.5) * x)) - (-0.1) * \exp(-\exp(2))$	93

A continuación se muestran las gráficas de los modelos ajustados a la concentración de 1% con ferulato de sodio:

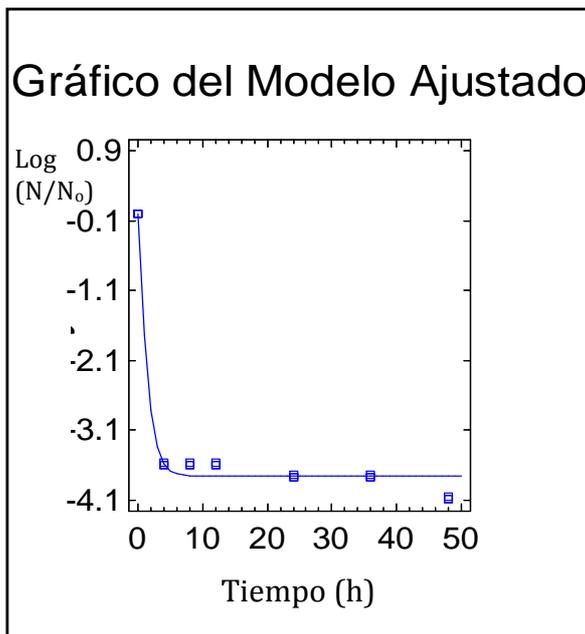
A) *E. coli* O157



B) *S. Typha*



B) *S. Choleraesuis*



C) *S. Gallinarum*

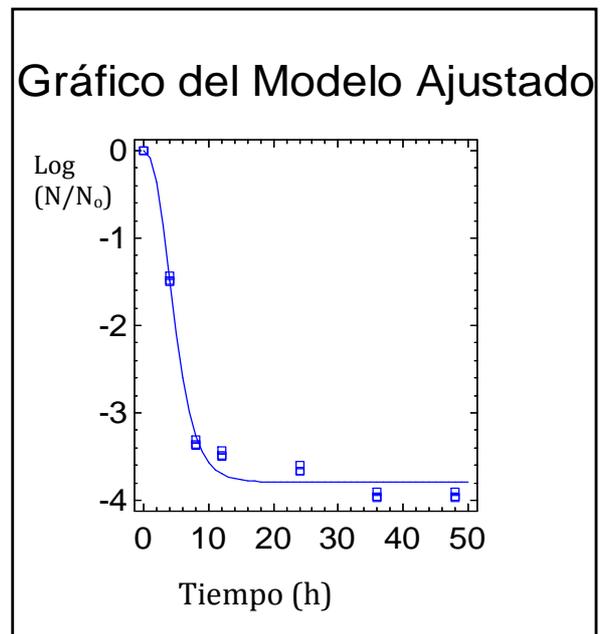


Figura 7 Gráfica de los modelos ajustados contra los datos experimentales. del ferulato de sodio al 1%

5.5 Efecto del cumarato de sodio

A continuación se muestran los resultados del cumarato de sodio.

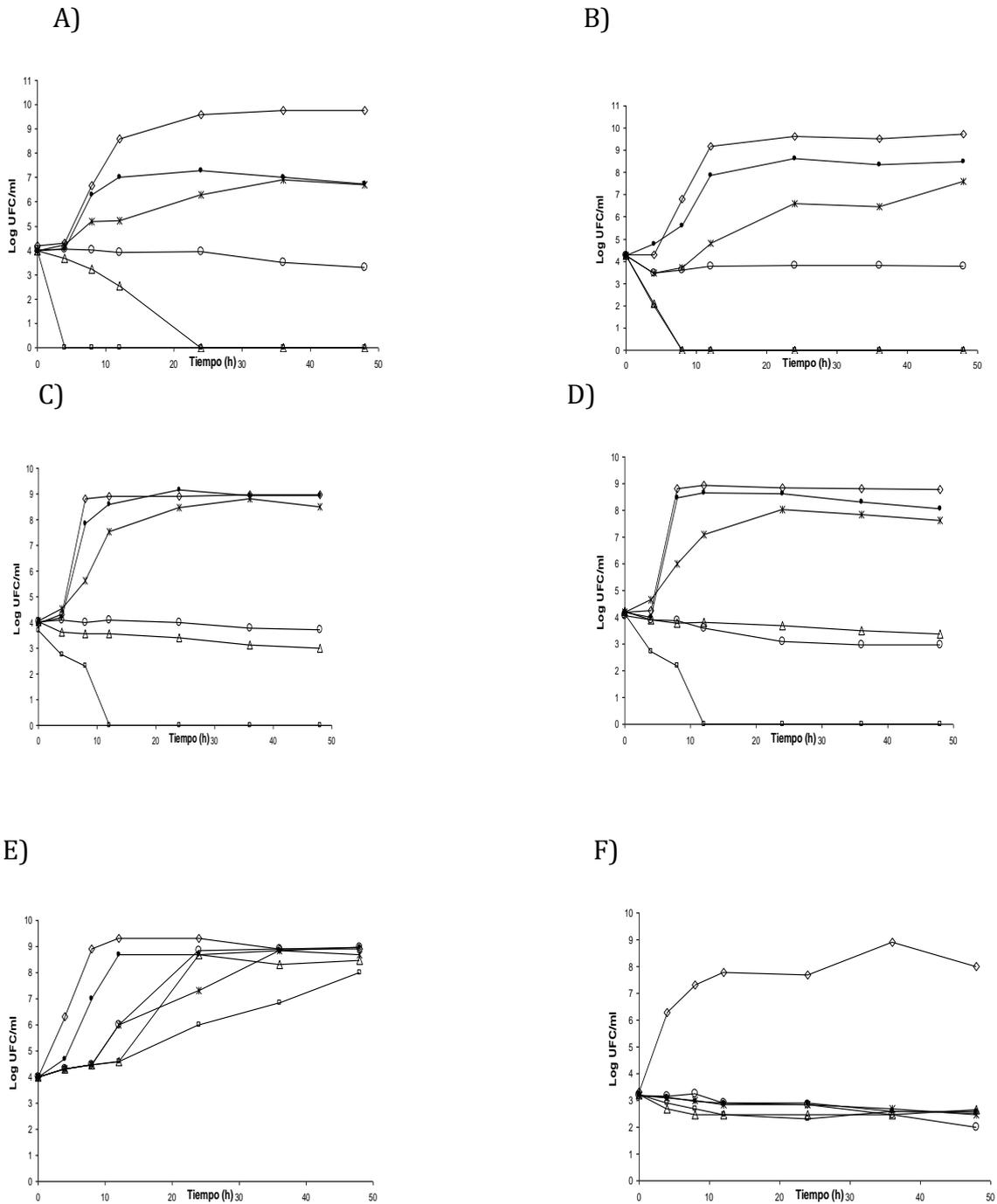


Fig. 8. Cinética de supervivencia de 6 bacterias patógenas expuestas a diferentes concentraciones de cumarato de sodio (1 % \square ; 0.8 % \triangle ; 0.6 % \circ ; 0.4% \ast ; 0.2 % \bullet ; control \diamond). Las curvas se realizaron por triplicado. A) - *Escherichia coli* O157:H7; B) - *Salmonella* Typhi; C) - *Salmonella* Gallinarum; D) - *Salmonella* Choleraesuis., E) *S. aureus* . F) *B. cereus*.

El impacto del cumarato (figura 8) sobre las curvas de supervivencia de *E.coli* O157 y de *Salmonella* Gallinarum fue muy similar y dependiente de la concentración, es decir, se encontró un efecto bactericida en las concentraciones mayores (0.8 y 1%); un efecto bacteriostático en la concentración intermedia (0.6%) y una disminución en el crecimiento a las concentraciones menores (0.2 y 0.4%). Para *S. Typhi* en presencia de cumarato de sodio, se cuenta con una actividad bactericida a concentraciones que van de 1 a 0.8% y una actividad bacteriostática a 0.6%, para el caso de *S. Gallinarum* se tiene un efecto bactericida a la concentración de 1% y un efecto bacteriostático a 0.8% Para el caso de *S. aureus* con cumarato de sodio no se vio afectada por este compuesto ya que no presentó ni actividad bactericida ni bacteriostática, únicamente se observa una actividad bacteriostática parcial a las concentraciones que van de 1 a 0.4% durante las primeras 12h, para posteriormente crecer hasta alcanzar concentraciones similares al testigo, *B. cereus* presenta una actividad bacteriostática a todas las concentraciones de cumarato.

A continuación se presentan un ejemplo de los análisis estadísticos de cumarato de sodio:

Resultados para: *E.coli* O157 Cumarato de sodio

ANOVA unidireccional: Test Testigo, 1%, 0.8%, 0.6%, 0.4%, 0.2%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	5	244.45	48.89	18.97	0.000
Error	36	92.80	2.58		
Total	41	337.25			

S = 1.606 R-cuad. = 72.48% R-cuad.(ajustado) = 68.66%

Nivel	N	Media	Desv.Est.
Test E. COLI 0157	7	7.557	2.512
1%	7	0.571	1.512
0.8%	7	1.920	1.851
0.6%	7	3.821	0.294
0.4%	7	5.506	1.161
0.2%	7	6.057	1.417

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	IC Inferior	IC Superior
Test E. COLI 0157	-----+-----+-----+-----+-----	(-----*-----)
1%	(-----*-----)	
0.8%		(-----*-----)
0.6%		(-----*-----)

Análisis del efecto del cumarato de sodio sobre *E.coli* O157

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en las concentraciones de la sal de 1% y 0.8%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria *E. coli* O157. La concentración 0.6% de la sal no inhibió el crecimiento pero si lo redujo significativamente en comparación con el testigo y las concentraciones de 0.4 y 0.2% no hubo inhibición significativa. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cumarato de sodio sobre *S. Typhi*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en las concentraciones de la sal de 1% y 0.8%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria *S. Typhi*. La concentración 0.6% y 0.4% de la sal no inhibió el crecimiento pero si lo redujo significativamente en comparación con el testigo y las concentración de 0.4 y 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cumarato de sodio sobre *S.Choleraesuis*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal de 1% inhibiendo el crecimiento de la bacteria *S. Choleraesuis*. Las concentraciones 0.8% y 0.6% de la sal, no inhibió el crecimiento pero si lo redujo significativamente en comparación con el testigo y las concentraciones de 0.4 y 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cumarato de sodio sobre *S. Gallinarum*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal de 1% inhibiendo el crecimiento de la bacteria. Las concentraciones 0.8% y 0.6% de la sal, no inhibió el crecimiento pero si lo redujo significativamente en comparación con el testigo y las concentraciones de 0.4 y 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cumarato de sodio sobre *S. aureus*.

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza. No fue inhibida la bacteria. El valor de p-value de la tabla de Anova fue un valor de 0.733, esto indica que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cumarato de sodio sobre *B. cereus*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal de cumarato. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

A continuación se muestran los resultados de los parámetros biológicos con cumarato de sodio:

Cuadro 10.. Parámetros biológicos de cumarato de sodio

A) *E. coli* O157

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	1.87	9.6	9.7
0.2	1.09	7	7.3
0.4	0.33	6.8	6.9
0.6	-0.1	3.3	3.3
0.8	-0.5	-2.5	0
1.0	-0.57	-2.5	0

B) *S. Typhi*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	6.74	9.5	9.6
0.2	2.69	8.2	8.4
0.4	0.55	8.7	7.7
0.6	0.10	4.4	4.2
0.8	-0.35	0.6	0
1.0	-0.36	0.5	0

C) *S. Choleraesuis*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	7.49	8.86	8.9
0.2	7.2	8.1	8.6
0.4	0.99	7.6	8
0.6	0.73	6.9	5
0.8	-0.07	-1.4	0
1.0	-0.17	-1.5	0

D) *S. Gallinarum*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	9.23	9	8.9
0.2	1.6	8.9	8.9
0.4	1.23	8.8	8.8
0.6	-0.08	3.7	3.7
0.8	-0.1	2.85	3
1.0	-0.24	-0.1	0

E) *S. aureus*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	3.28	9.5	9.5
0.2	3.1	9	9.3
0.4	1.2	8.9	8.8
0.6	1.1	8.9	8.5
0.8	1.1	8.5	8.4
1.0	0.26	8	7.7

F) *B. cereus*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	2.2	7.5	7.6
0.2	-0.11	2.7	2.9
0.4	-0.11	2.6	2.8
0.6	-0.12	2.6	2.8
0.8	-0.15	2.4	2.6
1.0	-0.15	2.5	2.5

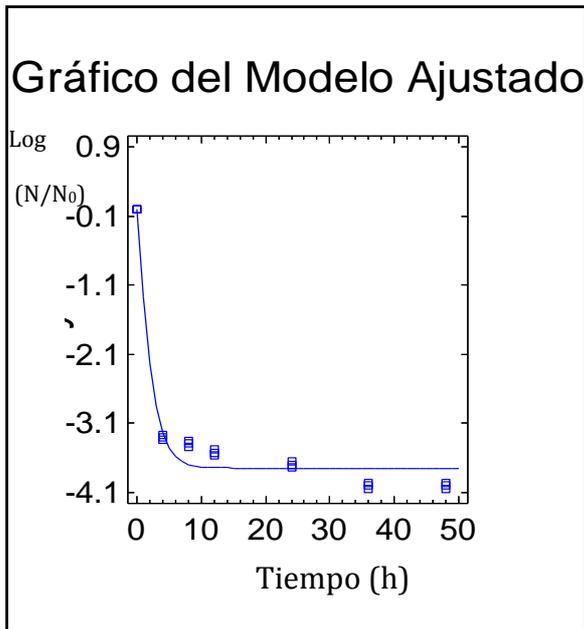
En el caso del cuadro 10 se presentan los resultados con cumarato de sodio, en este caso tiene cierta similitud con los resultados de ferulato de sodio, a las concentraciones de 1% y 0.8% se observan velocidad negativas lo que nos indica la eliminación de la bacteria para la concentración de 0.6% se observó una actividad bacteriostática, para el caso de *S. Gallinarum* se tiene actividad bacteriostática a concentración de 0.8%, para el caso de las bacterias Gram positivas, *S. aureus* no se ve inhibida y para *B. cereus* se observa una actividad bacteriostática. A continuación se presentan las ecuaciones donde hubo mayor inhibición del cumarato de sodio:

Cuadro 11 Ecuaciones de los modelos matemáticos a la concentración de 1% de cumarato de sodio

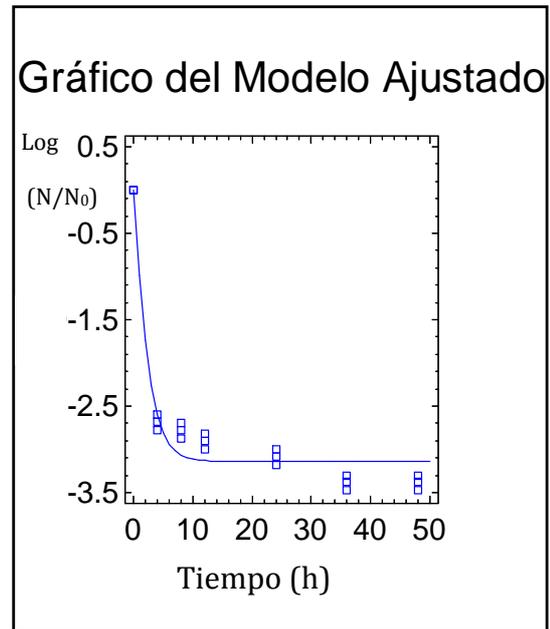
Concentración y Bacteria	Ecuaciones	R ²
Cumarato de sodio 1% con <i>E. coli</i> O157	$y = -5.9 * \exp(-\exp(0.01 + (-0.5 * x))) - (-5.9) * \exp(-\exp(0.01))$	97
Cumarato de sodio 1% con <i>S. Typhi</i>	$y = -3.4 * \exp(-\exp(1.1 + (-0.36 * x))) - (-3.4) * \exp(-\exp(1.1))$	96
Cumarato de sodio 1% con <i>S. Choleraesuis</i>	$y = -4.5 * \exp(-\exp(0.5 + (-0.17 * x))) - (-4.5) * \exp(-\exp(0.5))$	96
Cumarato de sodio 1% con <i>S. Gallinarum</i>	$Y = -4.1 * \exp(-\exp(1.3 + (-0.2 * x))) - (-4.1) * \exp(-\exp(1.3))$	93
Cumarato de de sodio 1% con <i>S. aureus</i>	$Y = 5 * \exp(-\exp(1.3 - 0.05 * x))$	95
Cumarato de sodio 1% con <i>B. cereus</i>	$Y = -0.11 * \exp(-\exp(2 + (-0.15 * x))) - (-0.11) * \exp(-\exp(2))$	92

A continuación se muestran los gráficas obtenidas con los modelos matemáticos.

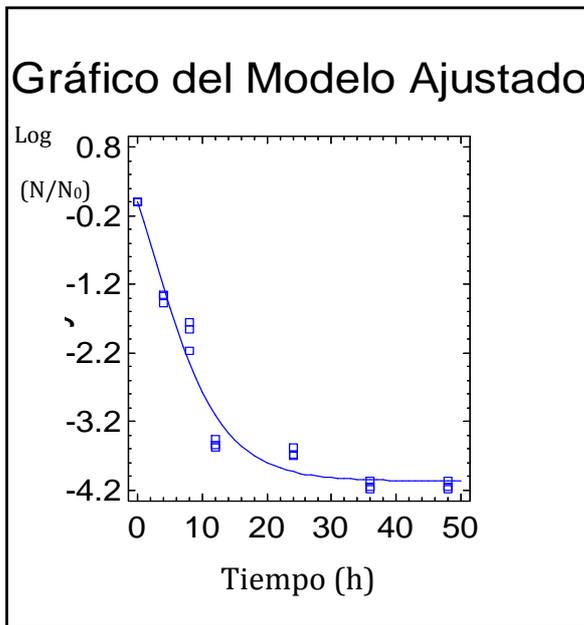
A) *E.coli* O157



B) *S. Typhi*



C) *S. Choleraesuis*



D) *S. Gallinarum*

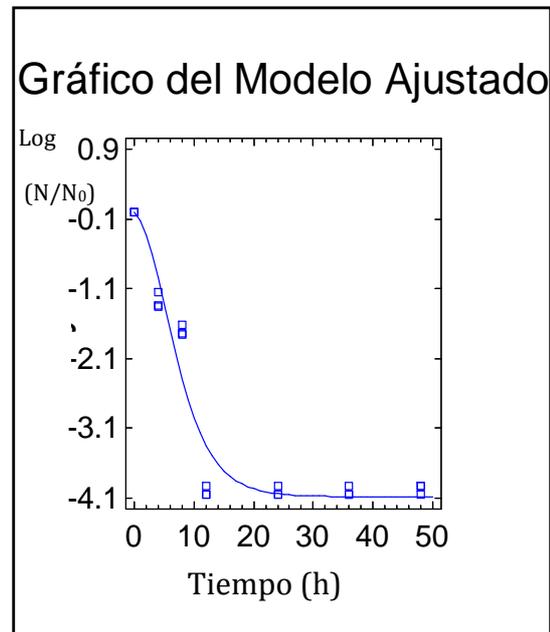
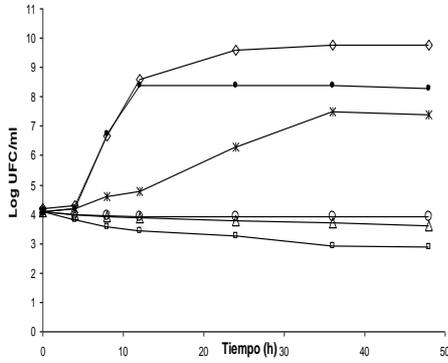


Figura 9 Gráficas que representan el modelo matemático contra los datos experimentales del cumarato de sodio al 1%

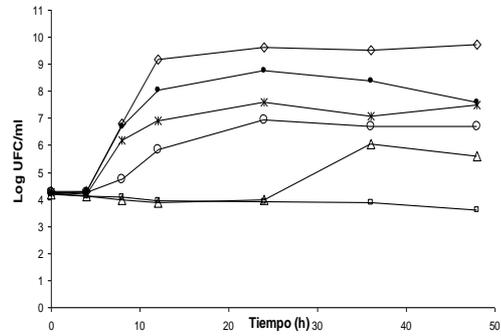
5.6 Efecto del cinamato de sodio

A continuación se presentan los resultados de cinamato de sodio

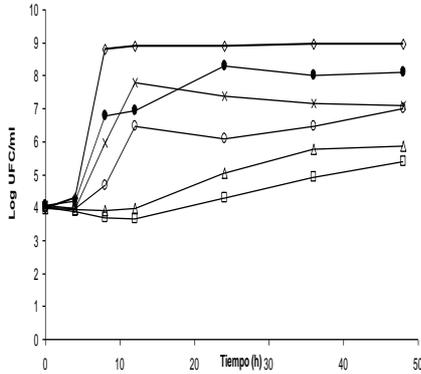
A)



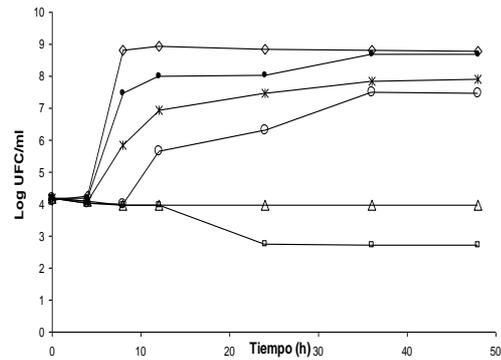
B)



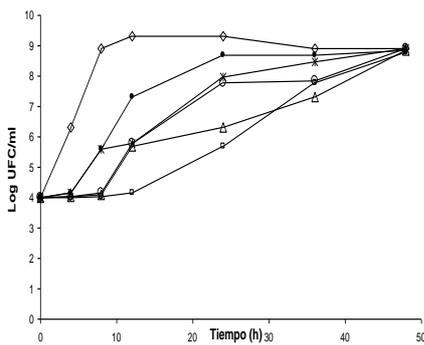
C)



D)



E)



F)

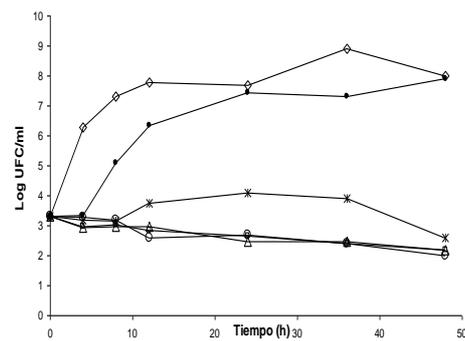


Fig. 10. Cinética de supervivencia de 6 bacterias patógenas expuestas a diferentes concentraciones de cinamato de sodio. (1 % ◻; 0.8 % △; 0.6 % ○; 0.4% ×; 0.2 % ●; control ◇). Las curvas se realizaron por triplicado. A) - *Escherichia coli* O157:H7; B) - *Salmonella Typhi*; C) - *Salmonella Gallinarum*; D) - *Salmonella Choleraesuis*. , E) *S. aureus*, F) *B. cereus*

El t-cinamato produjo una disminución en el máximo crecimiento de las dos bacterias patógenas obteniéndose una diferencia significativa con el testigo desde la concentración de 0.4%, también se pudo observar un efecto bacteriostático a concentraciones más elevadas. En el caso de *E.coli* O157 una inhibición del crecimiento se obtuvo a concentraciones desde 0.6% de la sal del ácido trans-cinámico a diferencia de *Salmonella* Gallinarum en que la concentración mínima para lograr un efecto bacteriostático fue ligeramente mayor a 0.8%, lo que indica una leve diferencia con *E.coli* O157, Para el caso de *S. Typhi* sólo a la concentración de 1% se logró actividad bacteriostática observando en las otras concentraciones un crecimiento de esta bacteria, Para *S. Choleraesuis* se puede observar una actividad bacteriostática a concentración de 1 a 0.8% como se puede ver el la figura 10. Para el caso de *S. aureus*, en las dos primeras doce horas se observó un efecto bacteriostático a las concentración de 1% pero posteriormente la cuenta bacteriana se elevó hasta casi llegar a la concentración del testigo, Para *B. cereus* se observó una actividad bacteriostática en todas las concentraciones por lo que se puede afirmar que evitó en crecimiento de las está bacteria.

Acero et al en 2005, y Kouassi y Shelef en 1998, observaron una disminución de un logaritmo en el número de células de *Listeria monocytogenes* en presencia del ácido cinámico 0.1% a pH 7. En ácido cinámico (mayor o igual al 0.5%, pH 7.0) La actividad antilisteria del ácido cinámico a pH 5 cuando es comparado con los controles acidificados con HCl sugieren que el ión cinamato juega un papel importante en la actividad antilisteria. En el presente trabajo se obtuvo una inhibición de tipo bacteriostático para *E. coli* O157 a concentraciones de 0.6 y 0.8% y la disminución de un logaritmo en concentraciones de 1%. Para *Salmonella* Gallinarum sólo se observó un efecto bacteriostático (se mantuvo el número inicial de células).a la concentración de 1%. Esto indicaría una sensibilidad mayor de bacterias Gram positivas como es *L. monocytogenes* con respecto a la inhibición que obtuvimos con bacterias Gram negativas como son *E.coli* O157 y *S. Gallinarum*. Kouassi y Shelef (1998). Especula que el ácido cinámico, el cual exhibe una reducción en la absorción en la región UV en la presencia de cisteína puede también inhibir a las enzimas que contienen sulfhidrilo de las células microbianas y las enzimas

involucradas en la producción de ATP. Esto podría sugerir una explicación de las diferentes sensibilidades del cinamato en bacterias Gram positivas y Gram negativas, debido a la diferencia en la estructura membranal podrían producir la diferente permeabilidad de este anión, por lo tanto la oportunidad de reaccionar con las enzimas intracelulares involucradas en la producción de ATP es diferente.

El ácido cinámico tiene baja toxicidad, es aceptada un consumo de 1.25 mg/Kg, y está aprobado por la FDA en su uso en alimentos, y tiene una aplicación potencial la sal del ácido t-cinámico en la industria de los alimentos.

Comparando estos datos con la inhibición obtenida con la sal del ácido cinámico claramente se observó que el ferulato y el cumarato es mejor que el cinamato porque con este último sólo se obtiene un efecto bacteriostático aun a las concentraciones más altas.

La obtención del efecto bactericida causado por los ácidos hidroxicinámicos puede estar relacionada con el grupo hidroxilo presente en el ferulato y cumarato y ausente en el cinamato. Los ácidos ferúlico y p-cumarato son derivados del cinámico con un hidroxilo en el anillo bencénico por lo que también son llamados fenólicos y pertenecen al grupo de los hidroxicinámicos. Los compuestos fenólicos tienen una actividad antibacteriana daña la membrana lipídica, provocando que salga el contenido celular. Juven et al (1994) reportaron que la actividad de los compuestos fenólicos afecta la membrana celular de *Samonella Typhimurium* y *S. aureus* y cuando son saturados los sitios de acción se dañan y se colapsa la integridad de la célula microbiana.

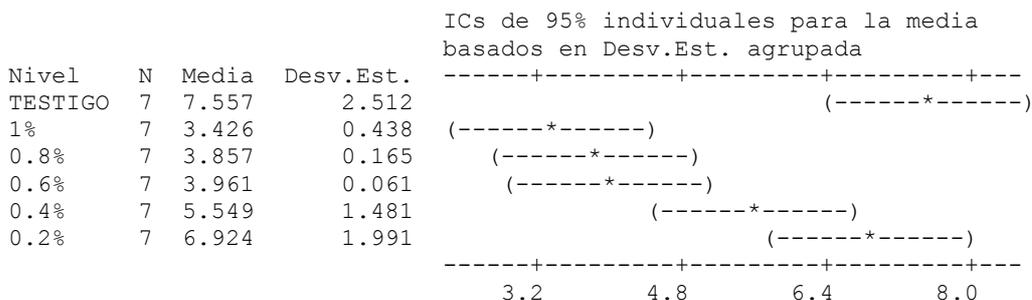
A continuación se presenta un ejemplo del análisis estadístico de cinamato de sodio:

Resultados para: E. coli O157 Cinamato de sodio

ANOVA unidireccional: Testigo, 1%, 0.8%, 0.6%, 0.4%, 0.2%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	5	105.95	21.19	10.02	0.000
Error	36	76.15	2.12		
Total	41	182.10			

S = 1.454 R-cuad. = 58.18% R-cuad. (ajustado) = 52.37%

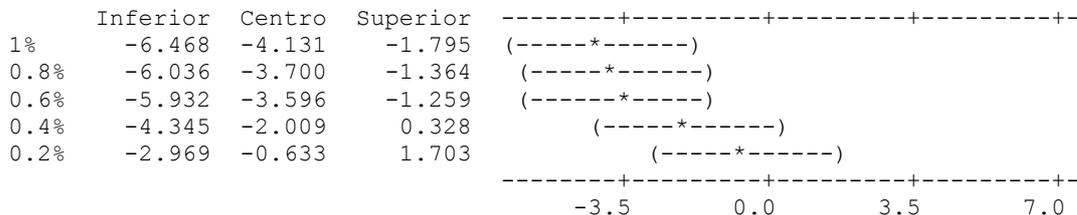


Desv.Est. agrupada = 1.454

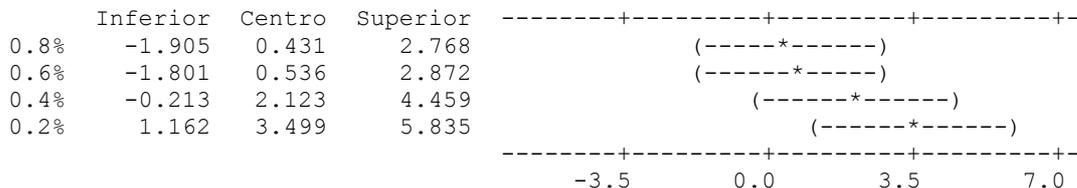
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 99.52%

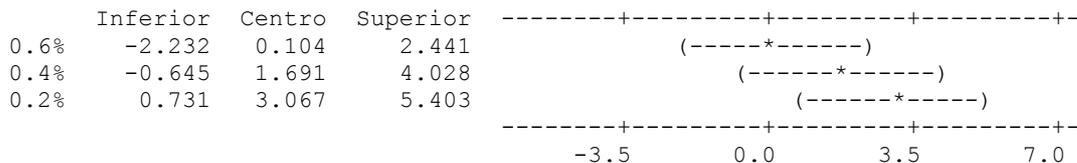
Se restó TESTIGO a:



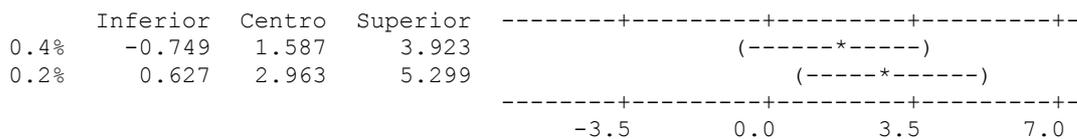
Se restó 1% a:



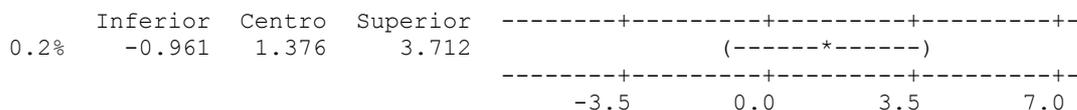
Se restó 0.8% a:



Se restó 0.6% a:



Se restó 0.4% a:



Análisis del efecto del cinamato de sodio sobre *E.coli* O157

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: En todas las concentraciones hubo crecimiento bacteriano pero las que presentaron una inhibición significativa fueron las concentraciones 1%, 0.8% y 0.6%, en las concentraciones 0.4 y 0.2 no hubo inhibición significativa. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cinamato de sodio sobre *S. Typhi*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: En todas las concentraciones hubo crecimiento presentando una mejor inhibición en las concentraciones de 1% y 0.8%. En las demás concentraciones no hubo diferencia significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cinamato de sodio sobre *S. Choleraesuis*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: En todas las concentraciones hubo crecimiento presentando una mejor inhibición en las concentraciones de 1% y 0.8%. En las demás concentraciones no hubo diferencia significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la

tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cinamato de sodio sobre *S. Gallinarum*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: En todas las concentraciones hubo crecimiento presentando una mejor inhibición en las concentraciones de 1% y 0.8%. En las demás concentraciones no hubo diferencia significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es de 0.002, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cinamato de sodio sobre *S. aureus*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza. No fue inhibida la bacteria. El valor de p-value de la tabla de Anova es de 0.284, esto indica que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del cinamato de sodio sobre *B. cereus*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativas entre las concentraciones de la sal de ferulato en las concentraciones de 1% al 0.4%, la concentración del 0.2% no hubo una diferencia significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

A continuación se muestran los parámetros biológicos realizados con cinamato de sodio:

Cuadro 12.. Parámetros biológicos de cinamato de sodio.

A) *E. coli* O157

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	1.87	9.6	9.7
0.2	1.3	8.2	8.2
0.4	0.76	7.9	7.4
0.6	-0.04	3.8	4
0.8	--0.04	3.5	3.7
1.0	--0.04	3.4	3.5

B) *S. Typhi*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	6.74	9.5	9.6
0.2	2	8.1	8.3
0.4	1.5	7.14	7.2
0.6	0.82	6.5	6.6
0.8	0.82	5.7	5.8
1.0	-0.03	3.7	4

C) *S. Choleraesuis*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	7.49	8.8	8.9
0.2	2.67	8.4	8.7
0.4	1.1	7.5	8
0.6	0.34	7.4	7.5
0.8	-0.6	3.5	4
1.0	-0.77	3.5	4

D) *S. Gallinarum*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (CFU/ml)
Testigo	9.23	9	9.9
0.2	1.34	7.95	8.1
0.4	1.3	7.6	7.3
0.6	1.3	7.6	7.3
0.8	0.5	5.8	5.9
1.0	0.13	5.6	5.7

E) *S. aureus*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	3.28	9.1	9.5
0.2	1.3	8.7	8.8
0.4	0.8	8.7	8.8
0.6	0.75	8.3	8.7
0.8	0.36	8.8	8.7
1.0	0.47	8.5	8.7

F) *B. cereus*

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	2.24	7.5	7.5
0.2	1.12	7.4	7.4
0.4	-0.02	2.7	2.8
0.6	-0.03	2.3	2.3
0.8	-0.04	2.5	2.4
1.0	-0.08	2.4	2.3

Como se puede observar en los resultados (cuadro 12) prácticamente no hay una actividad bactericida tanto en microorganismos Gram positivos como en Gram negativos ya que los velocidades de crecimiento son positivas, el microorganismo que se ve más afectado es *B. cereus* ya que las concentraciones que van de 1 a 0.4% presentan una actividad bacteriostática actividad que no se observa en ninguna otra bacteria.

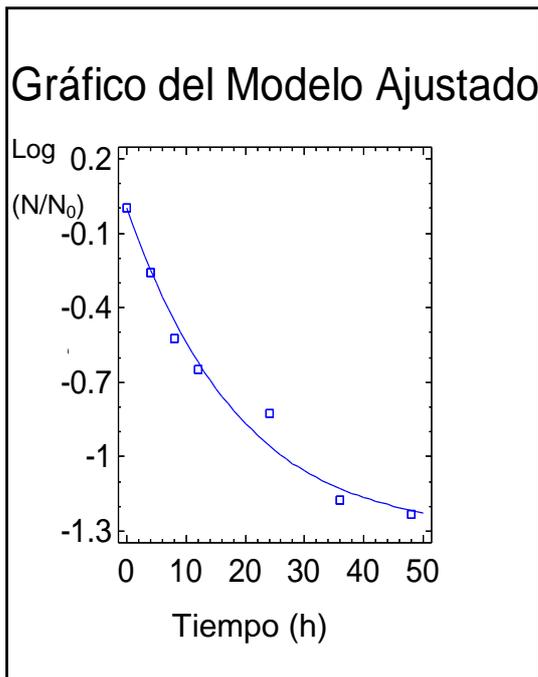
A continuación se muestran las ecuaciones para cinamato donde hubo una mayor actividad antimicrobiana:

Cuadro 13. Ecuaciones de los modelos matemáticos a la concentración de 1% de cinamato de sodio

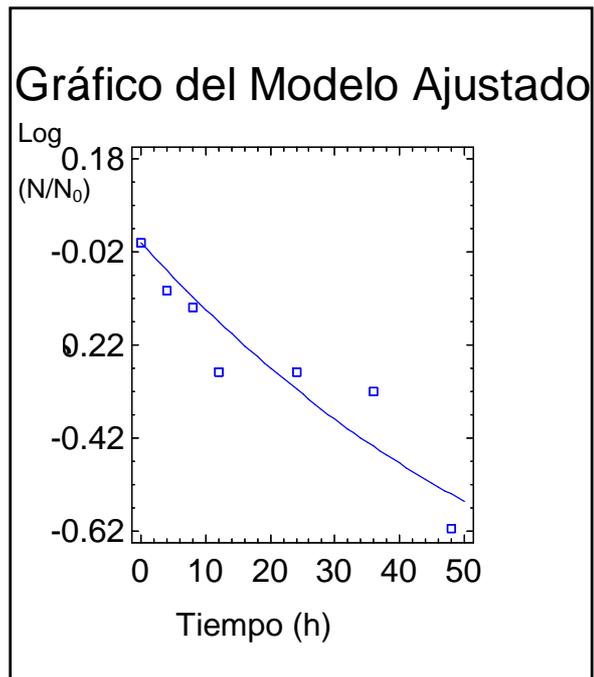
Concentración y Bacteria	Ecuaciones	R ²
Cinamato de sodio 1% con <i>E. coli</i> O157	$y = -0.04 * \exp(-\exp(1.7 + (-0.04) * x)) - (-0.04) * \exp(-\exp(1.7))$	99
Cinamato de sodio 1% con <i>S. Typhi</i>	$y = -0.03 * \exp(-\exp(0.07 + (-0.03) * x)) - (-0.03) * \exp(-\exp(0.07))$	98
Cinamato de sodio 1% con <i>S. Choleraesuis</i>	$y = -1.4 * \exp(-\exp(10 + (-0.7) * x)) - 1.4 * \exp(-\exp(10))$	98
Cinamato de sodio 1% con <i>S. Gallinarum</i>	$Y = 1.6 * \exp(-\exp(3.6 - 0.1 * x))$	97
Cinamato de de sodio 1% con <i>S. aureus</i>	$Y = 5.3 * \exp(-\exp(2.5 - 0.09 * x))$	98
Cinamato de sodio 1% con <i>B. cereus</i>	$y = -1.12 * \exp(-\exp(1.7 + (-0.08) * x)) - (-1.1) * \exp(-\exp(1.7))$	97

A continuación se muestran las gráficas que representan a los modelos matemáticos obtenidos:

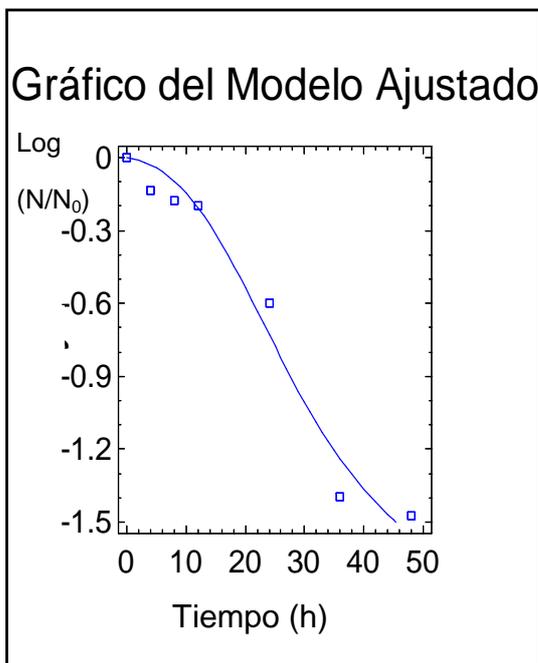
A) *E. coli* O157



B) *S. Typhi*



C) *S. Choleraesuis*



D) *S. Gallinarum*

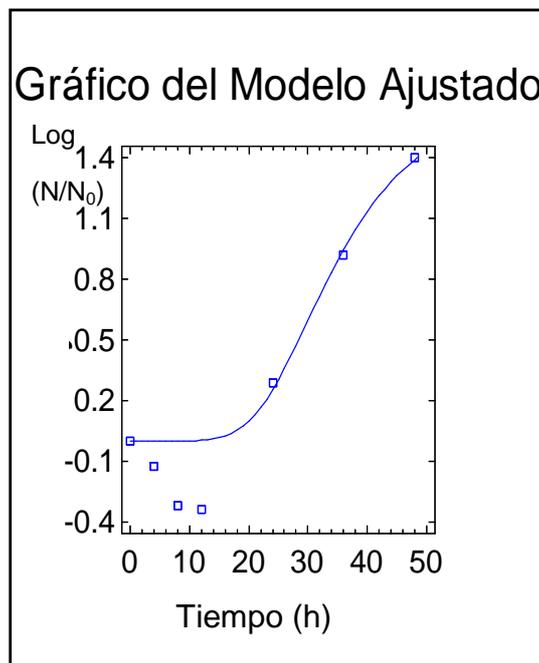


Figura 11 Gráficas que representan los modelos matemáticos contra los datos experimentales del cinamato al 1%

5.7 Efecto del ácido ferúlico y cumárico

A continuación se muestran los resultados del Ácido ferúlico y cumárico

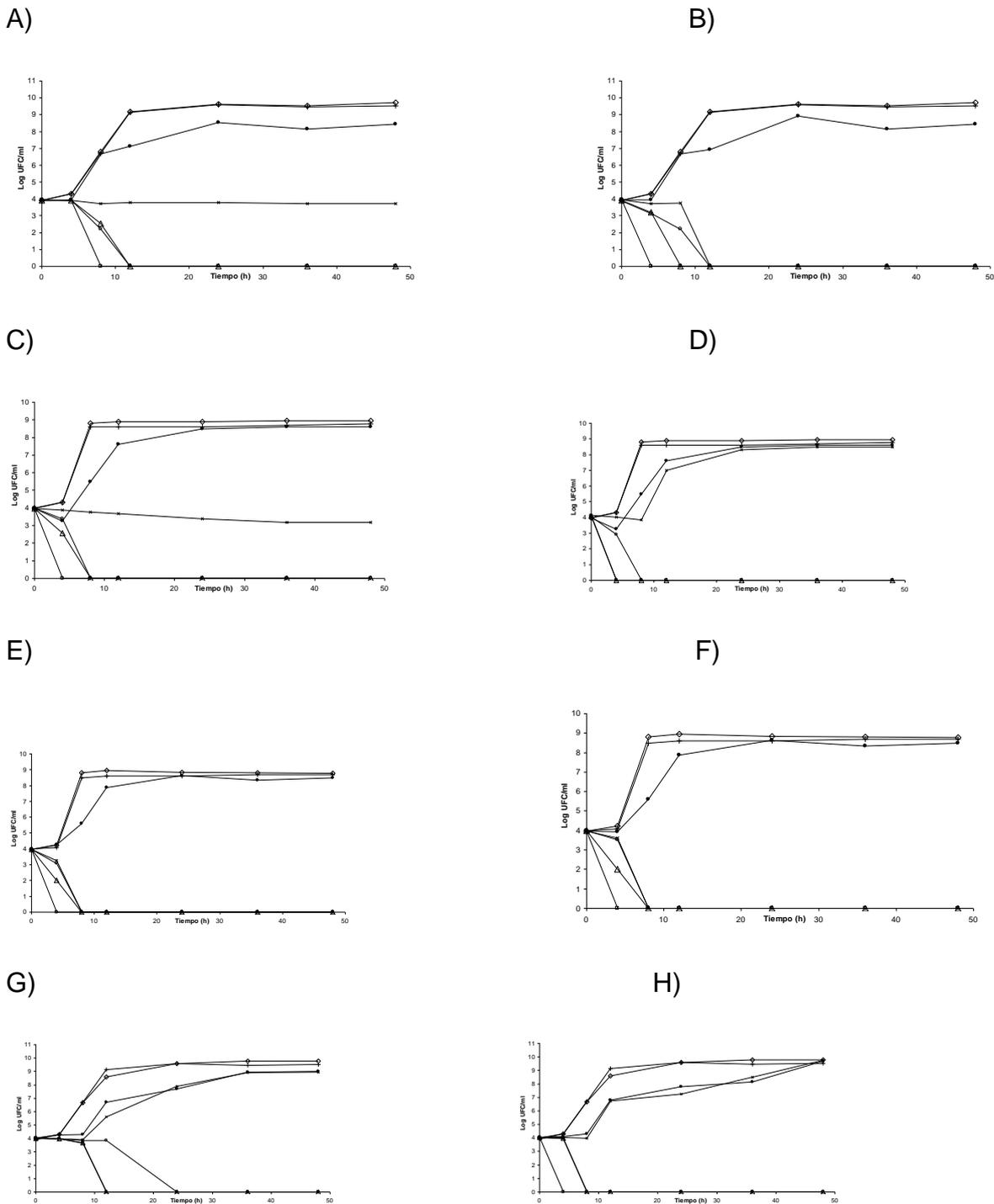


Fig. 12 Cinética de supervivencia de 4 bacterias patógenas expuestas a diferentes concentraciones de ácido ferúlico(af) y ácido p-cumárico(apc). (1 % \square ; 0.8 % \triangle ; 0.6 % \circ ; 0.4% \times ; 0.2 % \bullet ; control \diamond). Las curvas se realizaron por triplicado. A) – *S. Typhi* (af); B) – *S. Typhi* (apc); C) – *S. Gallinarum* (af); D) - *Salmonella Gallinarum* (apc). ,Panel E) *S. Choleraesuis* (af). F) *S. Choleraesuis* (apc), G), *E.coli* O157 (af), H) , *E.coli* O157 (apc),

En la figura 12 se puede observar a *S. Typhi* el ácido ferúlico (panel A) y el ácido p- cumárico (panel B), para el primero se tiene una actividad bactericida a concentraciones de 1 a 0.6% y bacteriostática a la concentración de 0.4%, para el caso del segundo se tiene una concentración bactericida a concentraciones de 1 a 0.4%.

También en la figura 12 esta representado *S. Gallinarum*, en el panel C esta representado el ácido ferúlico que muestra una actividad bactericida a concentraciones de 1 a 0.6% y una actividad bacteriostática a 0.4%, para el caso del ácido p-cumárico (panel D) observamos una actividad bactericida de 1 a 0.8%. Para *S. Choleraesuis* se muestra al ácido ferúlico (panel E) y para el ácido p-cumárico (panel F) una actividad bactericida de 1 a 0.4%. Y finalmente para *E. coli* O157: H7 presenta al ácido ferúlico (panel G) y al ácido p-cumárico (panel H) una actividad bactericida a concentración de 1 a 0.6%.

En los resultados de reto microbiano de los ácidos se puede observar que tienen una actividad bactericida similar en los diferentes microorganismos usados, con la excepción de que el ácido ferúlico presentó actividad bacteriostática a concentración de 0.4% (*S. Typhi* y *S. Gallinarum*) misma que no se vieron en el ácido p-cumárico.

Al comparar los ácidos con las sales se puede observar en forma general un mejor desempeño de los primeros, pero para el caso particular de *E. coli* O157:H7. En ambos casos se tiene una actividad bactericida de 1 a 0.6%.. Además de que los ácidos presentan una insolubilidad en agua.

A continuación se muestra un ejemplo de los resultados realizados en el análisis estadístico:

Resultados para: *E.coli* O157 y ácido ferúlico

ANOVA unidireccional: TESTIGO, 1%, 0.8%, 0.6%, 0.4%, 0.2%

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	5	256.13	51.23	10.23	0.000
Error	36	180.20	5.01		
Total	41	436.33			

S = 2.237 R-cuad. = 58.70% R-cuad. (ajustado) = 52.96%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
TESTIGO	7	7.531	2.554	+-----+-----+-----+-----+
1%	7	1.669	2.085	(-----*-----)
0.8%	7	1.669	2.085	(-----*-----)
0.6%	7	2.238	2.094	(-----*-----)
0.4%	7	6.184	2.345	(-----*-----)
0.2%	7	6.422	2.221	(-----*-----)

+-----+-----+-----+-----+

0.0 2.5 5.0 7.5

Desv.Est. agrupada = 2.237

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 99.52%

Se restó TESTIGO a:

	Inferior	Centro	Superior	
1%	-9.456	-5.862	-2.268	(-----*-----)
0.8%	-9.456	-5.862	-2.268	(-----*-----)
0.6%	-8.888	-5.294	-1.700	(-----*-----)
0.4%	-4.941	-1.347	2.247	(-----*-----)
0.2%	-4.703	-1.109	2.485	(-----*-----)

+-----+-----+-----+-----+

-5.0 0.0 5.0 10.0

Se restó 1% a:

	Inferior	Centro	Superior	
0.8%	-3.594	0.000	3.594	(-----*-----)
0.6%	-3.025	0.569	4.163	(-----*-----)
0.4%	0.921	4.515	8.109	(-----*-----)
0.2%	1.159	4.753	8.347	(-----*-----)

+-----+-----+-----+-----+

-5.0 0.0 5.0 10.0

Se restó 0.8% a:

	Inferior	Centro	Superior	
0.6%	-3.026	0.568	4.162	(-----*-----)
0.4%	0.921	4.515	8.109	(-----*-----)
0.2%	1.159	4.753	8.347	(-----*-----)

+-----+-----+-----+-----+

-5.0 0.0 5.0 10.0

Se restó 0.6% a:

	Inferior	Centro	Superior	
0.4%	0.352	3.946	7.540	(-----*-----)
0.2%	0.591	4.184	7.778	(-----*-----)

+-----+-----+-----+-----+

-5.0 0.0 5.0 10.0

Se restó 0.4% a:

	Inferior	Centro	Superior	
				+-----+-----+-----+-----+



Análisis del efecto del ácido ferúlico sobre *E. coli* O157

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativas entre las concentraciones del ácido de 1%, 0.8% y 0.6%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria *E.coli* O157. Las concentraciones de 0.4 y 0.2% no hubo inhibición significativa. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ácido cumárico sobre *E.coli* O157

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un Nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativas entre las concentraciones del ácido de 1%, 0.8% y 0.6%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria *E. Coli* O157. Las concentraciones de 0.4 y 0.2% no hubo inhibición significativa. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ácido ferúlico sobre *S. Typhi*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativas entre las concentraciones del ácido de 1%, 0.8% y 0.6%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria *S. Typhi*. La concentración 0.4% de la sal, no inhibió el crecimiento pero si lo redujo significativamente en comparación con el testigo y las concentraciones de 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo.El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ácido cumárico sobre S. Typhi

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en las concentraciones de la sal del 1% al 0.4% inhibiendo el crecimiento de la bacteria. Las concentración de 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ácido ferúlico sobre S. Choleraesuis

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en las concentraciones de la sal del 1% al 0.4%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria. Las concentración de 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ácido cumárico sobre S. Choleraesuis

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en las concentraciones de la sal del 1% al 0.4%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria. Las concentración de 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ácido ferúlico sobre S. Gallinarum

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en las concentraciones de la sal del 1% al 0.6%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria. Hubo crecimiento en la concentración de 0.4% pero la bacteria fue inhibida significativamente en comparación con el testigo. Las concentración de 0.2% no hubo inhibición significativa en

comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Análisis del efecto del ácido cumárico sobre *S. Gallinarum*

Al realizar las comparaciones pareadas de Tukey da un nivel de confianza del 99.52% para los intervalos de confianza, dando los siguientes resultados: No existe diferencia significativa en las concentraciones de la sal del 1% al 0.6%, inhibiendo el crecimiento de la bacteria. Las concentraciones de 0.4% y 0.2% no hubo inhibición significativa en comparación con el testigo. El valor de p-value de la tabla de Anova es menor de 0.001, esto indica que si existe diferencia significativa entre las concentraciones de la sal examinadas.

Para las sales de ferulato de sodio las bacterias que se vieron más afectadas fueron los microorganismos Gram negativos ya que la concentración a la cual empezaron a ser afectados fue de 0.6%. Para el caso de cumarato de sodio se presenta el mismo caso todas bacterias Gram negativas son las más afectadas ya que a la concentración de 0.6% empezaron a ser afectadas. En el caso del cafeato de sodio las bacterias que se vieron más afectadas fueron todos los serotipos de *Salmonella* y *S. aureus*, ya que a todas las concentraciones a las que se probaron con este compuesto fueron inhibidas, para el caso del cinamato de sodio la bacteria que se vio más afectada fue *S. Choleraesuis*. En el caso del ácido ferúlico *E. coli* O157 fue la bacteria más afectada con una concentración de inhibición de 0.6%. Finalmente el caso del ácido cumárico *E. coli* O157 y *S. Gallinarum*, fueron las bacterias más afectadas con una concentración mínima de inhibición de 0.6%.

Cuadro 14.. Parámetros biológicos de los ácidos hidroxicinámico (A)

A) *E. coli* O157-a. ferúlico

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	1.87	9.6	9.7
Testigo etanol	9.5	9.6	9.5
0.2	1.5	8.5	9
0.4	0.78	8.8	8.9
0.6	-0.3	0	0
0.8	-0.75	0.25	0
1.0	-0.75	0.25	0

B) *E. coli* O157-a. cumárico

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	1.87	9.6	9.7
Testigo etanol	9.5	9.6	9.5
0.2	1.82	8.52	9.6
0.4	1.4	8.4	9.6
0.6	-0.55	0.2	0
0.8	-3.7	0.2	0
1.0	-3.8	0.2	0

C) *S. Typhi* -a. ferúlico

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	6.74	9.5	9.6
Testigo etanol	6.7	9.5	9.6
0.2	1.5	8.38	8.5
0.4	-0.5	3.9	3.7
0.6	-0.5	0.4	0
0.8	-0.57	0.4	0
1.0	-0.9	0.4	0

D) *S. Typhi* -a-cumárico

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	6.74	9.5	9.6
Testigo etanol	6.7	9.5	9.3
0.2	1.3	8.4	8.9
0.4	-0.60	0.1	0
0.6	-0.63	0.5	0
0.8	-0.63	0.4	0
1.0	-1.52	0.4	0

Cuadro 15. Parámetros biológicos de los ácidos hidroxicinámicos (B)

A) *S. Choleraesuis* -a. ferúlico

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	7.49	8.86	8.9
Testigo etanol	7.4	8.6	8.7
0.2	2.0	8.5	8.6
0.4	-0.62	-0.2	0
0.6	-0.63	-0.4	0
0.8	-0.63	-2	0
1.0	-0.63	-2	0

B) *S. Choleraesuis*-a. cumárico

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	7.49	8.86	8.9
Testigo etanol	7.4	8.6	8.7
0.2	2.18	8.55	8.6
0.4	-0.33	-0.3	0
0.6	-0.33	-0.3	0
0.8	-0.33	-0.3	0
1.0	-0.6	-1.7	0

C) *S. Gallinarum*-á. ferúlico

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	9.23	9	8.9
Testigo etanol	7.17	8.7	8.6
0.2	1.85	8.58	8.6
0.4	-0.09	3.06	3.1
0.6	-0.37	0.33	0
0.8	-0.47	0.19	0
1.0	-0.57	-2.95	0

D) *S. Gallinarum*-á. cumárico

Porcentaje del compuesto	Velocidad de crecimiento o muerte (h ⁻¹)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte Teórico log N (UFC/ml)	Valor máximo de crecimiento o mínimo de muerte experimental log N (UFC/ml)
Testigo	9.23	9	8.9
Testigo etanol	7.17	8.7	8.6
0.2	1.96	8.63	8.6
0.4	0.66	8.42	8.4
0.6	-0.55	0.2	0
0.8	-0.58	-2.9	0
1.0	-0.58	-2.97	0

Como se puede observar en los cuadros 14 y 15, existe una mayor cantidad de velocidades negativas con respecto a las sales, debido a que presentan una mayor actividad antimicrobiana con la desventaja de que los ácidos presentan menos solubilidad en medio acuoso y se les tuvo que adicionar etanol para mejorar su solubilidad.

A continuación se muestran algunas ecuaciones del ácido ferúlico y ácido p-cumárico donde hubo mayor inhibición:

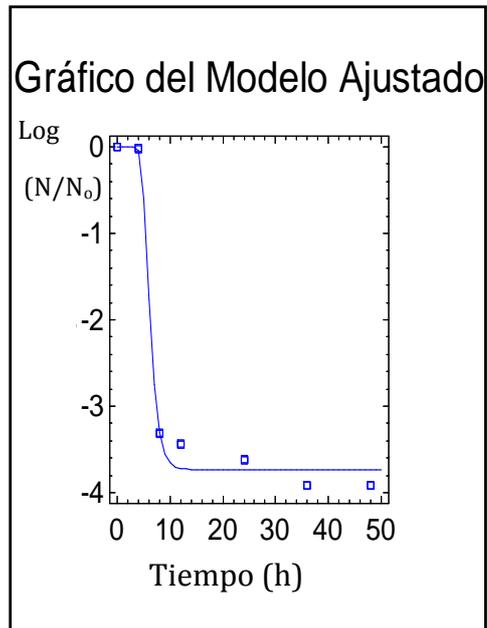
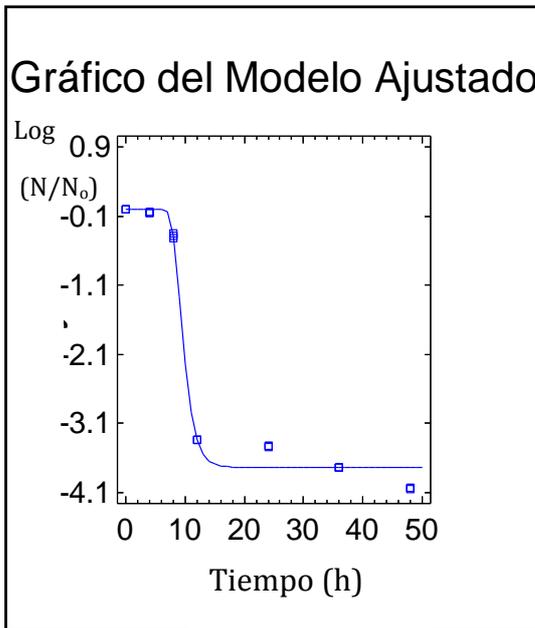
Cuadro 16. Ecuaciones de los modelos matemáticos a la concentración de 1% de los ácidos hidroxicinámicos

Concentración y Bacteria	Ecuaciones	R ²
Ácido ferúlico 1% <i>E.coli</i> O157	$Y = -3.7 \cdot \exp(-\exp(6 + (-0.75 \cdot x))) - 3.7 \cdot \exp(-\exp(6))$	99
Ácido cumárico <i>E.coli</i> O157	$Y = -3.7 \cdot \exp(-\exp(4 + (-3.7 \cdot x))) - (-3.7) \cdot \exp(-\exp(4))$	99
Ácido ferúlico <i>S. Typhi</i>	$Y = -3.7 \cdot \exp(-\exp(5 + (-0.9 \cdot x))) - (-3.7) \cdot \exp(-\exp(5))$	99
Ácido cumárico <i>S. Typhi</i>	$Y = -3.9 \cdot \exp(-\exp(4 + (-1.5 \cdot x))) - (-3.9) \cdot \exp(-\exp(4))$	99
Ácido ferúlico 1% <i>S. Choleraesuis</i>	$Y = -5.4 \cdot \exp(-\exp(0.3 + (-0.63 \cdot x))) - 5.4 \cdot \exp(-\exp(0.3))$	98
Ácido cumárico 1% <i>S. Choleraesuis</i>	$Y = -4.4 \cdot \exp(-\exp(0.6 + (-0.59 \cdot x))) - (-4.4) \cdot \exp(-\exp(0.6))$	97
Ácido ferúlico 1% <i>S. Gallinarum</i>	$Y = -5.9 \cdot \exp(-\exp(0.2 + (-0.57 \cdot x))) - (-5.9) \cdot \exp(-\exp(0.2))$	97
Ácido cumárico 1% <i>S. Gallinarum</i>	$Y = -5.9 \cdot \exp(-\exp(0.2 + (0.58 \cdot x))) - (-5.9) \cdot \exp(-\exp(0.2))$	97

A continuación se muestran las gráficas obtenidas de los modelos matemáticos:

A) ácido ferulico *E. coli* O157

B) ácido ferúlico *S. Typhi*



C) ácido cumárico *S. Choleraesuis*

C) ácido cumárico *S. Gallinarum*

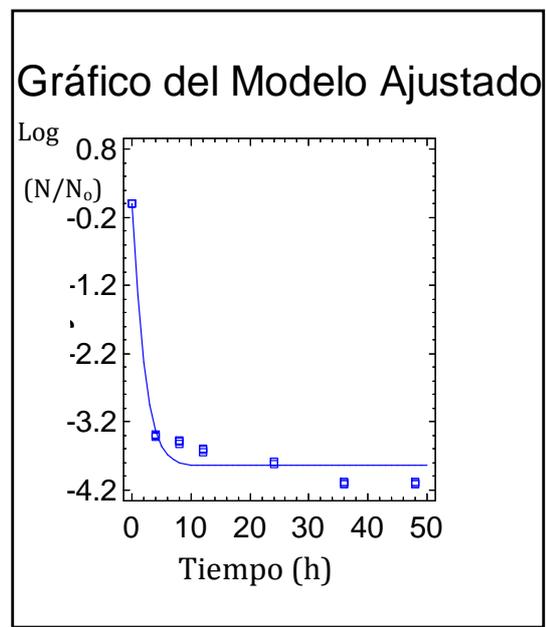
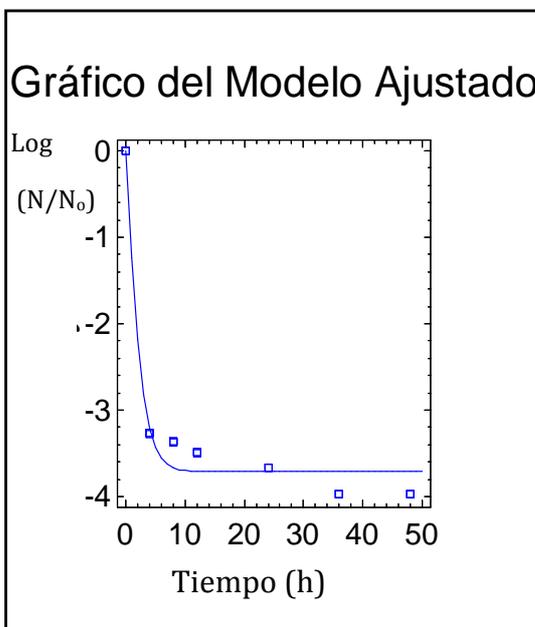


Figura 13 Gráficas de los modelos matemáticos contra los datos experimentales de los ácidos hidroxicinámicos al 1%

5.8 Evaluación de los daños y cambios morfológicos en la ultraestructura de las bacterias *E. coli* O157, *Salmonella Gallinarum* y *S. aureus*

A continuación se presentan las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión, en las que se pueden apreciar las alteraciones morfológicas de *E.coli* O157 (figura 14,15) causadas por el cumarato, en dos concentraciones, y *Salmonella Gallinarum* con ferulato (figura 16,17,18) y *S. aureus* con cafeato (figura 19) y ferulato (figura 20).

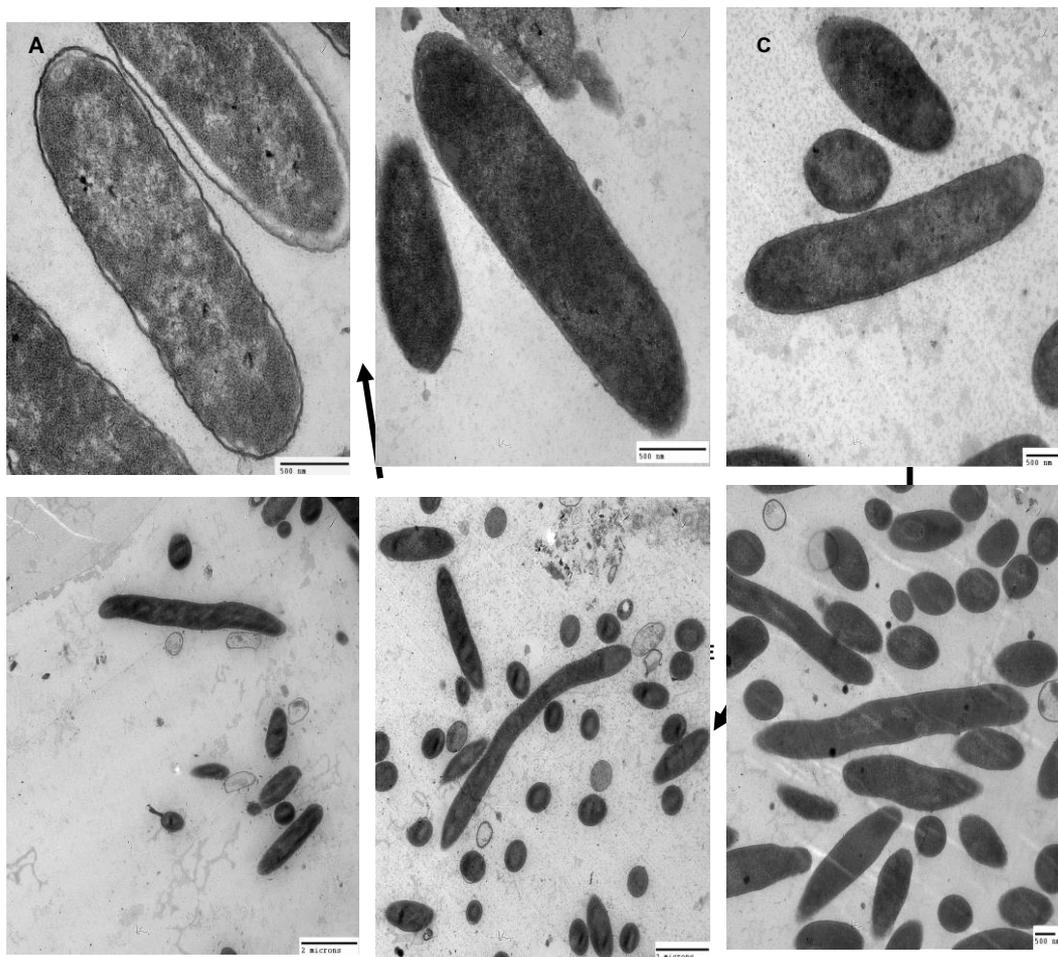


FIGURA 14. Micrografías electrónicas de transmisión de *E. coli* O157 creciendo en presencia de cumarato al 0.6 % en caldo soya tripticaseína. En el testigo negativo se aprecian las membranas externa e interna integra, sin pérdida de continuidad, y el citoplasma homogéneo (A). Aumento de densidad electrónica en el citoplasma (B). Existe muerte celular (células con citoplasma vacío) y persiste el aumento de la densidad citoplasmática (C y E). Se observa alargamiento celular de hasta 9 micras y persiste la muerte celular (F). En la figura A, B, C y F la barra corresponde a 500 nm mientras que en las figuras E y F el valor es de 2 micrones.

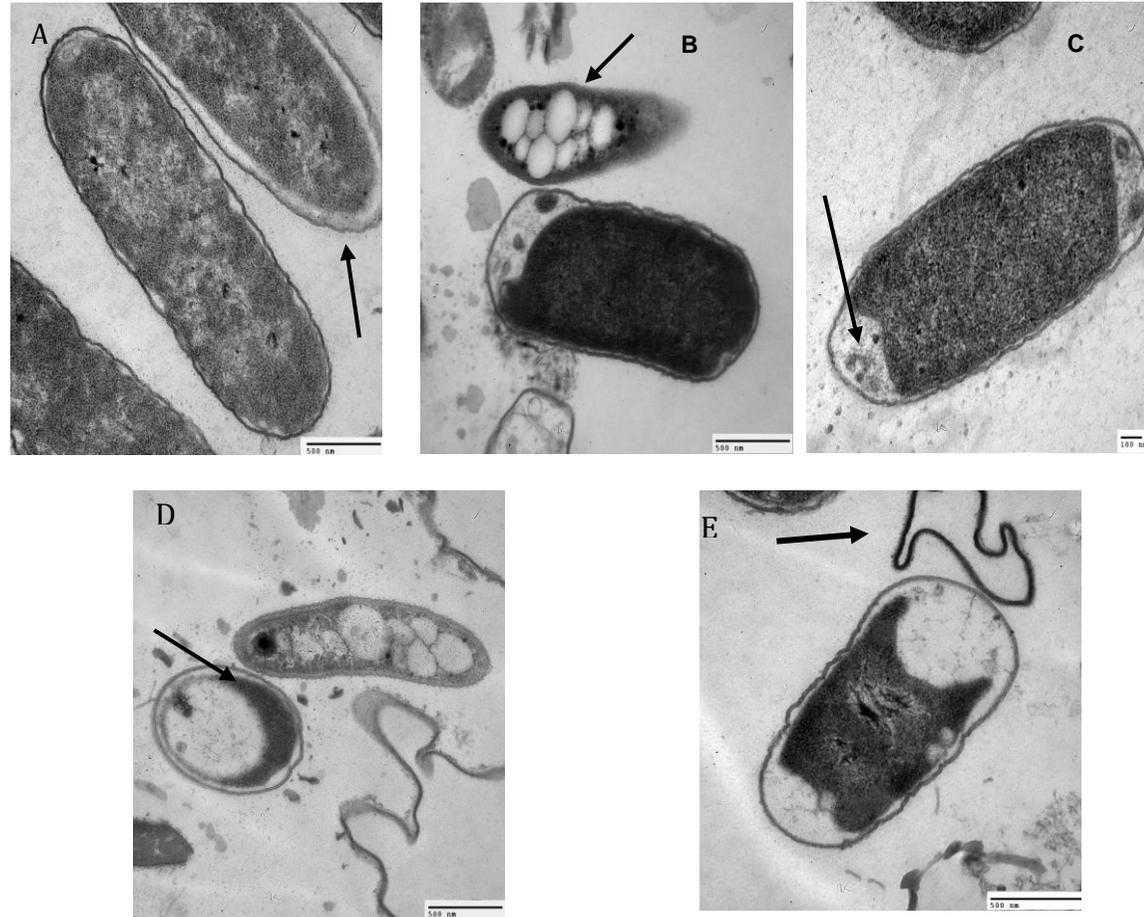


FIGURA 15. Micrografías electrónicas de transmisión de *E. coli* O157 creciendo en presencia de cumarato al 1 % en caldo soya tripticaseína. En comparación con el testigo negativo (A), las células presentan contracción en membrana interna y externa originando espacios intermembranales aumentados en los extremos de la bacteria, además ocurre un fenómeno en algunas otras células que se describe como vacuolización (B Y C). Existen fenómenos de degradación citoplasmática y persiste la vacuolización (D). Se observan restos membranales lo que es indicativo de muerte celular (E). En las figuras A ,B, D y E, el valor de la barra corresponde a 500 nm, mientras que en la figura C el valor es de 100 nm.

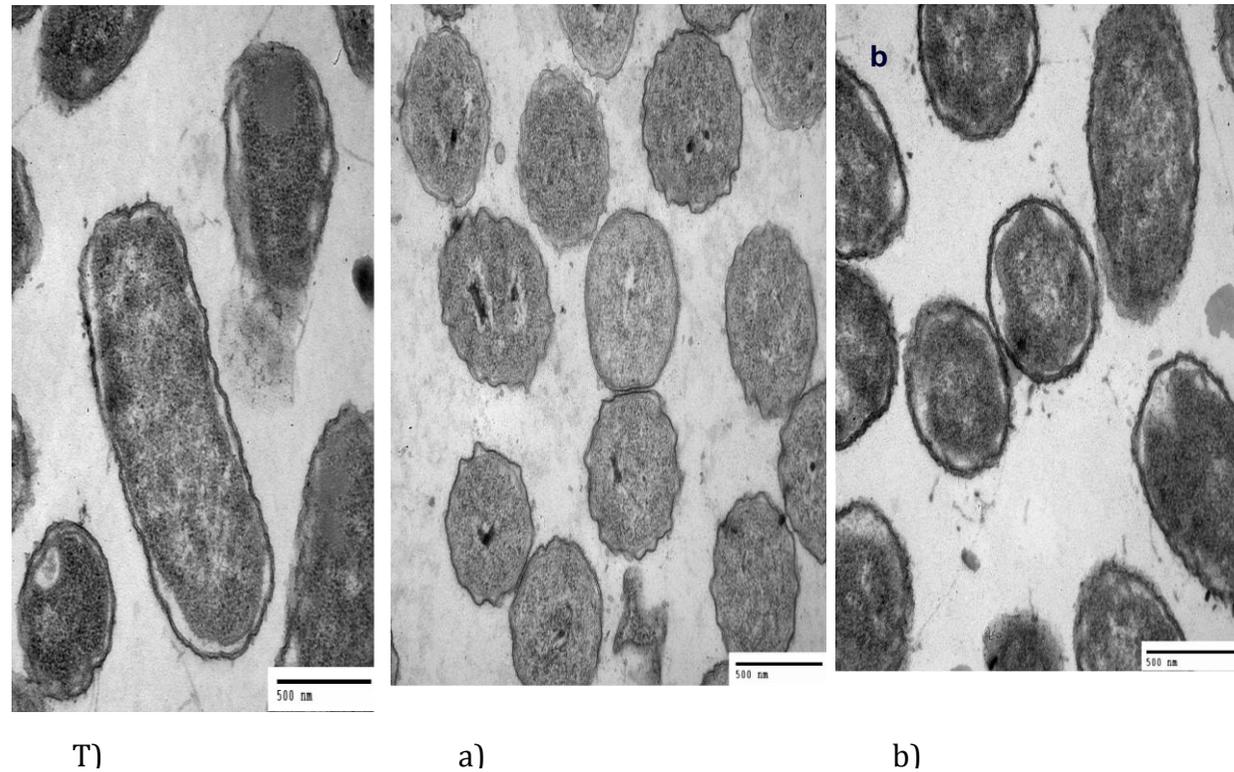
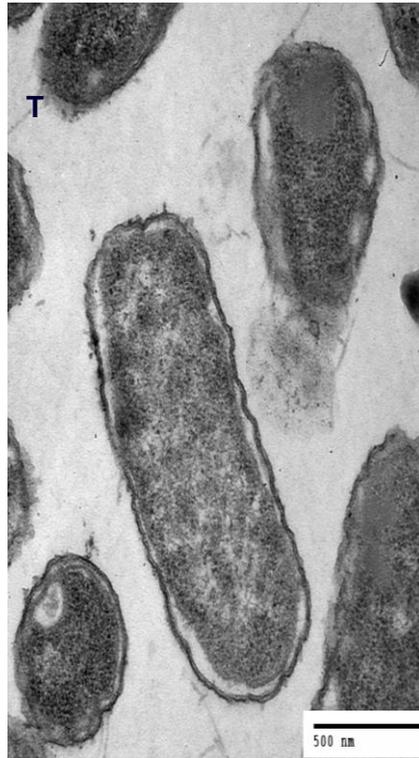
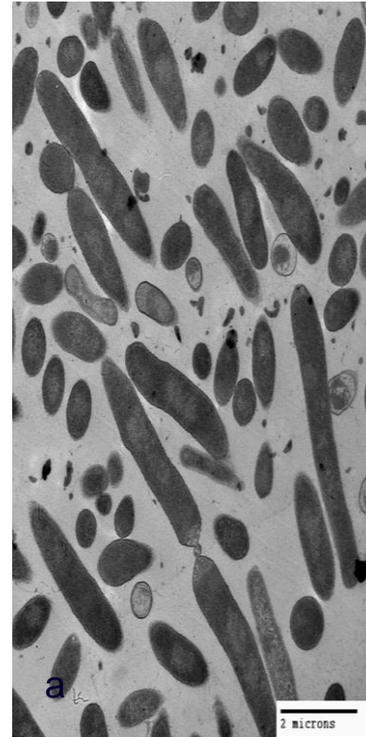


Figura 16. Micrografías electrónicas de transmisión de *Salmonella Gallinarum* crecida en TSA con ferulato a una concentración de 0.2%. En el testigo (T) se observan estructuras de lamina propia intactas, en 2 horas se observa alteración en la morfología típica del bacilo Gram negativo, sobre todo existe un efecto sobre la membrana de la bacteria (a), que se conserva hasta las 4 horas de incubación. En las figuras T, a y b el valor de la barra corresponde a 500 nm.



T)



a)



b)

Figura 17. Micrografías electrónicas de transmisión de *Salmonella Gallinarum* crecida en TSA con ferulato a una concentración de 0.6%. Se observan tanto en a) como en b) un evidente fenómeno de “alargamiento celular”, que puede alcanzar hasta las 10 micras de longitud, a las 4 horas de incubación. Aumento de 10 000 x. En la figura T el valor de la barra corresponde a 500 nm, mientras que en la figura a y b es de 2 micrones.

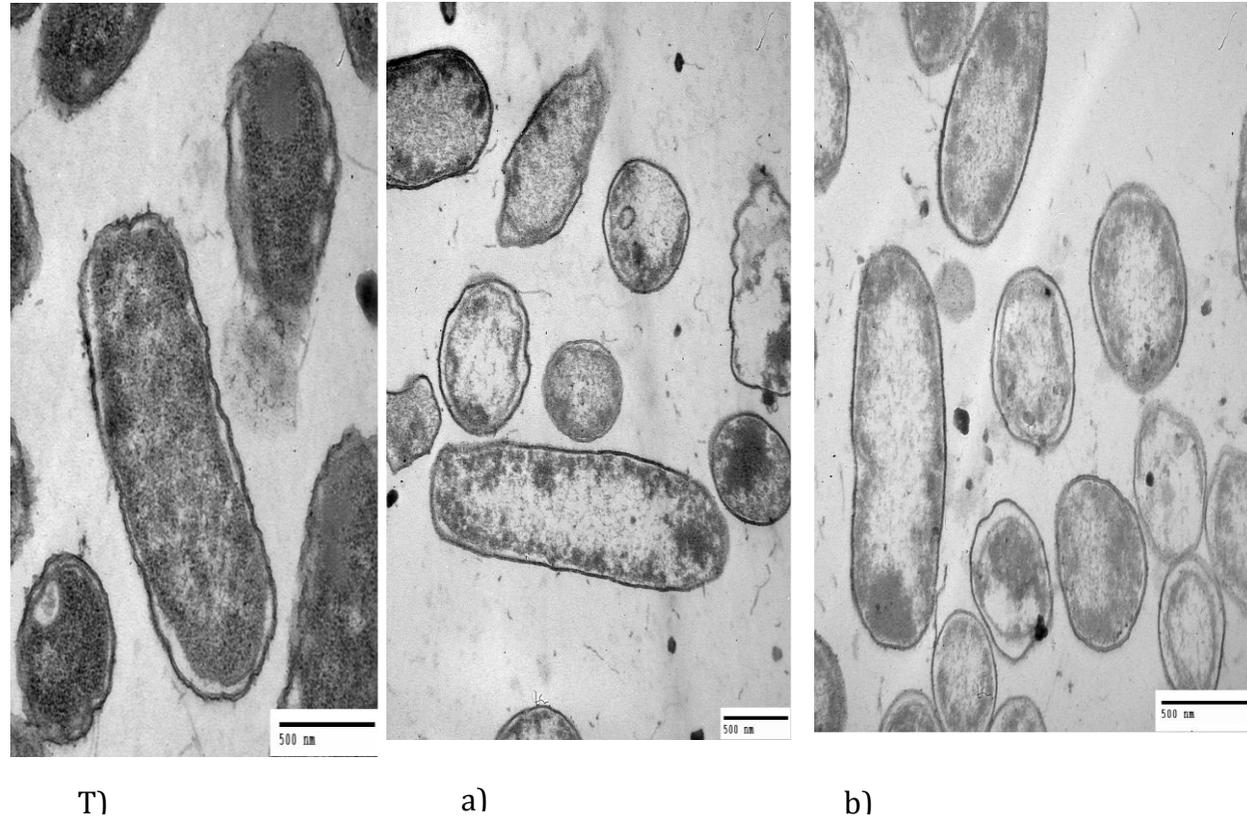


Figura 18. Micrografías electrónicas de transmisión de *Salmonella Gallinarum* crecida en TSA con ferulato a una concentración de 1%. . En el testigo (T) se observan estructuras de lamina propia intactas, en 2 horas se observa un evidente citoplasma vacío en la mayoría de las células, lo que denota una marcada muerte celular (a), a las 4 horas persiste el efecto bactericida pues se observan células muertas en gran cantidad (b). En la figura T el valor de la barra corresponde a 500 nm, mientras que en las figuras a y b en valor es de 2 micrones.

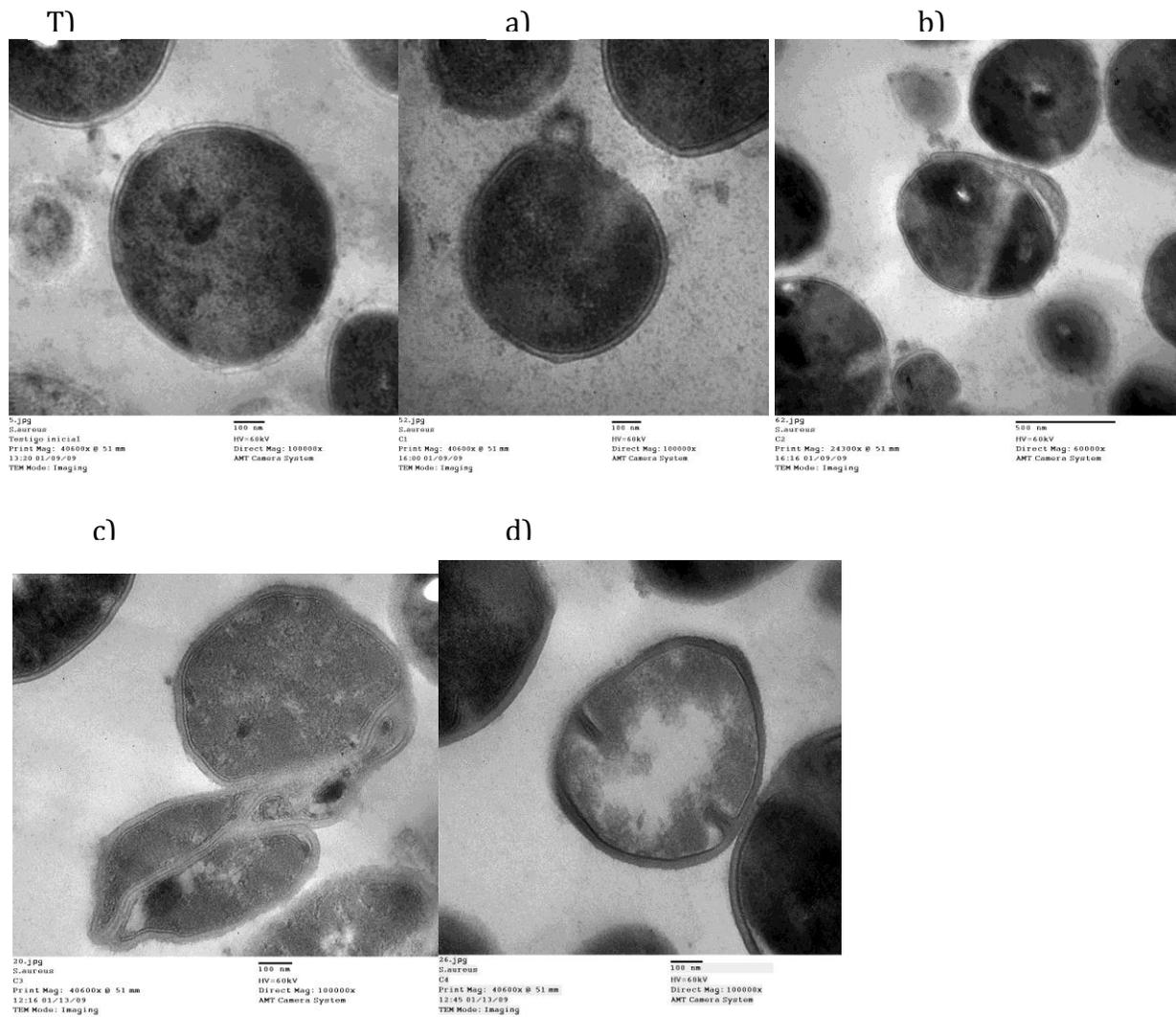


Figura 19. Micrografía de *S. aureus* con cafeato a una concentración de 0.8%. A: Se ven alteraciones en la membrana a los 15 minutos con pérdida de la forma en comparación con el testigo (T). **B:** Se distinguen las bacterias con deformaciones en la membrana a los 30 minutos. **C:** A los 45 minutos se presentan uniones anormales entre las células. **D:** A partir de 1 hora de incubación se observan bacterias en proceso de degradación. En las figuras T, a, c y d, el valor de la barra corresponde a 100 nm y en la figura b corresponde a 500 nm,

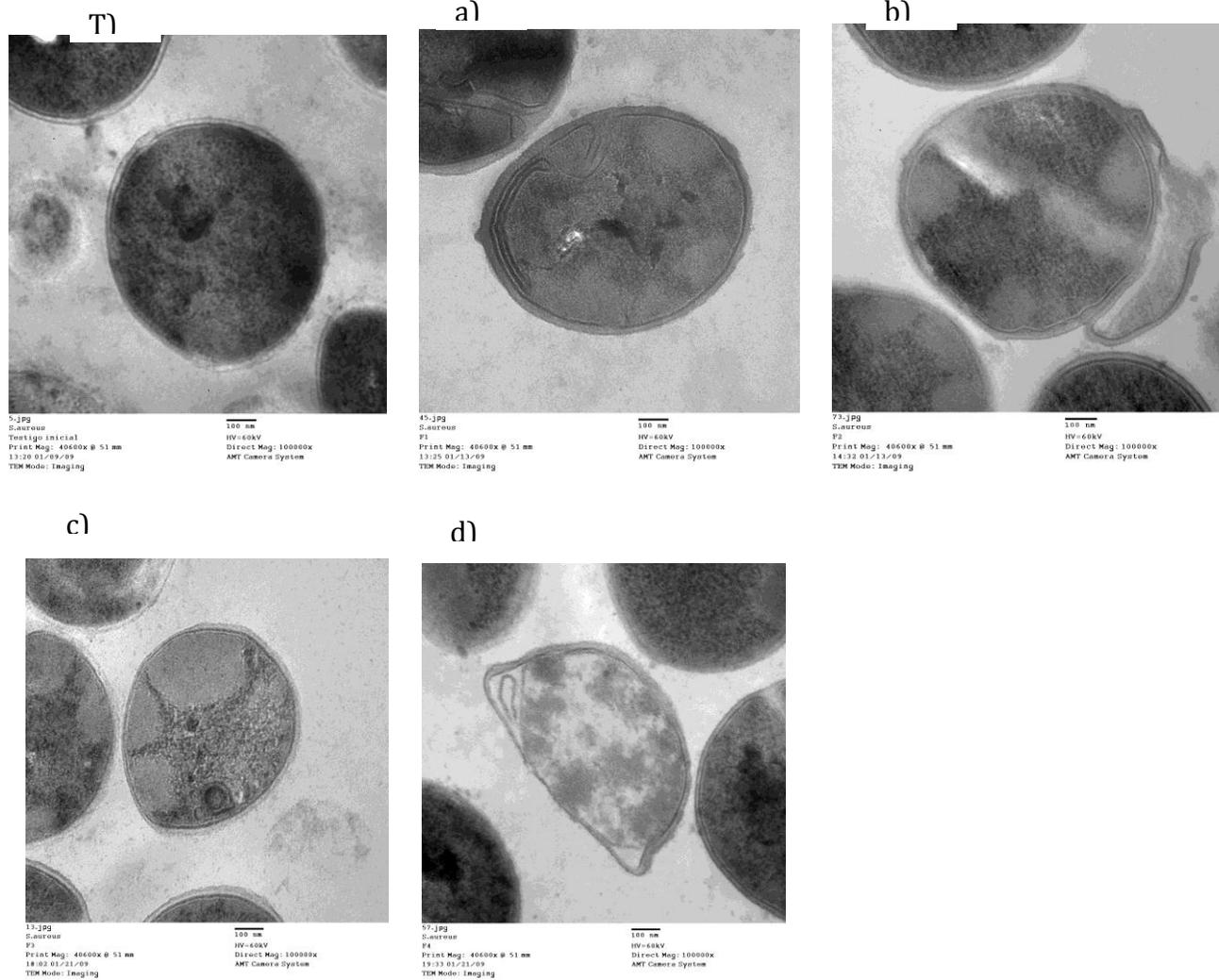


Figura 20. Micrografía de *S. aureus* con ferulato a una concentración de 0.8%. A: Se observan alteraciones en la membrana interna con pérdida de la forma en comparación con el testigo (T). B: A los 30 minutos se altera la forma característica de coco y la membrana celular forma pliegues. C: Se aprecia degradación del citoplasma. D: A partir de 1 hora de incubación se observan bacterias en proceso de degradación y pérdida de forma. En las figuras T, a, b, c, d el valor de la barra corresponde a 100 nm.

En la figura 14 se muestra *E. coli* O157 creciendo en ausencia y presencia de ácido p-cumárico al 0.6 % en caldo soya tripticaseína. En el testigo negativo (A) se apreciaron las membranas externa e interna integras, sin pérdida de continuidad, y el citoplasma homogéneo. A las 4 horas (B) se observó un aumento en la densidad electrónica del citoplasma y de las membranas, el cual se mantuvo durante todo el tiempo de incubación. A partir de las 6 horas (D y E) se observaron células vacías lo cual fue indicativo de muerte celular, sin embargo se distinguieron células (C, D y E) con las características observadas a las 4 horas, además de alargamiento celular. Estas células tendieron a alargarse, llegando a adquirir longitudes de hasta 9 micrómetros a las 24 horas. En este tiempo no se observaron células muertas y sí una gran cantidad de bacterias alargadas, este cambio morfológico puede ser indicativo de activación de mecanismos de adaptación. En (F) se puede observar otro campo en el que se muestra la abundancia de células alargadas.

Cuando *E. coli* O157 fue retada a concentración del 1% se observó un efecto bactericida. Las micrografías tomadas después de 2 y 6 horas de incubación (Figura 15: B, C, D, E y F) mostraron una contracción de la membrana interna y su contenido, originando un espacio intermembranal grande, principalmente en los extremos de la bacteria, que se acentuó conforme transcurrió el tiempo; también se observaron bacterias con formación de vacuolas en el citoplasma, cabe destacar que en las células en las que se formaron estas vacuolas, no se apreció una modificación aparente en la estructura trilaminar propia de las bacterias Gram negativas (B y C). A las 8 horas el contenido citoplasmático se observó menos denso, lo que nos hizo suponer que se presentaron procesos de degradación; este fenómeno se presentó tanto en las bacterias vacuolizadas como en aquellas donde se contrajo la membrana interna (D), también se pudieron apreciar una gran cantidad de restos membranales, lo cual fue indicativo de muerte celular (E).

En la figura 16 en la cual se muestra la sal del ácido ferúlico a concentración de 0.2% con *Salmonella Gallinarum*, en el cual se observa el testigo con toda su estructura celular intacta, posteriormente a la concentración de 0.2% se pueden observar algunos efectos sobre la membrana de la bacteria. En la figura 17 también se puede observar el mismo fenómeno que sucede con

Escherichia coli O157 el cual es un alargamiento de la bacteria que al parecer es un mecanismo de supervivencia de la bacteria. En la figura 18 se observa la muerte de las bacterias, por efecto de las sal de ácido ferúlico al 1%, Se puede observar que el contenido celular de la bacteria a salido de está, ya que en la micrografía se puede observar en la parte exterior de las células. Para el caso de *S. aureus* en presencia de Cafeato de sodio al 1%(figura 19) se puede observar a los 15 minutos empieza haber una deformación de la célula con respecto al testigo, a partir de los 30 minutos ya se empieza a observar deformación en la membrana, a los 45 minutos se ven uniones anormales entre las células y a la hora se ve un franco proceso de degradación. Para el caso de ferulato de sodio al 1% en presencia de *S. aureus* ,(figura 20) también a los 15 minutos se observa una pérdida de forma en comparación del testigo, a los 30 minutos se altera la forma característica del coco y se observó la degradación del citoplasma, y a partir de la hora se observó el proceso de degradación.

Estos daños morfológicos de alargamiento de las células en concentraciones para dar un efecto bacteriostático sobre *E.coli* O157 fue observada cuando se probó concentraciones muy altas de cloruro de sodio. Los resultados apoyan la teoría de un daño a la membrana de las células bacterianas, produciendo alteraciones en la permeabilidad y fuga del contenido celular. La menor actividad antibacterial del cinamato, y la mayor inhibición producida por el cafeato, apoyarían la importancia de los grupos hidroxilo unidos al anillo bencénico de los ácidos hidroxicinámicos, para lograr una actividad antibacterial con menor concentración del compuesto activo. Sin embargo, debe puntualizarse que los ácidos hidroxicinámicos todavía no se permiten como aditivos en alimentos.

Sin embargo, sabemos que varios de alimentos de origen vegetal contienen cantidades importantes de estos compuestos y han sido ingeridos por los humanos, por mucho tiempo, sin presentar toxicidad.

Por otro lado, varios autores reportan que el extracto de *Capsicum annum* inhibiendo el crecimiento de bacterias en alimentos. Martinez et al (2006) encontró que con 5% de *Capsicum* en carne de cerdo previene en crecimiento microbiano. Careaga et al (2002) inactiva a *Salmonella* Thypimurium en carne

con 3% de extracto de *Capsicum annuum* combinado con refrigeración. Acero et al (2005) inhibe a *Listeria monocytogenes* en leche, utilizando el 5% de extracto de *Capsicum* a pH de 5.5. Dorantes et al (2000) y Acero (2005) atribuye el efecto antibacteriano de extractos de chile al contenido de ácido cinámico e hidroxicinámicos.

5.9 Efecto de la constante dieléctrica en la obtención de los extractos de chile

A continuación se muestran los diferentes resultados que se obtuvieron en las pruebas de reto microbiano con dos especies de chile así como los resultados de las pruebas de reto microbiano utilizando diferentes disolventes y concentración de sal, para finalmente observar la pruebas realizada con 2 sales sódicas aplicadas a un alimento real.

Cuadro 17. Pruebas de reto microbiano con extracto de chile serrano.

Extracto al 50%	<i>L. monocytogenes</i> UFC/ml	<i>E.coli</i> O157 H:7 UFC/ml	<i>S,Typhi</i> UFC/ml	<i>S. Typhimurium</i> UFC/ml	<i>S.Gallinarum</i> UFC/ml	<i>S. aureus</i> UFC/ml
Inoculo	800	800	500	600	1000	1000
24h	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000
Extracto al 75%	<i>L. monocytogenes</i> UFC/ml	<i>E.coli</i> O157 H:7 UFC/ml	<i>S,Typhi</i> UFC/ml	<i>S. Typhimurium</i> UFC/ml	<i>S.Gallinarum</i> UFC/ml	<i>S. aureus</i> UFC/ml
Inoculo	700	600	600	700	800	900
24h	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000

Cuadro 18. Pruebas de reto microbiano con Chile guajillo utilizando como agente extractor agua con *S.Typhi*.

	20%Extracto	10%Extracto	5%Extracto	2.5%Extracto	1.25%Extracto
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
Inoculo	500	800	900	800	900
24h	0	0	700	1800	5400

Cuadro 19 Resultados microbiológicos de extractos de chile guajillo obtenidos con diferentes disolventes utilizando S. Typhi.

Etanol	20%Extracto UFC/ml	10%Extracto UFC/ml	5%Extracto UFC/ml	2.5%Extracto UFC/ml	1.25%Extracto UFC/ml
inoculo	400	650	400	800	350
24h	0	0	0	0	5100
Metanol	20%	10%	5%	2.5%	1.25%
inoculo	400	300	550	500	400
24h	0	0	0	0	8300
Isopropanol	20%	10%	5%	2.5%	1.25%
inoculo	400	300	400	450	450
24h	0	0	0	0	300

Se puede observar en los cuadros que los extractos que se obtuvieron con los disolventes tienen un mayor impacto en el efecto antimicrobiano ya que a concentraciones de 2.5% se tiene una actividad antimicrobiana, y a la concentración de 1.25% se pueden observar ciertas diferencias entre los extractos, el que mejor impacto tiene fue el de isopropanol (cuadro 19). Además de que el chile serrano no tuvo ningún tipo de actividad comparado con el chile guajillo que presenta actividad con las diferentes soluciones extractoras.

5.10 Efecto de la fuerza iónica en la obtención de los extractos de chile

A continuación se presentan los resultados obtenidos al adicionar diferentes concentraciones de cloruro de sodio:

Cuadro 20. Resultados microbiológicos de extracto de chile guajillo utilizando diferentes concentraciones de Cloruro de sodio usando S. Typhi

Sal 1%	20%Extracto UFC/ml	10%Extracto UFC/ml	5%Extracto UFC/ml	2.5%Extracto UFC/ml	1.25%Extracto UFC/ml
inoculo	600	750	800	900	500
24h	0	0	600	1800	1900
Sal 3%	20%	10%	5%	2.5%	1.25%
inoculo	500	800	600	800	900
24h	0	0	500	1800	3600
Sal 5%	20%	10%	5%	2.5%	1.25%
inoculo	600	800	800	850	750
24h	0	0	250	1600	3600
Sal 7%	20%	10%	5%	2.5%	1.25%
inoculo	600	1000	750	1000	700
24h	0	0	200	1100	3600

Cuadro 21. Resultados microbiológicos de los testigos a diferentes concentraciones de cloruro de sodio utilizando *S.Typhi*.

Testigo	0%(UFC/ml)	1%(UFC/ml)	3%(UFC/ml)	5%(UFC/ml)	7%(UFC/ml)
inoculo	500	500	650	850	600
24h	inc	14000	600	300	100

Para los extractos que se obtuvieron con cloruro de sodio, la actividad bactericida es del 10% en todos los extractos, a partir de esta concentración empieza a haber crecimiento y no se puede observar ningún tipo de diferencia entre los extractos. Para el caso del chile serrano no se obtuvo ningún tipo de inhibición (cuadro 20).

5.11 Efecto de la concentración sobre el crecimiento/supervivencia de *E. coli* O157 y *S. Gallinarum* en jugo de carne.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la aplicación de las sales de cumarato y ferulato de sodio al 1% en jugo de carne inoculadas con *E. coli* O57 y *S. Gallinarum*.

Cuadro 22 Resultados microbiológicos utilizando jugo de carne como alimento real usando sales sódicas con *E. coli*O157.

E.coli O157	Cumarato 1% UFC/ml	Ferulato 1% UFC/ml
0h	8000	8200
24h	900	2000
48h	0	900

Cuadro 23. Resultados microbiológicos utilizando jugo de carne como alimento real utilizando sales sódicas con *S. Gallinarum*.

S. Gallinarum	Cumarato 1% UFC/ml	Ferulato 1% UFC/ml
0h	8200	8300
24h	0	1000
48h	0	0

Como se puede observar en el cuadro 22 y 23 la utilización de las sales sódicas en un alimento real también tiene una actividad antimicrobiana alta, inhibiendo tanto a *E. coli* O157 y *S. Gallinarum* observándose, es importante realizar este tipo de pruebas en un alimento real ya que desde el punto de vista bioquímica es más complejo que un alimento modelo y las interacciones que se presentan entre el antimicrobiano y los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos con los que cuenta un alimento real pueden afectar el desempeño del antimicrobiano y en caso de dar una respuesta satisfactoria con es nuestro caso se puede tener una aplicación tecnológica .para las sales sódicas.

6 CONCLUSIONES

Se cumplió con el objetivo de hacer más hidrosoluble a los ácidos hidroxicinámicos y cinámicos formando las sales de sodio respectivas. La solubilidad aumentó hasta 40 veces su valor original.

Las cinéticas de crecimiento, supervivencia o muerte de seis bacterias patógenas en presencia de los compuestos activos de *Capsicum annuum* indicaron un efecto estadístico dosis-respuesta (concentración-inhibición). , la efectividad de los compuestos en orden decreciente fueron: cafeato<cumarato<ferulato< cinamato de sodio. Las bacterias más sensibles en orden de sensibilidad fueron: *Salmonella spp.*,>*S. aureus*> *E. coli* O157>*B. cereus*.

Las ecuaciones y parámetros biológicos obtenidos por microbiología predictiva representa una interpretación cuantitativa de la sensibilidad de cada bacteria en presencia de los compuestos activos

Se observaron cambios en la morfología de *E. coli* O157y *S. Gallinarum* en presencia de cumarato al 0.6% y ferulato al 0.6% respectivamente, observándose un alargamiento de las células, lo que indica alteraciones en la pared celular y membrana citoplasmática. En concentraciones de 1% (bactericidas) de ferulato en *S. Gallinarum* y cumarato en *E.coli* O157 se encontraron formación de vacuolas en *E.coli* y lisis de las células con vaciamiento del material citoplasmático en ambas bacterias.

Para el caso del *S. aureus*, en presencia de ferulato de sodio al 0.8% se observó alteración en la membrana con pérdida de la forma esférica y se observó la presencia de vacuolas.

Los extractos obtenidos con isopropanol y etanol fueron los más efectivos en la inactivación de *S. Typhi* en comparación con los extractos acuosos. Se tuvo un efecto bactericida a la concentración de 2.5%., esto sugiere que un disolvente con menor constante dieléctrica es más efectivo para la extracción.

No se observó un efecto del aumento de la fuerza iónica (modificada con NaCl) en la extracción de los compuestos activos.

El cumarato de sodio a concentración de 1% fue capaz de inactivar a *E. coli* O157 en una prueba de reto microbiano efectuado en un alimento (jugo de carne), para el ferulato de sodio disminuyó 1 logaritmo de la población original, en 48h.

Para el caso de *S. Gallinarum* con cumarato de sodio al 1% tuvo un efecto bactericida a las 24h y para el ferulato de sodio la inactivación se realizó a las 48h.

7 BIBLIOGRAFÍA

Acero, C., Dorantes, L., Hernández, H., Gutierrez, G., Aparicio, G. 2005. Evaluation of Phenylpropanoids in Ten *Capsicum annum* L. Varieties and Their Inhibitory Effects on *Listeria monocytogenes* Murray, Webb and Swann Scott A, Mexico. F. Science Technology International. 11(1),5-6.

Barrow, P.A., Huggins, M.B., Lovell, M.A., 1994. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at level of the reticuloendothelial system. United Kingdom. Infection and Immunity 62(10),4602-4610.

Bell, C. 2002. Pathogenic *Escherichia coli* in foodborne pathogens. (Ed.), Clive W. Blackburn and Peter J. McClure. Woodhead publishing limited, FL., USA, pp 279-302.

Beuchant L., R. 1994. antimicrobial properties of spices and the essential oils. In: Dillon VM, Board RG, eds, Natural Antimicrobial system and Food Preservation Wallingford, England: CAB Intl: 1994: 167-179.

Blackburn, C., McClure, P. 2002. Foodborne pathogens Hazard risk analysis and control. (Ed.), CRC, FL. USA, pp 309.

Bowles, B., Miller A.. 1994. Caffeic acid activity against *Clostridium botulinum* spores, USA. Journal of Food Science 59(4),905-908.

Bozzola, J.J., Russel, L.D. 1991. Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologist. (Ed.), Jones and Balett, pp. 18.

Buchanan, R., Stahl, H., Whiting, R. 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food. Prot. 52:844-851.

Careaga, M., Fernández, E., Dorantes, L., Mota, L., Jaramillo, M., Hernández H. 2003. Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. International Journal of Food Microbiology 83, 331-335.

Cerruti P., Alzamora S. 1996 Inhibitory effects of Vanillin on some product spoilage yeast in laboratory media and fruit purées. *Int. J Food Microbiol*:29:379-386.

Cichewicz,R., Thorpe, P. 1996. The antimicrobial proppierties of chilie peppers (*Capsicum* species) and their use in Mayan medicine. *J. Etnophwerm*, 52: 61-70.
Conner DE. Naturally occurring compound In: David-son PM, Branen AI, eds *Antimicrobials in Foods*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1993:441-467.

Dadvison, M,P.2005. *Antimicrobial in food* Ed. Taylor & Francis pp 621-623

De´Angeli,J. 1994. *Gran Larousse de la cocina mexicana*. Vol.1.1 Ed. Larousse 1 ed. 31-35.

Díaz, E.,1999. Preguntas y respuestas de Enterisol Sc-54 y *Salmonella Choleraesuis*. Mexico. Boletín informativo porcino 1, 1-4.

Dorantes, I., Colmenero, R., Hernández, H., Mota, L., Jaramillo, M.E., Fernández, E., Solano, C. 2000. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum* annum L. Extracts. Mexico. *International Journal of Food Microbiology*.. 2000 57, 125-128.

FDA (2007), *Food borne pathogenic microorganism and natural toxins Handbook (Bad Bug Book)* www.fda.gov.

Gould GW. 1995 Overview-In: Gould GW, ed *New methods of food Preservation*. Glasgow: Blakie Academic and Professional; xv-xix.

Graham H., Graham E. 1987. Inhibition o *Aspergillus paraciticus* growth and toxin production by garlic. *J Food Safety*.; 8: 101-108.

¹Hayter, J.1984. "A proof of the conjecture that the Tukey-Kramer multiple comparisons procedure is conservative", *Annals of Statistics*, 12, 617-625

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., and Weisslowicz, H, 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76,626-631.

Katayama T, Nagai I.1960. Chemical significance of the volatile components of spices in the food preservatives view point. VI. Structure and antibacterial activity of terpenes. Bull Jpn Soc Svi Fisheries,26:29-32.

Kouassi, Y., Shelef, A., 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by cinnamic acid: posible interaction of the acid with cysteinyl residues, USA. Journal of Food Safety 18, 231-242.

Leinster, L. 1999a. Combined methods for food preservation. In:Shafiur Rahman,M. (Ed.), Handbook of Food Preservation,Marcel Dekker, New York,pp. 457-485.

Leinster, L.1994a. Further developments in the utilization of hurdle technology for food preservation. J.Food Engineering 22, 421-432.

Leinster, L.1995a.Principles and applications of hurdle technology .In: Gould.G.W.(E.d).New methods for food preservation.Blackie Academic and Professional, London, pp 1-21.

Leistner, L.,Gorris, L.G.M (Eds.), 1994. Food Preseervation by Combined Processes. Final report of FLAIR concertes action No 7, Subgroup B, EUR 1577 EN, European Commission, Directorate- General XII Brussels, Belgium p. 100.

Leistner, L. 2000. Basic aspect of food preservation by hurdle technology.Intl J.food Microbiol. 55:181-186.

Leistner,L1995a. Principles and applications if hurdle technology, In: Gould, G.W (E.d), New Methods for food preservation, blackie Academic and professional, London, pp. 1-21.

Madigan T. (2004) Biología de los microorganismos,Ed. Prentice Hall. 375-379.

Martinez, L., Cilla, I., Beltrán, J., Roncalés P., 2006. Effect of *Capsicum annuum* (Red Sweet and Cayenne) and *Piper nigrum* (Black and White) pepper powders on the shelf life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere, Spain. Journal of Food Science 71(1), 48-53.

Miles, A.A., Misra, S.S., 1938. The estimation of the bactericidal power of the

blood, U.K. Journal Hygiene 38,732-49.

.

Miller Poner Julie. (1993) Food Safety, p 112-116.

Paster N, Juven BJ, Shaaya E, Menasherov M. 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. Lett Appl Microbiol, :11:33-37.

Reinders, R., Biesterreld, S., Bijker, P., 2001. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a model apple juice medium with different concentration of proline and caffeic acid, Netherlands. Applied. Environment Microbiology 67(6), 2863-2866.

Ross, T., McMeekin, T. A. 1994. Predictive Microbiology. Int. J. Food. Microbiol. 23: 241-264.

Sagarpa, 2008. Informe de Labores Sagarpa 2008.

Sebti F, Tantaoui-Elaraki A. 1994. In vitro inhibition of fungi isolated from "pastille" papers by organic acid and cinnamon. Lebensm-Wiss u. Technol. ;27:370-374.

Shahidi, F., Naczki, M., 1995. Food phenolics. (Ed.) Technomic publishing company. Lancaster, Pennsylvania, USA, pp 75-107.

Shelef LA. antimicrobial effects of spices. J. food safety. 1983;6:29-44.

Schilling E. 1990. Process Quality Control Troubleshooting and Interpretation of Data, 2nd Edition. McGraw-Hill

Sofos JN. 1998. Naturally Occurring Antimicrobials in Food USA: Council for Agricultural Science and Technology. Task Force report No 132.

Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., 2000. Review: host adapted serotype of *Salmonella enterica*. Epidemiology and Infectious 125, 229-55.

Van Holde Mathews. 2002. Bioquímica 3ª edición Ed. Addison Wesley p 54-55.

Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K., Toivonen, P. 2003. Antilisterial activity by selected phenolic acid, Canada. *Food Microbiology* 20, 305-311.

Whiting., R.C 1995. Microbial modeling in foods. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 36:467-494.

Wilkis K., Board, R. 1989 natural antimicrobial systems. In Gould GW , ed *Mechanism of Action of food Preservation Procedure*. New York: Elsevier Science; :285-362.

www.fao.org, (2002).

www.ssa.gob (2008).

Yamamoto, K., Koseki S. 2007. A novel approach to predicting microbial inactivation kinetics during high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology* 116(2007) 275-282.

Zwietering, M.H. 1990. Jongenburger, I., Rombouts, F.M y van't Riek, K, *Modeling of bacterial growth curve*. *Appl, Envir. Microbiol.* 56: 1875-1881.

Arturo Ramírez-Torres
Lidia Dorantes-Álvarez
Gerardo Aparicio-Ozores
Edgar Oliver López-Villegas
Nancy Mariana Calderón-Magallan
María Eugenia Jaramillo-Flores

28 April 2010

Dear Sirs,

I am pleased to inform you that your manuscript, "Natural antimicrobials from plant sources", has been accepted as a chapter for the book "Nutraceuticals and Functional Foods: Conventional and Non-Conventional Sources" to be published by Studium Press LLC, USA. Before publishing it will require minor changes, which have been marked in the text of the originally submitted version.

Thank you for submitting your work, we look forward to receiving the modified manuscript as soon as possible.

Sincerely,



Dr. Luis Chel Guerrero
Coeditor
Profesor Investigador
Facultad de Ingeniería Química
Universidad Autónoma de Yucatán, México.