



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

## EXTRACCIÓN DE FITOCOMPUESTOS DE CUATRO DIFERENTES PLANTAS Y SU EFECTO COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS *in vitro* Y EN MANGO “Ataulfo” (*Mangifera indica* L.)

EDGAR REYES OREGÓN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

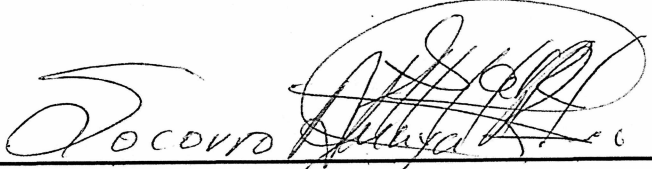
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2015

La presente tesis titulada: **Extracción de fitocompuestos de cuatro diferentes plantas y su efecto como agentes antimicrobianos *in vitro* y en mango "ataulfo" (*Mangifera indica* L.)** realizada por el alumno: Edgar Reyes Oregón bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**FITOSANIDAD**  
**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
DRA. SOCORRO ANAYA ROSALES

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. JAVIER CASTRO ROSAS

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2015

## **Agradecimientos**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante los estudios de postgraduados.**

**Al Colegio de Postgraduados, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.**

**A la Dra. Socorro Anaya Rosales, por su apoyo incondicional paciencia y tolerancia para la realización de esta investigación.**

**Al Dr. Javier Castro Rosas, por todas las enseñanzas profesionales y personales que durante mi estancia en Pachuca me brindo.**

**Al Dr. Javier Hernández Morales, por sus sabias aportaciones a la investigación y apoyo brindado en la elaboración de esta.**

**A las doctoras y los doctores, que durante mi formación en el Colegio, supieron motivarme para continuar día a día con esta superación.**

**A Irene Meza, por todo su apoyo para la gestión durante todo mi estancia en el Colegio de Postgraduados.**

**A los que de alguna u otra forma participaron en la realización de esta tesis,**

## Dedicatoria

A mis padres, que son cimiento de mis ideologías y motivo de superación, gracias por ser mis padres y hacer de mi lo que actualmente soy.

Eder y Sandra, por estar allí siempre incondicionalmente, por ser parte de mi familia, y por todo el apoyo incondicional me otorgan día a día.

A Ivan y Yajaira, son dos amigos de esos que pocas veces se consiguen en la vida, de verdad muchas gracias por todo lo que ustedes hacen por mí, no hay manera de pagar más que ofrecer mi entera gratitud.

A Nayeli Carrillo, tú solo sabes todo por lo que pasamos para tener este logro, te agradezco todo lo que has hecho estos 4 años y te agradezco por adelantado la vida que nos espera juntos y los logros próximos, TE AMO (lo logramos).

A Omar y Gaby, por ser buenos amigos y el apoyo incondicional dado durante todo este tiempo y que estoy seguro que nuestra amistad perdurara.

A los de la cuadra, Armando, Andrés y Roberto, hermanos no de sangre pero si de aventuras, directamente todos son culpables de este logro y por tener las palabras correctas en los momentos exactos.

A Manu y Diego, aunque aún no entiendan lo que esto significa, se las dedico por que al verlos me motivan para tratar de darles un buen ejemplo.

A ti que en algún momento de mi vida llegaras a completar mi felicidad.

## CONTENIDO

	<b>PÁGINAS</b>
Índice de cuadros	1
Índice de Figuras	2
EXTRACCIÓN DE FITOCOMPUESTOS DE CUATRO DIFERENTES PLANTAS Y SU EFECTO COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS <i>in vitro</i> Y EN MANGO "Ataulfo" ( <i>Mangifera indica</i> L.)	3
RESUMEN	3
PHYTOCOMPOUNDS EXTRACTION FROM FOUR DIFERENT PLANTS AND THEIR ANTIMICROBIAN EFECT <i>in vitro</i> AND "Ataulfo" MANGO ( <i>Mangifera indica</i> L.)	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1.1 Objetivo general	7
1.1.1 Objetivos específicos	7
1.1.2 Literatura Citada	8
CAPITULO I.	11
EFECTO ANTIMICROBIANO <i>in vitro</i> DE FITOCOMPUESTOS SOLOS Y EN COMBINACIÓN OBTENIDOS POR DIVERSOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	11
RESUMEN	11
<i>In vitro</i> ANTIMICROBIAN EFECTS OF PHYTOCOMPOUNDS SIMPLE AND COMBINATED, PRODUCED BY MANY EXTRACTION METHODS	12
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Origen de las muestras vegetales	15
2.2. Sitio experimental	15
2.3. Obtención de los Patógenos	15
2.4. Activación de los inóculos	16
2.5. Extracción de fitocompuestos	16
2.5.1. Extracción de aceite esencial de <i>Juglans regia</i>	16

<b>2.5.2. Extracción de aceite esencial de <i>Schinus molle</i></b>	<b>17</b>
<b>2.5.3. Extracción de fitocompuestos de <i>Tagetes erecta</i></b>	<b>17</b>
<b>2.5.4. Extracción de fitocompuestos de <i>Hibiscus sabdariffa</i></b>	<b>18</b>
<b>2.6. Preparación de los extractos para su evaluación</b>	<b>18</b>
<b>2.7. Medición de pH</b>	<b>18</b>
<b>2.8. Diseño experimental</b>	<b>19</b>
<b>2.9. Pruebas de susceptibilidad bacteriana mediante el Método Kirby-Bauer</b>	<b>21</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Obtención de compuestos</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Medición de pH y su relación con el efecto antimicrobiano</b>	<b>23</b>
<b>3.3. Pruebas de susceptibilidad bacteriana ante los extractos solos mediante el método difusión en agar usando discos de papel (Kirby-Bauer).</b>	<b>25</b>
<b>3.4. Pruebas de susceptibilidad bacteriana contra las combinaciones de extractos mediante el método difusión en agar con discos de papel (Kirby-Bauer).</b>	<b>29</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>29</b>
<b>5. LITERATURA CITADA</b>	<b>30</b>
<b>CAPITULO II</b>	<b>37</b>
<b>EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LA COMBINACIÓN DE FITOCOMPUESTOS Y COMBINACIONES CON ACIDO ACÉTICO E HIPOCLORITO DE SODIO EN MANGO “Ataulfo” (<i>Mangifera indica</i> L.)</b>	<b>37</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>37</b>
<b>ANTIMICROBIAN EFFECT OF PHYTOCOMPOUNDS AND COMBINATIONS WITH ACETIC ACID AND SODIUM HYPOCHLORITE IN “Ataulfo” MANGO</b>	<b>38</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>38</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>39</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>2.1. Acondicionamiento de los mangos ataulfo y sitio del experimento</b>	<b>40</b>
<b>2.2. Lavado de bacterias con Solución Salina Isotónica (SSI)</b>	<b>40</b>

<b>2.3. Inoculación de mangos "Ataulfo"</b>	<b>40</b>
<b>2.4. Preparación de los tratamientos</b>	<b>41</b>
<b>2.5. Evaluación del potencial antimicrobiano</b>	<b>41</b>
<b>2.6. Recuento de microorganismos por el Método Vertido en Placa</b>	<b>41</b>
<b>2.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria</b>	<b>41</b>
<b>2.8. Análisis Estadístico</b>	<b>42</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>3.1. Adherencia de los patógenos</b>	<b>44</b>
<b>3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de H. sabdariffa sobre patógenos en mango "Ataulfo"</b>	<b>44</b>
<b>3.3. Evaluación de actividad microbiana de los extractos combinados sobre mango "Ataulfo"</b>	<b>48</b>
<b>3.4. Evaluación de actividad microbiana de los sanitizantes sobre mango "Ataulfo"</b>	<b>51</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>54</b>
<b>5. LITERATURA CITADA</b>	<b>55</b>

# Índice de cuadros

## Capítulo I

<b>Cuadro 1</b> Lista de partes de la planta utilizados y su cantidad.....	17
<b>Cuadro 2.</b> Lista de tratamientos utilizados en la evaluación antimicrobiana in vitro .....	19
<b>Cuadro 3.</b> Lista de rendimientos obtenidos de cada planta estudiada .....	23
<b>Cuadro 4.</b> Variación de los pH de las diferentes plantas y los diferentes tipos de extractos. ....	24
<b>Cuadro 5.</b> Lista de halos frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas..	26
<b>Cuadro 6.</b> Listado de actividad antimicrobiana de los extractos contra cada patógeno.....	28
<b>Cuadro 7.</b> Efecto antimicrobiano de los extractos combinados frente a los microorganismos.....	28

## Capítulo II

<b>Cuadro. 1</b> Lista de tratamientos utilizados en la evaluación antimicrobiana sobre mango “Ataulfo” .....	42
<b>Cuadro. 2</b> Supervivencia de los patógenos (Log UFC/cm <sup>2</sup> )ante los extractos. ...	45
<b>Cuadro. 3</b> Supervivencia de los patógenos ante las combinaciones de extractos. ....	49
<b>Cuadro. 4</b> Supervivencia de los patógenos ante las formulaciones. ....	52



# Índice de Figuras

## Capítulo I

**Figura 1.** Esquema general de un hidrodestilador de laboratorio ..... 16

**Figura 2.** Comparación de halos de inhibición de extractos solos y combinados entre especies. .... 30

## Capítulo II

**Figura 1** Porcentaje eficiencia de inhibición de los tratamientos solos contra *S. Typhimurium*. .... 46

**Figura 2** Porcentaje eficiencia de inhibición de los tratamientos solos contra *E. coli* ..... 46

**Figura 3** Porcentaje eficiencia de inhibición de los tratamientos solos contra *L. monocytogenes*. .... 47

**Figura 4** Eficiencia de inhibición extractos en combinación contra *S. Typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes*. .... 50

# EXTRACCIÓN DE FITOCOMPUESTOS DE CUATRO DIFERENTES PLANTAS Y SU EFECTO COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS *in vitro* Y EN MANGO “Ataulfo” (*Mangifera indica* L.)

EDGAR REYES OREGÓN, MC.

COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2015

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó el potencial de la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Juglans regia* y *Schinus molle*, del extracto metanólico de *Tagetes erecta*, y los extractos etanólico, metanólico, acetónico y de acetato de etilo de *Hibiscus sabdariffa*, genotipos “Alma Blanca” y “Criolla de Oaxaca” sobre *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Staphylococcus aureus* (ATCC 89213) y *Escherichia coli* O157:H7, mediante el Método Kirby-Bauer. Así mismo, se comprobó la actividad antimicrobiana sobre mango “Ataulfo” de los extractos etanólico, metanólico, acetónico y de acetato de etilo de *H. sabdariffa* genotipos “Alma Blanca” y “Criolla de Oaxaca” frente *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. Typhimurium*. Se formuló un sanitizante del cual se determinó su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por dilución. El aceite esencial de *Juglans regia* y *Schinus molle* y el extracto metanólico de *Tagetes erecta* no presentaron efecto contra ningún patógeno. Sin embargo, *E. coli* fue más susceptible a los extractos acetónicos de los genotipos de *H. sabdariffa* “Alma Blanca” (ABA) y “Criolla de Oaxaca” (COA), ya que mostraron halos de inhibición de 20.5 mm y 19.0 mm respectivamente. En las pruebas sobre mango “Ataulfo”, el extracto etanólico de *H. sabdariffa* genotipo “Criolla de Oaxaca” tuvo mayor efecto antimicrobiano contra *S. Typhimurium* reduciendo 4.17 Log UFC/cm<sup>2</sup>. El sanitizante formulado logró reducir 4.45, 4.13 y 4.42 Log UFC/cm<sup>2</sup> contra *S. Typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes* respectivamente. La CMI del sanitizante fue de 0.1 mg/mL.

PHYTOCOMPOUNDS EXTRACTION FROM FOUR DIFERENT PLANTS  
AND THEIR ANTIMICROBIAN EFECT *IN VITRO* AND "Ataulfo" MANGO  
(*Mangifera indica* L.)

EDGAR REYES OREGÓN, MC.

COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2015

ABSTRACT

Potential of *in vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Juglans regia* and *Schinus molle*, the methanol extract of *Tagetes erecta*, and ethanol extracts, methanol, acetone and evaluated ethyl acetate of *Hibiscus sadbariffa* genotypes "Alma Blanca" and "Criolla de Oaxaca" over *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Sigella flexnieri* (ATCC 12022), *Staphylococcus aureus* (ATCC 89213) and *Escherichia coli* O157: H7 by the Kirby-Bauer method. Likewise, the antimicrobial activity of ethanol, methanol, acetone and ethyl acetate extracts of *Hibiscus sadbariffa* genotypes "Alma Blanca" and "Criolla de Oaxaca" against *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in 'Ataulfo' mango was determined. A disinfectant and its minimum inhibitory concentration (MIC) by dilution was formulated. Essential oil of *Juglans regia*, *Schinus molle* and *Tagetes erecta* methanol extract showed no effect against any pathogen. However, *E. coli* was more susceptible to the compounds of the genotypes of *H. sabdariffa* "Alma Blanca" (ABA) and "Criolla de Oaxaca" acetone (COA) as it showed 20.5 mm and 19.0 mm inhibition halos, respectively. Assays on 'Ataulfo' mango, the *H. sabdariffa ethanolic extract* genotype CO (COE) had greater antimicrobial effect against *S. Typhimurium* reducing to 4.17 log CFU / cm<sup>2</sup>. The sanitizer formulated reduced to 4.45, 4.13 and 4.42 log CFU / cm<sup>2</sup> against *S. typhimurium*, *E. coli* and *L. monocytogenes* respectively. Sanitizer MIC was 0.1 mg/mL.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El mango es el cuarto producto frutícola más producido en México después de la naranja, el plátano y el limón, con un volumen de producción de 1, 451,890.39 toneladas y un valor de producción de 4, 847,989.57 miles de pesos. (SIAP, 2014).

Durante 2013, el valor de las exportaciones de mango mexicano se incrementó 16 por ciento, las ventas internacionales realizadas a 22 destinos alcanzaron los 273 millones 491 mil dólares, con un volumen de producción de alrededor de 312.5 mil toneladas, los principales destinos de exportación son Estados Unidos, Canadá, Japón, Reino Unido y los Países Bajos (SAGARPA, 2013).

El mango se produce en 23 estados, de los cuales, diez contribuyen con el noventa y ocho por ciento del total de la producción nacional; los principales Estados productores son: Chiapas, Guerrero, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz (SIAP, 2014). Las principales variedades que México produce son: Kent, Keitt, Tommy Atkins, Haden y Ataulfo (SAGARPA, 2013).

La calidad e inocuidad de los alimentos es uno de los aspectos cada vez más importantes y exigido por los consumidores (López, S/A; Flint *et al.*, 2005). Las causas más comunes de enfermedades ocasionadas por alimentos, se derivan por la contaminación microbiológica, que pueden introducirse en la cadena alimentaria en cualquier punto de la misma (Autio *et al.*, 1999; Fonnesebech *et al.*, 2001). El problema de las enfermedades transmitidas por los alimentos no se limita al daño físico que causan, si bien en algunas ocasiones puede ser fatal, sino también al impacto socioeconómico negativo que conlleva implícitamente, por esto debe ser considerado en un ámbito de carácter social, tecnológico, económico, cultural y político (Kopper, *et al.*, 2009).

El 24 y 29 de agosto del 2012 la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos de Canadá (CFIA por sus siglas en inglés) y la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés), respectivamente, señalaron al mango mexicano procedente de la empresa Agrícola Daniela por una supuesta contaminación de *Salmonella braenderup* publicándola en la lista de alertas de importación, negando el ingreso de mangos provenientes de esta empacadora a EUA y Canadá, derivado de esto, los centros para el control y la prevención de enfermedades informaron sobre un brote de *Salmonella braenderup* que infectó a 105 personas en 16 estados de

EUA (CFIA, 2012; FDA, 2012). El Departamento de Salud Pública de California rastreó varias enfermedades del brote de la cepa de *Salmonella braenderup* a lo largo de la cadena de abastecimiento hasta llegar a Agrícola Daniella (FDA, 2012).

En la actualidad la salud y la vida de las personas dependen en gran parte de la calidad nutricional de los alimentos que consumen diariamente, la cual a su vez depende de la calidad higiénica y sanitaria a que éstos son sometidos en toda la cadena productiva, desde el campo hasta la mesa del consumidor, debido a la incidencia de enfermedades transmitidas por estos alimentos contaminados con patógenos (Francis y O'Beirne, 1999; Cheng-Hsun *et al.*, 2002; Bibek, 2005; Adams y Moss, 2005; Kopper, *et al.*, 2009). Las técnicas modernas como la trazabilidad permiten poder recuperar la historia del alimento, su utilización y localización por medio de los códigos de registros, lo que hace posible poder disponer rápidamente de información sobre el mismo a lo largo de toda la cadena alimentaria (Kopper, *et al.*, 2009). Por lo tanto, es necesario implementar alternativas de soluciones prácticas que permitan a los productores, procesadores y distribuidores de alimentos, utilizar métodos prácticos de fácil interpretación y aplicación, ya sea para prevenir o para corregir las principales causas que dan origen a la presencia de enfermedades transmitidas por los alimentos (Kopper, *et al.*, 2009). El interés de conocer compuestos antimicrobianos de origen natural, es una de las alternativas para asegurar la inocuidad de los alimentos (Morales-Cabrera, *et al.*, 213).

Para reducir los riesgos de salud y las pérdidas económicas debidas a microorganismos transmitidos por los alimentos, se podrían utilizar compuestos antibacterianos naturales (Conner y Beuchat, 1984; Dorman y Deans, 2000). Recientemente, especial atención se ha centrado en compuestos antimicrobianos de origen vegetal (Jeevan, 2004). Existen más de 1300 plantas conocidos por ser una fuente potencial de agentes antimicrobianos, por lo tanto, un número considerable de estudios han sido realizados en extractos de planta y aceites esenciales para examinar su actividad antimicrobiana y su uso potencial en la conservación de alimentos (Brandi *et al.*, 2006). Varias de estas moléculas que tienen actividad antimicrobiana son sintetizados por la planta en respuesta a un ataque microbiano y se pueden encontrar en los tallos, raíces, hojas, cortezas, flores o frutos (Burt, 2004; Brandi *et al.*, 2006; Tajkarimi *et al.*, 2010).

## 1.1. Objetivo general

Extraer fitocompuestos de cuatro especies vegetales y evaluar su potencial como agente antimicrobiano *in vitro* y en mango "Ataulfo" (*Mangifera indica* L.).

### 1.1.1.1. Objetivos específicos

1. Obtención de fitocompuestos de nogal (*Juglans regia* L.), cempasúchil (*Tagetes erecta* L.), pirul (*Schinus molle* L.) y 2 genotipos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.); "Alma Blanca" y "Criolla de Oaxaca" por diferentes métodos de extracción.
2. Evaluación *in vitro* de la susceptibilidad bacteriana de los microorganismos patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Shigella flexneri*, frente a los extractos obtenidos.
3. Determinar la actividad antimicrobiana en mango "Ataulfo" de los extractos que presenten mayor rendimiento e inhibición de bacterias *in vitro*.
4. Formular un sanitizante con los extractos que disminuyan mayor carga bacteriana en mango "Ataulfo" y determinar su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

### 1.1.1. Literatura Citada

- Adams M. R. and Moss M. O. (2005). Food Microbiology. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Jöberg, A. M., Aarnisalo, K., Björkroth, J., Sandholm, T. M. and Korkeala, H. (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. Appl Environ Microbiol, 65(1), 150-155.
- Brandi, G., Amagliani, G., Giuditta, F., Schiavano. De Santi, M. and Sisti, M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* Leaf Juice on Foodborne Pathogenic Bacteria. Journal of Food Protection, 69(9):2274–2279.
- Bibek, R. (2005). Fundamental food microbiology. Florida: CRC Press LLC.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. International Journal of Food Microbiology. 94(3):223-53.
- CFIA. 2012. Canadian Food Inspection Agency. En línea: <http://www.inspection.gc.ca/eng/1297964599443/1297965645317> Fecha de consulta: 28 de mayo de 2014.
- Cheng-Hsun C., Tsu-Lan W., Lin-Hui S., Chishih C., Ju-Hsin C., An-Jing K., Maw-Sheng C., Tzou-Yien L. 2002. The Emergence in Taiwan of Fluoroquinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis. The New England Journal of Medicine 346:413-419.
- Conner, D. E. and Beuchat, L. R., 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. Journal of Food Science 49(1):429–434.
- Dorman, H. J. D., and Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. 88:308-316.

- FDA. 2012. U.S. Food and Drug Administration. En línea: <http://www.fda.gov/iceci/enforcementactions/warningletters/tobacco/ucm294914.htm> Fecha de consulta: 18 de mayo 2014.
- Fonnesbech, V. B., Henrik, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. and Gram, L. (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* Contamination Routes in Cold-Smoked Salmon Processing Plants Detected by DNA-Based Typing Methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(6), 2586-2595.
- Flint, J. A., Van Duynhoven, Y. T., Angulo, F. J., De Long, S. M., Braun P., Kirk, M., Scallan, E., Fitzgerald, M., Adak, G. K., Sockett, P., Ellis, A., Hall, G., Gargouri, N., Walke, H. and Braam, P. (2005). Estimating the Burden of Acute Gastroenteritis, Foodborne Disease, and Pathogens Commonly Transmitted by Food: An International Review. *Clin Infect Dis.*, 41(5), 698-704.
- Francis, G. A. and O'Beirne, T. 1999. The microbial safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*.34(1):1-22.
- Jeevan R. A. 2004. *In vitro* antimicrobial activity of certain medicinal plants from Eastern Ghats, India, used for skin diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 3:353-357.
- López, D. M. F., Regino, M. T. E., García, L. L. C., De los Santos, V. M. A. y Carranza, M. O. S/A. Manual técnico de muestreo de productos agrícolas y fuentes de agua para la determinación de contaminantes microbiológicos. Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera. 15 p.
- Martínez, M.L., Labuckas, D. O., Lamarque, A.L. and Maestri, D.M. 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 12(1):1959–1967.
- Morales-Cabrera, M. Hernández-Morales J, Leyva-Rúelas G, Salinas-Moreno, Y. Soto-Rojas, L. and Castro-Rosas, J. 2013. Influence of variety and



extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7(31):2319-2322.

SAGARPA. 2013. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. En Línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B289.aspx>  
Fecha de Consulta: 12 de junio de 2014.

SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). En Línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>  
Fecha de Consulta: 25 de julio de 2014.

Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A, Cliver D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199-1218.

Kopper, K., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W. Y Gutiérrez, G. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 190 p.

## CAPITULO I.

# EFECTO ANTIMICROBIANO *in vitro* DE FITOCOMPUESTOS SOLOS Y EN COMBINACIÓN OBTENIDOS POR DIVERSOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

<sup>1</sup>Reyes Oregón Edgar, <sup>1</sup>Anaya Rosales Socorro, <sup>2</sup>Castro Rosas Javier, <sup>1</sup>Hernandez Morales Javier.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados-Programa de Fitosanidad, Carretera México-Texcoco KM. 36.5, Montecillo, Edo. de México. [edgar.reyes@colpos.mx](mailto:edgar.reyes@colpos.mx)

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, 42183 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

## RESUMEN

Se evaluó el rendimiento de trece extractos, la influencia de diferentes solventes y métodos de extracción en el potencial de la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Juglans regia*, *Schinus molle*, *Tagetes erecta* e *Hibiscus sabdariffa* genotipos "Alma Blanca" y "Criolla de Oaxaca", extractos solos y en combinación. La actividad antimicrobiana se evaluó sobre patógenos Gram positivos: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 89213) así como en Gram negativos: *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), y *Escherichia coli* O157:H7, mediante el método Kirby-Bauer. Así mismo, se midieron los pH de los extractos obtenidos. Los extractos de *H. sabdariffa* genotipos "Criolla Oaxaca" y "Alma Blanca" extraídos con metanol obtuvieron rendimientos más altos en comparación a los demás extractos (42% y 24% respectivamente). El pH de los extractos fue de 1.53 a 7.44. Los extractos obtenidos con disolventes orgánicos mostraron menor pH que los aceites esenciales. El extracto que mostró mayor efecto inhibitorio fue "ABA" con 17.2 mm sobre el grupo de las Gram positivas y 15.7 mm para las Gram negativas. Los extractos de las plantas *S. molle*, *T. erecta* y *J. regia* no mostraron efecto inhibitorio contra ningún grupo de bacterias. La combinación más efectiva fue la de COAE/COM, provocando halos de 21 mm, 20 mm y 20.3 mm para *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *S. flexneri*, respectivamente.

# IN VITRO ANTIMICROBIAN EFFECTS OF PHYTOCOMPOUNDS SIMPLE AND COMBINATED, PRODUCED BY MANY EXTRACTION METHODS

<sup>1</sup>Reyes Oregón Edgar, <sup>1</sup>Anaya Rosales Socorro, <sup>2</sup>Castro Rosas Javier, <sup>1</sup>Hernandez Morales Javier.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados-Programa de Fitosanidad, Carretera México-Texcoco KM. 36.5, Montecillo, Edo. de México. [edgar.reyes@colpos.mx](mailto:edgar.reyes@colpos.mx)

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, 42183 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

## ABSTRACT

Yields of the extracts, the influence of different solvents and extraction methods were evaluated in the potential of *in vitro* antimicrobial activity of *Juglans regia*, *Schinus molle*, *Tagetes erecta*, and genotypes “Alma Blanca” and “Criolla de Oaxaca” of *Hibiscus sabdariffa*; simple and combined extracts. The antimicrobial activity was evaluated on Gram positive pathogens: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 89213) as well as Gram negatives: *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), and *Escherichia coli* O157: H7, by Kirby-Bauer method. Thereby, pH of extracts obtained were measured. Genotypes “Alma Blanca” and “Criolla de Oaxaca” methanol extracted of *H. sabdariffa* obtained higher yields compared to other extracts (42% and 24% respectively). The pH of the extracts were between 1.53 and 7.44. Extracts obtained with organic dissolvents were lower pH than the essential oils. Higher inhibitory effect was performed by ABA, in order to 17.2 mm for Gram positive group and 15.7 mm for Gram negative group. Extracts of plants *S. molle*, *T. erecta* and *J. regia* showed no inhibitory effect against any group of bacteria. Most effective combination was COAE/COM, performing 21 mm, 20 mm and 20.3 mm inhibition halos for *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *S. flexneri*, respectively.

# 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha observado una tendencia creciente hacia el uso de sustancias naturales en lugar de los sintéticos. Se sabe que las sustancias sintéticas son más complejas en comparación con las sustancias naturales, por este motivo, tardan mucho tiempo para que puedan completar sus ciclos naturales y volver a la naturaleza; por tanto, causan contaminación ambiental. (Tseng *et al.*, 1998; Pulido *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2004). Los extractos naturales provenientes de plantas medicinales, ejercen una acción antimicrobiana, por lo que en México se han hecho investigaciones probando la efectividad de los extractos de varias plantas que se encuentran en nuestro territorio, y han demostrado una actividad antimicrobiana (Amaya-Gutiérrez *et al.*, 2008).

La familia Anacardiaceae comprende unos 70 géneros y 600 especies, dentro de estos se encuentra el pirul (*S. molle*), tiene usos tradicionales para aliviar malestares estomacales y antidiarreicos, debido a la presencia de taninos y resinas (Duarte *et al.*, 2006). El "molle", fue el árbol sagrado de los Incas, quienes hacían la siembra y riego, los plantaban en los contornos de sus palacios, templos y edificios públicos. Desde la resina exudada del tronco se obtiene un caucho líquido que sirve para embalsamar (Mendonça-Rocha *et al.*, 2012). Hay varios informes de los aceites esenciales de *S. molle* sobre su uso como insecticida (Chantraine *et al.*, 1998) y repelente de mosquitos (Wimalaratne *et al.*, 1996). Alrededor del 60% de los aceites esenciales tienen actividad anti fúngica y el 35% tienen propiedades antibacterianas (Silva, *et al.*, 2010). Aunque la actividad antimicrobiana puede ser activado por un único compuesto químico, por lo general parece resultar de una sinergia entre varios productos químicos en el extracto (Burt, 2004).

El género *Juglans* de familia Juglandaceae comprende varias especies y es ampliamente dispersos por todo el mundo. El nogal (*J. regia*) es el árbol de nuez más extendido en el mundo (Pereira *et al.*, 2008). Hay una gran diversidad de genotipos que difieren en la silvicultura como: la productividad, la fisiología y químicos de las nueces, (Martínez *et al.*, 2010). La semilla de la nuez es un hueso de alto interés económico para la industria alimentaria y es mundialmente popular y valorado por su nutrición, la salud y los atributos sensoriales (Martínez *et al.*, 2010). Muchas partes de las nueces verdes como conchas, hueso, semillas, corteza y hojas se utilizan en la industria farmacéutica y la belleza (Stampar *et al.*, 2006; Pereira *et*

*al.*, 2007). Se ha evaluado el potencial antimicrobiano de los extractos acuoso del follaje y la nuez, mostrando actividad antimicrobiana, sin embargo, la acción de cada extracto es diferente según el microorganismo ensayado (Gram positivas o Gram Negativas), (Pereira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008).

*T. erecta* es una planta ampliamente cultivada con potencial ornamental, comúnmente conocida como caléndula, es nativa de México y América del Sur, naturalizado en otras partes de los trópicos y subtrópicos e introducido a la India por los portugueses (Janakiram y Rao, 1996). El aceite esencial de las partes aéreas de *T. erecta* ha demostrado eficacia antimicrobiana contra varias cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y hongos (Grover y Rao, 1978; Garg y Dengre, 1986). Los extractos de las partes aéreas de *T. erecta* también han demostrado actividad antimicrobiana significativa frente a varias cepas de bacterias y hongos (Nanir y Kadu, 1987; Penna *et al.*, 1994).

El género *Hibiscus* (Malvaceae) incluye más de 300 especies de hierbas, arbustos o árboles (Wang *et al.*, 2012). Es comúnmente conocido como roselle, hibiscus, jamaica, sorrelo, red sorrel (ingles) y en Arabe, karkadeh (Ali *et al.*, 2005; Ross, 2003). Hay dos variedades principales de *H. sabdariffa*, var. *altissima*, cultivado por su fibra de yute y el segundo var. *sabdariffa* ha sido ampliamente utilizada como medicamentos locales, en la India, África y México, las infusiones de las hojas o los cálices se utilizan tradicionalmente para uso diurético, colerético, febrífugo y efectos hipotensores, disminuyendo la viscosidad de la sangre y estimulando la peristalsis intestinal. También se recomienda como hipotensor en Senegal (Morton, 1987). Otro de los usos más reconocidos es el que reportan Liu, *et al.*, (2005), de la inhibición con extracto de *H. sabdariffa* de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistente a metilicina. Los extractos crudos de *H. sabdariffa* (200 mg/l) también mostraron efecto antimicrobiano contra tres tipos de bacterias Gram negativas (*Salmonella*, *Shigella* y *Enterobacter*) (Nwaiwu *et al.*, 2012).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Origen de las muestras vegetales

Las muestras de material vegetativo de *T. erecta*, *S. molle* y *J. regia*, fueron recolectadas en agosto de 2013 en el predio "La Cruz", Trinidad, Texcoco, Estado de México.

Los ejemplares de los dos genotipos de cálices de *H. sabdariffa* ("Alma blanca y Criolla de Oaxaca"), se obtuvieron de la localidad de San Francisco Cozoaltepec, Santa María Tonameca, Oaxaca, en noviembre del 2013.

### 2.2. Sitio experimental

La extracción de compuestos se realizó en dos fases: la primera se llevó a cabo en el laboratorio de fitoquímica del Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. En esta primer fase se obtuvieron los compuestos de *T. erecta*, *S. molle* y *J. regia*.

La segunda fase se llevó a cabo en el laboratorio de fisicoquímica de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), México. Esta consistió en la obtención de fitocompuestos de los dos genotipos de *H. sabdariffa* y las pruebas de susceptibilidad de los microorganismos patógenos a los fitocompuestos *in vitro*, se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de alimentos de la UAEH.

### 2.3. Obtención de los Patógenos

Para las pruebas, se trabajó con cinco bacterias patógenas: *S. Typhimurium* (ATCC14028), *L. monocytogenes* (ATCC19115), *S. flexneri* (ATCC 12022), *S. aureus* (ATCC 89213) y *E. coli* O157:H7 (E09 donada por el Dr. E.F. Escartín de la Universidad Autónoma de Querétaro). Las bacterias utilizadas en los experimentos fueron cepas resistentes a Rifampicina (R<sup>+</sup>) (Gruppolepetit, Italia) (Castro-Rosas y Escartín, 2000).

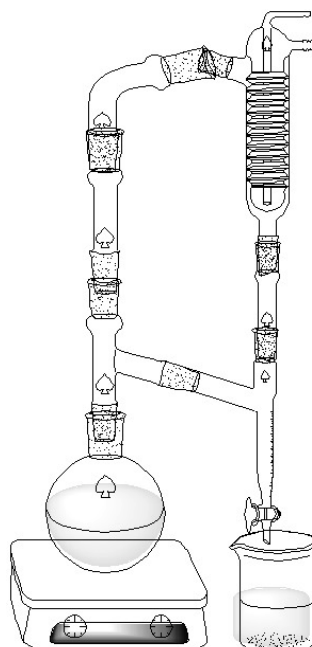
## 2.4. Activación de los inóculos

Las cepas de los microorganismos patógenos se mantuvieron en refrigeración (4-7°C) en tubos inclinados con Agar para Métodos Estándar (AME) (Bioxon, México), éstas cepas eran activadas en caldo de soya tripticaseína (CST) (Bioxon, México) e incubadas a 37 °C/24 horas previo a cada estudio.

## 2.5. Extracción de fitocompuestos

### 2.5.1. Extracción de aceite esencial de *Juglans regia*

Para la obtención del aceite esencial de nogal (*J. regia*), se utilizó el método de hidrodestilación (Fig. 1), para lo cual se maceraron 500g de material fresco (hojas), posteriormente se colocó dentro de un matraz y se agregó agua destilada hasta cubrir la muestra, mediante una parrilla eléctrica (Termolyne Cimarec, U.S.A.) se proporcionó calor hasta provocar su ebullición durante 3 horas aproximadamente. El aceite fue recolectado y separado de las partículas de agua con diclorometano, posteriormente se evaporó el diclorometano con ayuda de rotavapor (Buchi R-205) a 45°C/100rpm. El extracto se guardó en un frasco ámbar entre 4-6°C hasta su utilización.



**Figura 1.** Esquema general de un hidrodestilador de laboratorio

### 2.5.2. Extracción de aceite esencial de *Schinus molle*

El aceite esencial de pirul (*S. molle*), se obtuvo con el método de hidrodestilación, para lo cual se trituraron 500g de material foliar aéreo fresco (hojas y frutos), se pusieron dentro de un matraz, después se agregó agua destilada hasta cubrir la muestra, con ayuda de una parrilla eléctrica se proporcionó calor hasta provocar su ebullición durante 3 horas aproximadamente. Pasado este tiempo, el aceite fue recolectado y separado de las partículas de agua con diclorometano, posteriormente este se evaporó con ayuda de un rotavapora 45°C/100 rpm. El extracto se guardó en un frasco ámbar entre 4-7 °C hasta su utilización.

### 2.5.3. Extracción de fitocompuestos de *Tagetes erecta*

De manera aséptica se pesaron 100g de cada parte seca y macerada de la planta (hojas, raíz, flores y tallos) (Cuadro 1).

**Cuadro 1** Listado de partes de la planta utilizados y su porción.

<b>Parte vegetal</b>	<b>Peso (gr)</b>
<b>Flor</b>	100
<b>Hoja</b>	100
<b>Tallo</b>	100
<b>Raíz</b>	100
<b>Total</b>	400

Se mezclaron homogéneamente las partes de la planta y se adicionó metanol: agua en proporción 3:1, hasta cubrir por completo la muestra. Posteriormente se dejó reposar durante 3días a temperatura ambiente con periodos de agitación cada 24 horas; al finalizar este tiempo se filtró la fase líquida y con ayuda de un rotavaporador 45°C/100 rpm, se evaporó el metanol, concentrando de esta manera la fase acuosa. Consecutivamente, para separar la fracción acuosa de la fracción orgánica, se utilizó un embudo de separación, adicionando hexano:cloroformo (2:1). Finalmente se evaporaron el hexano y cloroformo, y el extracto se dejó 24horas en una estufa a 40 °C para eliminar por completo los



residuos de los disolventes. El compuesto se guardó en un frasco ámbar entre 4-7 °C hasta su utilización.

#### 2.5.4. Extracción de fitocompuestos de *Hibiscus sabdariffa*

De cada genotipo de Jamaica ("alma blanca" y "criolla de Oaxaca"), se pesaron 25g de cálices deshidratados y fueron colocados inmediatamente por separado en frascos de vidrio estériles, a cada serie de dos frascos se agregó etanol al 96% (Sigma-Aldrich, México), en otra serie de dos se adicionó metanol (Sigma-Aldrich, México), a otra serie acetato de etilo (Sigma-Aldrich, México), y finalmente a otra serie acetona (Sigma-Aldrich, México). Se agregaron 400 mL de cada disolvente. Los frascos fueron cerrados herméticamente y se almacenaron en oscuridad a temperatura de laboratorio por siete días, agitando los frascos en forma manual una vez cada 24 horas. Al final de cada extracción, la fase líquida se filtró a vacío con papel Whatman® No.41 con tamaño del poro de 20-25 µm. Los extractos filtrados se concentraron en un rotavapor, y se dejaron 24 horas en una estufa a 40°C para eliminar por completo los residuos de los disolventes. Finalmente los compuestos se guardaron en un frasco ámbar entre 4-7 °C hasta su utilización.

#### 2.6. Preparación de los extractos para su evaluación

Todos los extractos de las diferentes plantas fueron mezclados con tween 80 (Sigma-Aldrich) al 20% en una relación 1:10 (extracto-tween), previo a su evaluación. En el caso de las pruebas con mezcla de extractos fueron preparados en proporciones 1:1:1 extracto-extracto-tween 80 al 20%.

#### 2.7. Medición de pH

Los pH de los fitocompuestos fueron medidos con un potenciómetro Orion DUAL STAR™ en dilución 1:10 p/v con tween 80 al 20%.

## 2.8. Diseño experimental

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* se realizó mediante un diseño experimental completamente al azar con 32 tratamientos y tres repeticiones por las cinco bacterias de estudio (Cuadro 2). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) comparando las medias con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de  $p=0.05$ . Para esto se utilizó el programa estadístico SPSS versión 16.0.

**Cuadro 2.** Lista de tratamientos utilizados en la evaluación antimicrobiana *in vitro*.

Tratamiento	Planta	Parte de la planta	Tipo de extracción	Clave
1	Nogal	Hojas	Hidrodestilación	AEN
2	Nogal	Hojas	Hidrolato	HN
3	Pirul	Hojas y Frutos	Hidrodestilación	AEP
4	Pirul	Hojas y Frutos	Hidrolato	HP
5	Cempasúchil	Hojas, Raíz, Flores y Tallos	metanol: agua	TEM
6	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Metanol	COM
7	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Etanol	COE
8	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Acetona	COA
9	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Acetato de etilo	COAE
10	Alma Blanca	Cáliz	Metanol	ABM
11	Alma Blanca	Cáliz	Etanol	ABE
12	Alma Blanca	Cáliz	Acetona	ABA
13	Alma Blanca	Cáliz	Acetato de etilo	ABAE
14	Criolla de Oaxaca- Alma Blanca	Cáliz	Metanol/Etanol	COM/ABE

---

15	Criolla de Oaxaca-Alma Blanca	Cáliz	Metanol/Acetona	COM/ABA
16	Criolla de Oaxaca-Alma Blanca	Cáliz	Acetona	COA/ABA
17	Criolla de Oaxaca-Alma Blanca	Cáliz	Etanol	COE/ABE
18	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Metanol/Etanol/acetona	COM/COE/COA
19	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Metanol/Acetona	COM/COA
20	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Etanol/Metanol	COE/COM
21	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Etanol/Acetona	COE/COA
22	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Acetato de Etilo/Etanol	COAE/COE
23	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Acetato de Etilo/Metanol	COAE/COM
24	Criolla de Oaxaca	Cáliz	Acetato de Etilo/Acetona	COAE/COA
25	Alma Blanca	Cáliz	Metanol/Etanol/Acetona	ABM/ABE/ABA
26	Alma Blanca	Cáliz	Metanol/Etanol	ABM/ABE
27	Alma Blanca	Cáliz	Metanol/Acetona	ABM/ABA
28	Alma Blanca	Cáliz	Acetato de Etilo/Etanol	ABAE/ABE
29	Alma Blanca	Cáliz	Etanol/Acetona	ABE/ABA
30	Alma Blanca	Cáliz	Acetato de Etilo/Metanol	ABAE/ABM
31	Alma Blanca	Cáliz	Acetato de Etilo/Acetona	ABAE/ABA
32	Tween 80 al 20%			Tween

---

## 2.9. Pruebas de susceptibilidad bacteriana mediante el Método Kirby-Bauer

Las pruebas de efecto antimicrobiano fueron realizadas por el método de difusión en agar usando discos de papel (método de Kirby-Bauer).

Sobre una placa de Agar Método Estándar (AME) (Bioxon, México), adicionada con rifampicina (1mL/100mL de AME) (AME R<sup>+</sup>), se colocaron 100μL de suspensión de inóculos con una concentración aproximada  $1 \times 10^6$  UFC/mL previamente activado y con ayuda de una varilla de vidrio (forma de "L"), se distribuyó de forma homogénea sobre la placa, seguido a esto se colocaron discos de papel filtro de aproximadamente 5 mm de diámetro. Posteriormente se adicionó 10μL de extracto diluido con tween 80 al 20% (1:9 p/v), para asegurar la absorción del extracto por el disco se dejó 5 min en campana de flujo laminar, posteriormente las placas fueron incubadas a 35°C/24 horas. Finalmente se midieron los halos de inhibición de los extractos que presentaron actividad.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Obtención de compuestos

Siguiendo la metodología previamente descrita, se lograron obtener rendimientos de 0.02% - 0.97% con el método de hidrodestilación de *S. molle* y *J. regia*, y de 0.35% - 42% usando disolventes orgánicos de distintas polaridades de *T. erecta*, *H. sabdariffa* genotipos "Alma Blanca" y "Criolla de Oaxaca" (Cuadro 3).

Vale la pena resaltar el rendimiento de la extracción de *H. sabdariffa* genotipos "Alma Blanca" y "Criolla de Oaxaca" con metanol, estos fueron de 42% y 24% respectivamente siendo los más altos, seguidos de la extracción con etanol, para los genotipos "Alma Blanca" y "Criolla de Oaxaca" los rendimientos fueron de 12% y 22% respectivamente. Mientras tanto, la obtención de aceite esencial por hidrodestilación dio un rendimiento de 0.02% para *J. regia* y 0.37% para *S. molle*. Rendimientos parecidos con cáliz de *H. sabdariffa* son obtenidos realizando infusiones a 55°C durante 2 horas para obtener 28.3% de extracto. (Alarcón *et al.*, 2012).

Se ha reportado que los extractos metanólicos de los cálices *H. sabdariffa* tienen menor efecto antimicrobiano contra una serie de bacterias en comparación con extractos etanólicos y acuosos, pero el extracto metanólico fue más eficaz contra *Streptococcus pneumoniae* (Hatil and Moneer, 2006), lo que sugiere el estudio de posibles combinaciones entre extractos entre especies con el fin de encontrar posibles sinergismos y ampliar su espectro. Los resultados indican que el método de extracción es un factor importante a considerar para obtener altos rendimientos de los compuestos secundarios de interés (Muthuvelan y Balaji, 2008).

La comparación de los resultados de esta etapa con otros trabajos publicados resulta difícil, debido a las distintas metodologías utilizadas y que gran parte de los investigaciones se basan en extractos acuosos, y en este sentido pocas reportan los rendimientos obtenidos con el uso de diferentes disolventes orgánicos o con el método de hidrodestilación.

**Cuadro 3.** Lista de rendimientos obtenidos de cada planta estudiada

Planta	Rendimiento
<i>ABM</i>	24%
<i>ABE</i>	22%
<i>ABA</i>	2.58%
<i>ABAE</i>	0.45%
<i>COM</i>	42%
<i>COE</i>	12%
<i>COA</i>	1.2%
<i>COAE</i>	0.35%
<i>AEP</i>	0.02%
<i>HP</i>	0.12%
<i>TEM</i>	0.42%
<i>AEN</i>	0.37%
<i>HN</i>	0.97%

### 3.2. Medición de pH y su relación con el efecto antimicrobiano

Los pH de los fitocompuestos fueron medidos en dilución 1:10 p/v con tween 80 al 20%. Las mediciones de pH muestran que los compuestos de los cálices de *H. sabdariffa* obtenidos con solventes orgánicos son más ácidos, ya que se encontraron en un rango de 1.53 - 2.41 siendo estadísticamente diferentes ( $\alpha, \leq 0.05$ ), de los aceites esenciales de *J. regia* y *S. molle* que muestran pH de 6.42 y 7.44 respectivamente. El pH del extracto de "Criolla de Oaxaca" con acetato de etilo y "Alma Blanca" acetónico arrojaron mediciones de 1.53 y 1.62 respectivamente, siendo los pH de menor valor (Cuadro 4). Los valores de pH obtenidos para los genotipos A. blanca y C. Oaxaca con etanol y metanol son similares a los reportados por Morales-Cabrera *et al.*, (2013), pero inferiores a los reportados por Fasoyiro *et al.*, (2005) y Prenesti *et al.*, (2007) quienes reportan valores de 3.10 y 2.76 en extractos metanólicos respectivamente. Ramírez-Rodríguez *et al.*, (2011), reportaron pH (2.45) similares a los COM de esta investigación mediante la extracción con agua caliente de cáliz de *H. sabdariffa* a 75° C durante 15 segundos. Los valores de pH observados en los extractos acuosos por Salinas-Moreno *et al.*, (2012) de jamaica variaron de 2.4 a 2.65.

**Cuadro 4.** Variación de los pH de las diferentes plantas y los diferentes tipos de extractos.

Planta	pH
ABM	1.83±0.02 <sup>a</sup>
ABE	1.73±0.02 <sup>a</sup>
ABA	1.62±0.01 <sup>a</sup>
ABAE	1.74±0.02 <sup>a</sup>
COM	2.41±0.01 <sup>b</sup>
COE	1.73±0.01 <sup>a</sup>
COA	1.70±0.00 <sup>a</sup>
COAE	1.53±0.01 <sup>a</sup>
AEP	6.42±0.01 <sup>d</sup>
HP	6.35±0.02 <sup>d</sup>
TEM	4.93±0.32 <sup>c</sup>
AEN	7.44±0.02 <sup>e</sup>
HN	7.20±0.00 <sup>e</sup>

Medias con distinta letra entre filas son diferente estadísticamente (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

La acidez que presentan los extractos está directamente relacionada con la cantidad de ácidos presentes, en la jamaica los dominantes son el oxálico y el succínico (Fasoyiro *et al.*, 2005), el ácido cítrico, ascórbico, málico y esteárico (Hirunpanich *et al.*, 2005) y el ácido hibiscus en sus formas libre y glucosada (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011). El pH es un factor importante en los extractos de las plantas, ya que puede favorecer directamente la eficacia de la actividad antimicrobiana, aunque también, depende de factores tales como: el origen vegetal, el método de la extracción de los compuestos secundarios, concentración de inóculo, la fase de crecimiento de la planta, medio de cultivo utilizado, etc. (Brandi *et al.*, 2006; Tajkarimi *et al.*, 2010; Salinas-Moreno *et al.*, 2012). En este sentido, Abu-Tarboush (1994), ha estudiado la relación que existe entre el pH de los extractos de jamaica con su grado de inhibición que presentan, concluyendo que los bajos niveles de pH proporcionan las condiciones idóneas para auto-eliminar ciertos componentes bacterianos que necesitan un pH mayor para sobrevivir. Pero los estudios con mayor peso sugieren que son otros compuestos los responsables de la inhibición bacteriana presentes en estos extractos, pero aún no se han confirmado con claridad, sin embargo, la

presencia de estos inhibidores puede ser afectada por el pH (Morales-Cabrera *et al.*, 2013).

Las células adaptadas a pH ácidos pueden ocasionar disminución de la población celular activa hasta tres logaritmos, además, de ser más pequeñas a diferencia de la cepa original. (Mayorga-Reyes *et al.*, 2009).

En el caso de *E. coli* O157:H7 Bautista (2011), no reporta crecimiento a pH 4.0 en caldo de cultivo. El pH mínimo de desarrollo es de 4.0 y 4.5, aunque depende de la interacción con otros factores (temperatura, actividad de agua), (Montville y Matthews, 2005). Aunque se ha observado una tolerancia excepcional de cepas de *E. coli* O157:H7 a valores de pH extremos (2 y 12), comportamiento más notable a 4 °C que a 25 °C (Miller and Kaspar, 1994).

### 3.3. Pruebas de susceptibilidad bacteriana ante los extractos solos mediante el método difusión en agar usando discos de papel (Kirby-Bauer).

De los fitocompuestos obtenidos mediante los diferentes métodos de extracción, en general, solo los extractos crudos de cálices de los dos genotipos de jamaica (A. blanca y C. Oaxaca), mostraron efecto inhibitorio en los bioensayos frente a las bacterias Gram negativas (*E. coli*, *S. flexneri* y *S. Typhimurium*) y Gram positivas (*L. monocytogenes*, y *S. aureus*), mostrando diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre estos: Los extractos de ABM y COM fueron los que menor efecto tuvieron con medias de halos de 5.7 mm y 7.7 mm respectivamente para las bacterias Gram negativas y de 4.8 mm y 5.8 mm respectivamente para las Gram positivas, el extracto que mostró mayor efecto inhibitorio fue ABA con 17.2 mm para el grupo de las Gram positivas y 15.7 mm para las Gram negativas. En contraste, los extractos de las plantas *S. molle*, *T. erecta* y *J. regia* no mostraron efecto inhibitorio contra ningún grupo de bacterias *in vitro*, por ello y su bajo rendimiento su estudio fue interrumpido en las siguientes pruebas (Cuadro 5).

Cabe mencionar que en todas las pruebas se adicionó rifampicina al medio de cultivo (AME) para evitar la contaminación de otros microorganismos.



**Cuadro 5.**Lista de halos frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas

Tratamientos	Gram negativas**	Gram positivas**
	Halos.(mm)	Halos.(mm)
ABM	5.7±2.8 <sup>a</sup>	4.8±0.8 <sup>a</sup>
ABE	9.6±0.7 <sup>b</sup>	11.1±0.6 <sup>b</sup>
ABA	15.7±2.6 <sup>c</sup>	17.2±1.5 <sup>d</sup>
ABAE	11.5±0.4 <sup>b</sup>	12.0±1.7 <sup>b</sup>
COM	7.7±0.6 <sup>a,b</sup>	5.8±1.3 <sup>a</sup>
COE	9.4±1.1 <sup>b</sup>	12.1±0.5 <sup>b</sup>
COA	14.7±2.2 <sup>c</sup>	14.6±1.6 <sup>c</sup>
COAE	14.7±1.5 <sup>c</sup>	15.3±1.0 <sup>c</sup>
AEP	S/A*	S/A*
HP	S/A*	S/A*
TEM	S/A*	S/A*
AEN	S/A*	S/A*
HN	S/A*	S/A*
Tween 80	S/A*	S/A*

Medias con distinta letra entre filas son diferente estadísticamente (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

\*S/A: Sin actividad antimicrobiana.

\*\*Gram negativas: *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. flexneri*

\*\*Gram positivas: *L. monocytogenes*, *S. aureus*

Anteriormente se había demostrado que el contenido natural de polifenoles entre ellos los flavonoides, (3-O-glucosil-gosipetina), aislado de las flores de *H. sabdariffa* posee una potente actividad antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, (Mounnissamy *et al.*, 2002; Morales-Cabrera *et al.*, 2013; Borrás-Linares *et al.*, 2015). Hatil y Moneer (2006), reportan que las especies de *H. sabdariffa* tienen un amplio espectro de actividad.

Generalmente las bacterias Gram negativas son menos susceptibles a los antimicrobianos de origen vegetal porque tienen una membrana externa que rodea la pared celular y restringe la difusión de compuestos hidrófobos. Sin embargo, esto no significa que las bacterias Gram positivas son las más susceptibles (Burt, 2004; Stefanello *et al.*, 2008). Así mismo, existen estudios donde no se observa diferencias significativa entre los grupos Gram positivos y Gram negativos donde se miden los

halos a las 24 horas (Ouattara *et al.*, 1997), tal es el caso del presente estudio, donde solo con el extracto COE, se pudo observar diferencias significativas a las 24 horas, donde se midieron halos de 9.4 mm y 12.1mm para Gram negativas y para Gram positivas respectivamente. Resultados que concuerdan con los reportados por Borrás-Linares *et al.*, (2015), que demuestra que los extractos etanólicos de *H. sabdariffa* fueron más eficaces contra las bacterias Gram positivas.

Así mismo, se observó que la respuesta inhibitoria de los fitocompuestos fue distinta para cada una de las bacterias, esto según la variedad y el tipo de disolvente utilizado. En los bioensayos realizados con los extractos, los halos de inhibición más grandes a las 24 horas contra *S. Typhimurium*, se observaron con los compuestos de COAE (17.66 mm), COA (14.00 mm) y ABA (13.0 mm), en comparación, el extracto COM solo obtuvo halos de 7.70 mm, siendo el que menor efecto de inhibición mostró para esta bacteria (Cuadro 6). El patógeno *E. coli* fue más susceptible a los compuestos de ABA y COA ya que mostró halos de inhibición más grande en todo el estudio con una media de 20.5 mm y 19.0 mm respectivamente, resultados no reportados por otros investigadores hasta el momento. Los compuestos de ABM no mostraron efecto inhibitorio contra *S. aureus* y *S. flexneri*.

Los extractos TEM, AEN, HN, AEP y HP no presentaron efecto contra ningún patógeno. Sin embargo, esas plantas podrían tener un efecto terapéutico contra las infecciones bacterianas a través de otros mecanismos, tales como la estimulación del sistema inmune (Cortes-López *et al.*, 2014). Para identificar estos posibles mecanismos, es necesario ahondar más en las investigaciones, enfocadas a los distintos mecanismos de la actividad antimicrobiana, otros métodos de extracción o evaluar distintas partes de las plantas que no exhibieron efecto antimicrobiano.

Otros autores han encontrado mayor actividad antimicrobiana en los extractos metanólicos y etanólicos, que los reportados en la presente investigación. Tal es el caso de Borrás *et al.*, 2015, donde reportan halos con el extracto metanólico de *H. sabdariffa* de 16 mm a 22 mm contra *S. aureus* y de 10 mm a 16 mm para *E. coli* con el mismo extracto. Esta actividad antimicrobiana está relacionado con los diferentes métodos de extracción, las condiciones de variedades (tipo de disolvente, la concentración, la hora y la temperatura) pueden afectar el potencial antimicrobiano

(Prenești *et al.*, 2007; Segura-Carretero *et al.*, 2008). Por ejemplo, la actividad antimicrobiana en los extractos etanólicos es mayor por la concentración de contenido de polifenoles en comparación con los extracto acuosos, (Jung *et al.*, 2013).

Higginbotham *et al.*, (2014), reportan que los extractos de *H. sabdariffa* son más eficaces contra *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*, después de un tratamiento térmico (121° C, 30 min) en comparación a los extractos filtrados. Puede ser que en el tratamiento de los extractos con autoclave se pudieron haber producido compuestos más pequeños o adicionales que los presentes en los extractos que solo son filtrados.

**Cuadro 6.**Listado de actividad antimicrobiana de los extractos contra cada patógeno.

Tratamientos	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.flexneri</i>
ABM	9.00±0.57 <sup>a,b</sup>	7.66±0.52 <sup>a,b</sup>	S/A	9.60±0.88 <sup>a,b</sup>	S/A
ABE	9.33±1.52 <sup>a,b</sup>	11.00±0.57 <sup>a,b</sup>	10.46±0.29 <sup>b</sup>	11.60±0.67 <sup>b,c</sup>	8.50±0.28 <sup>a</sup>
ABA	13.00±1.00 <sup>c,d</sup>	20.50±2.00 <sup>c</sup>	15.66±1.20 <sup>c</sup>	18.66±0.88 <sup>e</sup>	12.33±0.88 <sup>c,d</sup>
ABAE	12.20±0.34 <sup>c,b</sup>	10.66±0.66 <sup>a,b</sup>	10.33±0.88 <sup>a,b</sup>	13.66±0.88 <sup>b,c,d</sup>	11.66±0.33 <sup>b,c</sup>
COM	7.70±2.04 <sup>a</sup>	6.56±0.32 <sup>a</sup>	6.53±0.35 <sup>a</sup>	7.06±0.58 <sup>a</sup>	8.66±0.33 <sup>a</sup>
COE	11.33±0.57 <sup>a,b</sup>	7.46±0.29 <sup>a,b</sup>	11.60±0.30 <sup>b</sup>	12.60±0.87 <sup>b,c,d</sup>	9.50±0.28 <sup>a,b</sup>
COA	14.00±1.00 <sup>d,e</sup>	19.00±1.72 <sup>c</sup>	13.00±0.57 <sup>b,c</sup>	16.33±0.88 <sup>d,e</sup>	11.33±0.33 <sup>b,c</sup>
COAE	17.66±2.30 <sup>e</sup>	12.33±0.88 <sup>b</sup>	16.30±1.40 <sup>c</sup>	14.33±0.88 <sup>c,d</sup>	14.33±0.88 <sup>d</sup>
TEM	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
AEN	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
HN	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
AEP	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
HP	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
Tween 80	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A

Medias de tratamientos con diferentes letras en columnas son estadísticamente diferentes (Tukey P≤ 0.05).

S/A: Sin actividad

Numerosos compuestos de *H. sabdariffa* han sido identificados, de muchos de estos se sabe que tienen actividad antimicrobiana, aunque no está claro que compuestos específicos son responsables o si puede haber un efecto sinérgico entre todos o algunos de los compuestos presentes (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011).

Con base en estos resultados podemos afirmar que los compuestos obtenidos con acetato de etilo y acetona, son los que presentan mayor efecto antimicrobiano pero

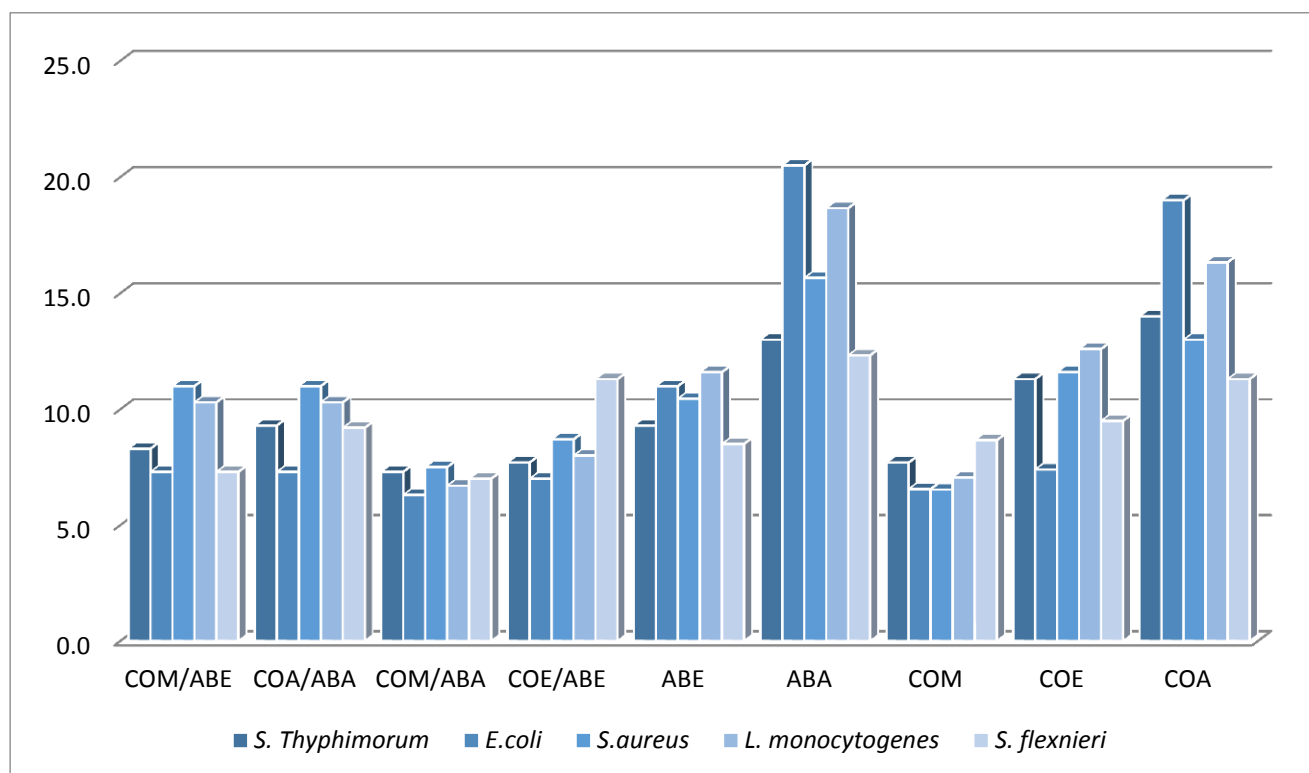
menor rendimiento lo que podría limitar su uso en la agroindustria. A diferencia de los compuestos obtenidos con metanol y etanol que fueron los que presentaron menor efecto pero mayor rendimiento, lo que podría sugerir realizar combinaciones de disolventes al momento de hacer las extracciones o entre extractos. De igual forma los resultados sugieren que los dos genotipos de *H. sabdariffa* contienen diversos compuestos con actividad antimicrobiana con distinta polaridad, lo que puede llegar a afectar su solubilidad en agua, o en este caso con los disolventes etanol y metanol. Esto puede explicar porque los extractos de acetona y acetato de etilo fueron los que mostraron mayor efecto antimicrobiano, indicando que los compuestos antimicrobianos con mayor efecto presentes en el cáliz de la planta son menos polares, descartando que solo los polifenoles presentes que los cálices son los que tienen efecto antimicrobiano.

#### 3.4. Pruebas de susceptibilidad bacteriana contra las combinaciones de extractos mediante el método difusión en agar con discos de papel (Kirby-Bauer).

Es posible que el efecto biológico de los extractos no sea exclusivamente a sus compuestos mayoritarios (alcaloides, ácido ascórbico, anisaldehído, antocianinas,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -sitosterol, ácido cítrico, ácido málico, galactosa, mucopolisacáridos, pectina, ácido protocatecuico, polisacáridos, quercetina, ácido esteárico y cera), (Hirunpanich *et al.*, 2005; Duke *et al.*, 2003; Li-Thomas, 2002), y que otros compuestos acompañantes estén involucrados. Así, la acción combinada de los compuestos presentes en el extracto podría ser más beneficiosa que la observada por los compuestos aislados. Es por esto que en el presente estudio se consideró realizar la mezcla de los extractos obtenidos previamente mediante los distintos métodos de extracción, las combinaciones de extractos entre genotipos de “Alma Blanca” y “Criolla de Oaxaca” de *H. sabdariffa*, se hicieron considerando su rendimiento y el nivel demostrado como agentes antimicrobianos en las pruebas anteriores.

Las combinaciones entre genotipos y disolventes (COM/ABA, COE/ABE, COM/ABE y COA/ABA) mostraron halos de inhibición menores con respecto a los extractos solos (Figura II). Los halos obtenidos con estas primeras combinaciones, resultaron poco beneficiosas, ya que en lugar de existir un sinergismo entre ellos, resultó un efecto antagonista. Tal es el caso de COM/ABA que obtuvo halos de 6.3 mm a 7.5

mm, (Cuadro VII). En este caso el efecto de COM no se vio beneficiado ni perjudicado, pero redujo los obtenidos por ABA, que llego a mostrar halos de hasta 12.3 mm a 20.5mm. Otro ejemplo es COA/ABA, en este particular, el efecto antimicrobiano que mostraron los dos por separados fue mayor (11.3 - 19 mm y 13 - 20.5 mm respectivamente), que los que mostraron al mezclarse, (7.3 mm a 11.0 mm) (Figura II).



**Figura 1.** Comparación de halos de inhibición de extractos solos y combinados entre especies.

La combinación que mostró mayor grado de inhibición, fue entre un mismo genotipo en combinación con los extractos obtenidos con acetato de etilo, tal es el caso de COAE/COM que mostró halos de 21.0 mm, 20.0 mm y 20.3 mm para *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *S. flexneri* respectivamente (Cuadro 7). En este caso los resultados muestran que la combinación de estos dos extractos es prometedora, ya que se potencio el efecto de los dos, en comparación a su efecto de forma individual. De igual forma pasó con la mezcla entre COAE/COE que se obtuvieron medidas de halos de 14.0 mm-18.3 mm superiores a los que obtuvieron por separado (12.3-17.6 y 7.4-12.6 respetivamente). Algunos estudios han concluido que los extractos como un todo tienen mucho mayor actividad antibacteriana que una mezcla de los

componentes principales, lo que sugiere que los componentes de menor importancia son críticos para esta actividad y pueden tener un efecto sinérgico (Burt, 2004). Gutiérrez *et al.* (2008), estudiaron combinaciones de extractos contra *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa* en pruebas *in vitro*. La capacidad de la combinación de los extractos varía según su concentración, sus estudios preliminares mostraron resultados prometedores para el orégano en combinación con la albahaca, el tomillo o mejorana. La mayor parte de las investigaciones sobre *H. sabdariffa* no especifican el origen de la variedad y la ubicación de cosecha del cultivo, por lo que resulta difícil hacer comparaciones entre el perfil fitoquímico y la capacidad antimicrobiana de los extractos obtenidos en los diferentes estudios.

**Cuadro 7.** Efecto antimicrobiano de los extractos combinados frente a los microorganismos

Tratamientos	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S. flexneri</i>
COM/ABA	7.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.3 <sup>a,b</sup>	6.7 ± 0.3 <sup>b,c,d</sup>	7.0 ± 0.6 <sup>a</sup>
COE/ABE	7.7 ± 0.3 <sup>a,b</sup>	7.0 ± 0.6 <sup>a,b</sup>	8.7 ± 0.6 <sup>b,c,d</sup>	8.0 ± 0.3 <sup>b,c,d</sup>	11.3 ± 0.4 <sup>a,b,c,d</sup>
COM/ABE	8.3 ± 0.8 <sup>a,b</sup>	7.3 ± 0.8 <sup>a,b,c</sup>	9.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	10.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	7.3 ± 0.9 <sup>a,b</sup>
COA/ABA	9.3 ± 0.3 <sup>a,b,c,d</sup>	7.3 ± 0.3 <sup>a,b,c</sup>	11.0 ± 0.3 <sup>a,b</sup>	10.3 ± 0.7 <sup>a,b</sup>	9.2 ± 0.3 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>
COM/COE/COA	9.0 ± 0.7 <sup>a,b,c</sup>	9.3 ± 0.3 <sup>a,b,c,d,e</sup>	17.0 ± 1.2 <sup>f</sup>	9.3 ± 0.3 <sup>b,c</sup>	12.7 ± 1.5 <sup>d,e,f</sup>
COE/COA	10.3 ± 0.3 <sup>a,b,c,d</sup>	10.0 ± 0.7 <sup>a,b,c,d,e</sup>	11.0 ± 0.8 <sup>a,b</sup>	12.7 ± 0.3 <sup>a,b</sup>	11.7 ± 0.8 <sup>a,b,c,d</sup>
COM/COA	10.7 ± 0.8 <sup>a,b,c,d</sup>	11.00 ± 0.6 <sup>b,c,d,e,f</sup>	8.7 ± 0.6 <sup>b,c,d</sup>	8.7 ± 0.3 <sup>d,e</sup>	8.7 ± 0.9 <sup>b,c,d,e,f</sup>
COE/COM	10.3 ± 0.8 <sup>a,b,c,d</sup>	9.0 ± 0.7 <sup>a,b,c,d</sup>	8.7 ± 0.3 <sup>a,b</sup>	10.0 ± 0.7 <sup>b,c</sup>	8.0 ± 0.6 <sup>a,b,c</sup>
COAE/COM	18.0 ± 0.7 <sup>g</sup>	14.3 ± 1.5 <sup>f,g</sup>	21.0 ± 0.6 <sup>g</sup>	20.0 ± 0.7 <sup>h</sup>	20.3 ± 0.9 <sup>h</sup>
COAE/COE	16.3 ± 0.3 <sup>g</sup>	18.3 ± 0.3 <sup>f</sup>	14.0 ± 0.6 <sup>d,e,f</sup>	16.3 ± 0.8 <sup>g</sup>	15.6 ± 0.7 <sup>f,h</sup>
COAE/COA	17.3 ± 0.3 <sup>g</sup>	15.0 ± 1.2 <sup>f,g</sup>	16.0 ± 0.6 <sup>e,f</sup>	18.0 ± 0.7 <sup>g,h</sup>	15.0 ± 1.2 <sup>e,f</sup>
ABM/ABE/ABA	11.0 ± 0.6 <sup>b,c,d</sup>	13.3 ± 0.8 <sup>e,f</sup>	15.3 ± 0.7 <sup>e,f</sup>	11.3 ± 0.6 <sup>c,d,e</sup>	12.9 ± 0.5 <sup>d,e,f</sup>
ABM/ABA	10.7 ± 0.3 <sup>a,b,c,d</sup>	11.3 ± 0.3 <sup>c,d,e,f</sup>	10.0 ± 0.6 <sup>a,b</sup>	13.3 ± 0.3 <sup>e</sup>	10.9 ± 0.7 <sup>a,b,c,d,e</sup>
ABE/ABA	12.3 ± 1.5 <sup>f,g</sup>	11.7 ± 0.3 <sup>d,e,f</sup>	13.0 ± 0.6 <sup>c,d,e</sup>	13.0 ± 0.7 <sup>e</sup>	12.2 ± 1.0 <sup>c,d,e,f</sup>
ABM/ABE	12.0 ± 0.6 <sup>c,d,e</sup>	10.0 ± 0.7 <sup>a,b,c,d,e</sup>	10.0 ± 0.6 <sup>a,b,c</sup>	10.3 ± 0.3 <sup>b,c,d</sup>	7.7 ± 0.7 <sup>a,b</sup>
ABAE/ABM	14.7 ± 0.3 <sup>e,f,g</sup>	11.7 ± 0.3 <sup>d,e,f</sup>	14.0 ± 0.6 <sup>d,e,f</sup>	13.7 ± 0.3 <sup>e,f</sup>	12.7 ± 1.2 <sup>d,e,f</sup>
ABAE/ABE	12.7 ± 0.3 <sup>d,e,f</sup>	12.3 ± 1.6 <sup>d,e,f</sup>	13.0 ± 1.2 <sup>c,d,e</sup>	11.3 ± 0.3 <sup>c,d,e</sup>	12.3 ± 0.9 <sup>c,d,e,f</sup>
ABAE/ABA	16.0 ± 1.2 <sup>f,g</sup>	15.0 ± 0.6 <sup>f,g</sup>	15.3 ± 0.3 <sup>e,f</sup>	16.0 ± 0.7 <sup>f,g</sup>	19.9 ± 0.6 <sup>g,h</sup>

Medias de tratamientos con diferente letras en columnas son estadísticamente diferentes (Tukey P ≤ 0.05).

## 4. CONCLUSIONES

1. Se lograron obtener mayores rendimientos con los disolventes orgánicos que con los aceites esenciales, además, los extractos orgánicos fueron más ácidos que los aceites esenciales.
2. De las 4 plantas analizadas y los 13 extractos obtenidos de ellas solo los extractos de *H. sabdariffa* genotipos Alma blanca y Criolla de Oaxaca tuvieron efecto antimicrobiano frente los patógenos evaluados.
3. Los extractos de los dos genotipos de *H. sabdariffa* obtenidos con acetato de etilo y acetona mostraron mayor efecto antimicrobiano que los obtenidos con metanol y etanol, pero menor rendimiento lo que podría limitar su uso en la industria alimentaria.
4. Las combinaciones del mismo genotipo pero diferente disolvente orgánico (COAE/COA y ABAE/ABA), presentaron mejor compatibilidad al probarse sobre los patógenos.
5. Los extractos metanólicos, etanólicos, acetónicos y acetato de etilo de *H. sabdariffa* genotipos Alma Blanca y Criolla de Oaxaca de San Francisco Cozoaltepec, Santa María Tonameca, Oaxaca, tienen efecto antimicrobiano *in vitro*.



## 5. LITERATURA CITADA

- Abu-Tarboush, H. M. 1994. Antibacterial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*L.) and its relation to pH.Egypt. J. FoodSci. 22:317-322.
- Alarcón-Alonso, J., Zamilpaa, A., Alarcón,A.F., Herrera-Ruiza, M., Tortoriello, J. y Jimenez-Ferrera, E. 2012. Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. Journal of Ethnopharmacology 139(1):751-756.
- Ali, B. H., Al Wabel, N., & Blunden, G. 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L. a review.PhytotherapyResearch. 19(5):369–375.
- Amaya, G. M. N., Toledo G. S. L., Ruiz G. C. A. Flores M. M. M. y Casas, S. J. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos Obtenidos por hidrodestilación de acículas de pinos, Probados en *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Avances en la investigación científica en la CUCBA. 19:87-91.
- Bautista, L. H., 2011. Monitoreo del comportamiento de *Escherichia coli* genérica y *Escherichia coli* O157:H7en caldo de cultivo mediante parámetros fisicoquímicos y de cultivo. Tesis de Maestría. 104 p.
- Borras-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-Gonzáles, I., Fernández-Gutiérrez, A. and Gómez-Leyva, J. F. 2015. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*).Industrial Crops and Products. 69(1):385-394.
- Brandi, G., Amagliani, G., Giuditta, F., Schiavano.DeSanti, M. and Sisti, M. 2006.Activity of Brassica oleracea Leaf Juice on Foodborne Pathogenic Bacteria. Journal of Food Protection, 69(9):2274–2279.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications

in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94:223–253.

Castro-Rosas, J. and Escartín E. F. 2000. Survival and Growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology and Safety.* 65:1

Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Acevedo-Sandoval, O. A., Ramírez, C. A., Villagomez-Ibarra., Roberto, J., Hernández, N. C., Villarruel-López, A. and Torres-Vitela, M. R. 2011. Frequency and Behavior of *Salmonella* and *Escherichia coli* on Whole and Sliced Jalapeño and Serrano Peppers. *Journal of Food Protection.* 74(6):874-881.

Vitela, M Del Refugio Cortes-López, H. 2014. Efecto antimicrobiano de extractos de plantas en medios de cultivo de laboratorio y jamón cocido de cerdo. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias. 136 p.

Chantraine, J. M.; Laurent, D.; Ballivian, C.; Saavedra, G.; Ibanez, R. and Vilaseca, A. 1998. Insecticidal activity of essential oils on *Aedes Aegypti* larvae. *Phytother. Res.* 12(1):350–354.

Duarte, M. C. T.; Delarmelina, C. L., Figueira, G. M., Sartoratto, A. and Rehder, V. L. G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8:139–143.

Duke, J. A.; Bogenschutz–Godwin, M.; Duceillier, J. K. and Duke, P. A. 2003. *Handbook of medicinal spices.* CRC Press LLC. New York, USA. 348 p.

Fasoyiro, S. B., Babalola, S.O and Owasibo, T. 2005. Chemical Composition and Sensory Quality of Fruit-Flavoured Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) Drinks. *World Journal of Agricultural Sciences.* 1(2):161-164.

Garg, S. C. and Dengre, S. L. 1986: Antibacterial activity of essential oil of *Tagetes erecta* Linn. *Hind Antibiot Bull.* 28:27–29.

Grover, G. S., Rao, J. T. 1978. *In vitro* antimicrobial studies of the essential oil of *Tagetes erecta*. *Perfum Flav Int.* 3(28):84-90.

- Gutiérrez J; Barry-Ryan C. and Bourke P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124:91-97.
- Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., Davidson, P. M. and Stewart, C. N. 2014. Aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces as an antimicrobial rinse on hot dogs against *Listeria monocytogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Food Control*. 40:274-277
- Hatil, H. K. and Moneer, F. M. 2006. Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Acacia seyal* var. *seyal* and *Sphaeranthussuaveolens* var. *suaveolens* against upper respiratory tract pathogens. *Sudan JMS*. 2(1):121-127.
- Hirunpanich, V.; Utaipat, A.; Morales, N. P.; Bunya-Praphatsaea, N.; Sato, H., Herunsalee, A.; Suthin-Sisang, C. 2005. Antioxidant effect of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28(3):481-484.
- Janakiram, T. and Rao, T. M. 1996: Marigold: *Tagetes* spp. inside cover. *Indian Horticult*, 41(1):307-320.
- Jung, E., YoungJun, K. and Joo, N. 2013. Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Society of Chemical Industry*. 93:3769-3776.
- Li-Thomas, S. C. 2002. Chinese and related north American herbs. *Phytopharmacology and therapeutic values*. CRS Press. New York, USA. 598p.
- Liu, K. S., Tsao, S. M., & Yin, M. C. 2005. *In vitro* antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytotherapy Research*. 19(11):942–945.
- Martínez, M. L., Labuckas, D. O., Lamarque, A. L. and Maestri, D. M. 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 12:1959–1967.

- Mayorga-Reyes, R., Bustamante-Camilo, P., Gutiérrez-Nava, A., Barranco-Florido, E. y Azaola-Espinosa A. 2009. Crecimiento, sobrevivencia y adaptación de *bifidobacterium infantis* a condiciones ácidas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 8(3):259-264.
- Mendonça, R. P. M., Rodilla, J. M., Díez, D., Elder, H., Silvia, G. M., Silva, L. A. and Baltazar, P. E. 2012. Synergistic Antibacterial Activity of the Essential Oil of Aguaribay (*Schinus molle* L.). *Molecules*. 17:12023-12036.
- Muthuvelan, B and Balaji, R. R. 2008. Studies on the efficiency of different extraction procedures on the anti-microbial activity of selected medicinal plants. *World J Microbiol Biotechnol*. 24(1):2837-2842.
- Miller, L. G. And Kaspar, C. W. 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in place cider. *Journal of Food Protection*, 57:460-464.
- Montville, J. T. And Matthews, R. K. 2005. *Food Microbiology an introduction*. ASM Press. American Society for Microbiology, Washington D.C. Capitulo 2 y 9 p. 11-28 y p.111-127. Morton, J. F. 1987. *Fruits of warm climates*. Florida Flair Books. EUA. 2997 p.
- Mounnissamy VM, Kavimani S, Gunasegarn R. Antibacterial from *Hibiscus sabdariffa*. *The Antiseptic*. 2002; 99 (3);81-82.
- Morales-Cabrera, M. Hernández-Morales J, Leyva-Rúelas G, Salinas-Moreno, Y. Soto-Rojas, L. and Castro-Rosas, J. 2013. Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7(31): 2319-2322.
- Nanir, S. P. and Kadu, B. B. 1987. Effect of some medicinal plants extract on some fungi. *Acta Bot Ind*. 15:170–175.
- Nwaiwu, N. E., Mshelia, F. & Raufu, I. A. 2012. Antimicrobial activities of crude extract of *Moringa Oleifera*, *Hibiscus sabdariffa* and *Hibiscus esculentus* seeds against some enterobacteria. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*. 1(1):11-16.

- Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.-P., Bégin, A., 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 37, 155–162.
- Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Isabel C. F. R., Ferreira, F., Ferreres, A., Bento, R. and Seabra, L. 2007. “Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars,” *Food and Chemical Toxicology*. 45(11):2287–2295.
- Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Isabel C.F.R. Ferreira, Bento, A. and Estevinho, L. 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology* 46:2103–2111.
- Penna, C. A., Radice, M., Gutkind, G. O., VanBaren, C., Broussalis, A., Muschietti, L., Martino, V. and Ferraro, G. 1994. Antibacterial and antifungal activities of some Argentinian plants. *Fitoterapia*. 65:172–174.
- Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 48(1):3396–3402.
- Prenci, E., Berto, S., Daniele, Pier, G. and Toso S. 2007. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry*. 100(1):433-438.
- Ramírez-Rodríguez, M. M., Plaza, M. L., Azeredo, A., Ba-Laban, M. O.; Marshall, M. R. 2011. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science* 76(3):428-435.
- Ross, I. A. 2003. *Medicinal plants of the world: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses*. Humana Press Inc. Vol. 1. 454 p.
- Salinas-Moreno, Y., Zúñiga-Hernández, A. R. E., Jiménez-De la Torre, L. B., Serrano-Altamirano, V. y Sánchez-Feria, C. 2012. Color en cálices de

- jamaica(*Hibiscussabdariffa* L.) Y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. Revista Chapingo Serie Horticultura. 18(3):395-407.
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R. M. and Ferreira, M. A. 2004. Quince (*Cydoniaoblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 52:4705–4712.
- Silva, B.; Silva, T.; Franco, E. S., Rabelo, S., Lima, E. R., Mota, R., Câmara, C. G. D., Pontes, F. N. T. and Lima-Filho, J. V. 2010. Antibacterial activity, Chemical composition and cytotoxicity of leave's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinusterebinthifolius*, Raddi). *Braz. J. Microbiol.* 41:158–163.
- Segura-Carretero, A., Puertas-Mejía, M. A., Cortacero-Ramírez, S., Beltrán, R., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., Dinelli, G. and Fernández-Gutiérrez A. 2008. Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight /ion trap). *Electrophoresis* 29(13):2852–61.
- Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R. and Colaric, M. 2006. "Traditional walnut liqueur cocktail of phenolics," *Food Chemistry.* 95(4):627–631.
- Stefanello, M. E. A., Cervi, A. C., Ito, I. Y., Salvador, M. J., Wisniewski, A., Jr., & Simionatto, E. L. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 20(1), 75–78.
- Tajkarimi M. M., Ibrahim S. A, Cliver D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199-1218.
- Tseng, T. H., Hsu, J. D., Lo, M. H., Chu, C. Y., Chou, F. P., Huang, C. L. and Wang, C. J. 1998. Inhibitory effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Lett.* 126(2):199–207.
- Wang, M. L., Morris, B., Tonnis, B., Davis, J., & Pederson, G. A. 2012. Assessment of oil content and fatty acid composition variability in two economically

important Hibiscus species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.  
60(26):6620–6626.

Wimalaratne, P. D. C., Slessor, K. N., Borden, J. H., Chong, L. J. and Abate, T. 1996.  
Isolation and identification of house fly, *Musca domestica*, repellents from  
pepper tree, *Schinus molle* L. *J. Chem. Ecol.* 22, 49–59.

## CAPITULO II

### EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LA COMBINACIÓN DE FITOCOMPUESTOS Y COMBINACIONES CON ACIDO ACÉTICO E HIPOCLORITO DE SODIO EN MANGO “Ataulfo” (*Mangifera indica* L.)

<sup>1</sup>Edgar Reyes-Oregón, <sup>1</sup>Socorro Anaya Rosales, <sup>2</sup>Javier Castro Rosas, <sup>1</sup>Javier Hernández Morales.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados-Programa de Fitosanidad-Entomología y Acarología, Carretera México- Texcoco KM. 36.5, Montecillo, Edo. de México. \*[edgar.reyes@colpos.mx](mailto:edgar.reyes@colpos.mx)

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, 42183 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

## RESUMEN

Se evaluó el potencial antimicrobiano de extractos metanólicos, etanólicos, acetónicos y de acetato de etilo de cálices deshidratados de *Hibiscus sabdariffa*, genotipos “Alma blanca” (AB) y “Criolla de Oaxaca” (CO) solos y en combinación contra los patógenos: *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), y *Escherichia coli* O157:H7 E09 (ATCC 25922), sobre mango “Ataulfo”. Así mismo, se formuló un sanitizante con los extractos que disminuyeron mayor carga bacteriana en mango y se determinó su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). El efecto de los extractos fue diverso según el patógeno. El extracto etanólico de *H. sabdariffa* genotipo CO (COE), tuvo mayor efecto antimicrobiano contra *S. Typhimurium* reduciendo 4.17 Log UFC/cm<sup>2</sup>. Las combinaciones que mostraron compatibilidad fueron el extracto metanólico y acetónico de CO (COM/COA), reduciendo 4.13 Log UFC/cm<sup>2</sup> contra *L. monocytogenes*, la combinación que presentó mayor reducción contra *E. coli* fue el extracto metanólico y acetónico de AB (ABM/ABA) con 3.94 Log UFC/cm<sup>2</sup>. Con el sanitizante que se formuló se logró reducir 4.45, 4.13 y 4.42 Log UFC/cm<sup>2</sup> contra *S. Typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes* respectivamente; la CMI del sanitizante fue de 1 mg/mL. Con el sanitizante formulado se logró aumentar y homogeneizar el efecto antimicrobiano contra los tres patógenos, así mismo se compensó el bajo rendimiento de algunos extractos combinándolos con extractos que presentaron mayor rendimiento pero poco efecto antimicrobiano.



# ANTIMICROBIAL EFFECT OF PHYTOCOMPOUNDS AND COMBINATIONS WITH ACETIC ACID AND SODIUM HYPOCHLORITE IN "Ataulfo" MANGO

<sup>1</sup>Edgar Reyes-Oregón, <sup>1</sup>Socorro Anaya Rosales, <sup>2</sup>Javier Castro Rosas, <sup>1</sup>Javier Hernández Morales.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados-Programa de Fitosanidad-Entomología y Acarología, Carretera México- Texcoco KM. 36.5, Montecillo, Edo. de México. \*[edgar.reyes@colpos.mx](mailto:edgar.reyes@colpos.mx)

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, 42183 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

## ABSTRACT

Antimicrobial potential of methanolic, ethanolic, acetone extracts and ethyl acetate dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L., genotypes "Alma Blanca" (AB) and "Criolla de Oaxaca" (CO) is evaluated alone and in combination against pathogens: *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), and *Escherichia coli* O157: H7 E09 (ATCC 25922) on "Ataulfo" mango. Also, a disinfectant with extracts increased bacterial load decreased handle and determined its minimum inhibitory concentration (MIC) was formulated. The effect of extracts was different depending on the pathogen. The ethanol extract of *H. sabdariffa* genotype CO (COE), had greater antimicrobial effect against *S. Typhimurium* reduced 4.17 log CFU / cm<sup>2</sup>. Combinations showed compatibility methanol extract were the CO and acetone (COM / COA), reducing 4.13 log CFU / cm<sup>2</sup> against *L. monocytogenes*, the combination showed higher reduction against *E. coli* was the methanol extract and acetone AB (ABM / ABA) with 3.94 log CFU / cm<sup>2</sup>. With sanitizer that was formulated it was reduced 4.45, 4.13 and 4.42 log CFU / cm<sup>2</sup> against *S. typhimurium*, *E. coli* and *L. monocytogenes* respectively; sanitizer MIC was 1 mg/mL. With sanitizer formulated was able to increase and standardize the antimicrobial effect against all three pathogens, also the poor performance of some extracts in combination with extracts showed higher performance but poor antimicrobial effect.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las frutas y verduras son importantes componentes de una dieta saludable. Sin embargo, en años recientes, la frecuencia de brotes asociados al consumo de estas se ha elevado (Behorasing *et al.*, 2000; Burnett y Beuchat 2001; Erickson y Doyle, 2007; FDA, 2006).

Existen puntos críticos, en los cuales se puede comprometer la inocuidad de los alimentos (Castro *et al.*, 2004), tal es el caso del mango “Ataulfo”, que durante su acondicionamiento para ser exportado o movilizado al interior del país es necesario someterlo a un tratamiento hidrotérmico para eliminar especies de moscas de la fruta del género *Anastrepha* (DOF, 1999), y es este punto el que representa un riesgo de contaminación con bacterias patógenas. En este sentido, existen varios métodos para reducir la flora superficial de frutas y hortalizas.

Los tratamientos con soluciones sanitizantes se hacen en solución acuosa por inmersión o aspersión. Dentro de los compuestos sanitizantes utilizados para tratar frutas y hortalizas se encuentran: compuestos halogenados, ácidos, amonios cuaternarios y compuestos de oxígeno activo (Garmendia y Vero, 2006). Existen autores que afirman que el lavado de frutas y hortalizas recién cortadas con soluciones sanitizantes es el único paso en la cadena de producción que puede lograr una reducción de microorganismos y patógenos (Wiley, 1994; Beuchat *et al.*, 1998; Allende *et al.*, 2004; Allende *et al.*, 2008). Sin embargo, la información científica disponible sobre la eficacia de muchos métodos de desinfección para reducir las poblaciones de bacterias patógenas en las frutas y verduras es limitada (Lukasik *et al.*, 2003).

Nuevos antimicrobianos de fuentes naturales son herramientas potenciales para ayudar a asegurar la inocuidad de alimentos, ayudando a disminuir el uso de antimicrobianos sintéticos (Higginbotham *et al.*, 2014). Múltiples estudios se han realizado para demostrar la actividad antimicrobiana de *H. sabdariffa* contra una gran lista de microorganismos (Higginbotham *et al.*, 2014).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Acondicionamiento de los mangos ataulfo y sitio del experimento

En esta etapa se probó el efecto antimicrobiano de los extractos y mezclas de estos, previamente obtenidos y que mostraron mayor efecto en su evaluación *in vitro*. Los mangos fueron comprados en la central de abastos de la Ciudad de Pachuca, México, de abril-agosto del 2014. Estos eran trasladados en bolsas al laboratorio de Microbiología de alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, donde se llevaron a cabo las pruebas en mango "Ataulfo". Ya en el laboratorio, eran lavados con agua del grifo y jabón, guardados en bolsas estériles a  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  hasta el día de su uso. Sólo se usaron los mangos libres de defectos visibles (por ejemplo, magulladuras, cortes, podridos, etc.).

### 2.2. Lavado de bacterias con Solución Salina Isotónica (SSI)

Para las pruebas en mango "Ataulfo" se utilizaron los tres siguientes patógenos: *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *L. monocytogenes* (ATCC 19115) y *E. coli* O157:H7 (E09 donada por el Dr. E.F Escartín de la Universidad Autónoma de Querétaro), todas resistentes a rifampicina ( $R^+$ ), (Castro y Escartín, 2000). Estas eran previamente activadas de forma individual en Caldo Soya Tripticaseina (CST) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1/18$  h. Posteriormente a la incubación las cepas fueron lavadas 2 veces con agua peptonada estéril, en una centrifuga digital (Hermlelabnet Z 323 K, Alemania), a 3500/rpm durante 20 min, y re-suspendidas con agua peptonada estéril.

### 2.3. Inoculación de mangos "Ataulfo"

Sobre la cáscara de los mangos previamente lavados, se delimitó un área de  $1\text{cm}^2$  donde se colocó una suspensión de  $10\text{ }\mu\text{L}$  ( $10^7$  UFC/mL), de cada bacteria lavada y se colocaron sobre charolas en una campana de flujo laminar durante treinta minutos. Este procedimiento se realizó para cada bacteria por triplicado. De esta prueba se realizaron conteos de bacterias sin aplicación de tratamientos, para verificar la adherencia de las bacterias al mango.

## 2.4. Preparación de los tratamientos

Para la evaluación de los extractos en este experimento, se realizaron diferentes preparaciones, la primera: extractos solos mezclados con tween 80 (Sigma-Aldrich) al 20% en una relación 1:10 (extracto-tween), la segunda: mezcla entre extractos fueron preparados en proporciones 1:1:1 extracto-extracto-tween 80 al 20% y la tercera: mezcla de extractos con sanitizantes en proporciones 1:1:1 en diferentes concentraciones de cada sanitizante.

## 2.5. Evaluación del potencial antimicrobiano

Después de haber transcurrido los treinta minutos en la campana de flujo laminar, sobre el área inoculada se aplicaban 10  $\mu$ L de cada tratamiento según correspondiera, dejando reposar por 10 minutos. Inmediatamente se cortaron los pedazos inoculados y fueron lavados con agua destilada durante cinco segundos para eliminar los residuos de tratamiento.

## 2.6. Recuento de microorganismos por el Método Vertido en Placa

Después del tratamiento, las áreas tratadas, (trozos de 1  $\text{cm}^2$ ), fueron colocados en bolsas con 10 mL de diluyente de peptona por separado y fueron frotados manualmente durante un minuto por el exterior. De la bolsa de peptona con el trozo de mango se tomó una alícuota de 1 mL y se colocó en una caja Petri, este proceso se repitió tantas veces fueran necesarias para facilitar el conteo de las bacterias que sobrevivieran, finalmente se vertieron 20 mL de Agar Método Estándar (AME) con Rifampicina (100 mL/L), se incubó a 35°C/36 h. Este procedimiento se realizó por triplicado. Finalmente, se realizó el conteo de microorganismos (se realizó el conteo de las primeras tres diluciones).

## 2.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

La CMI se realizó mediante el método de dilución (Vanden y Vlietinck, 1991). Para esto se prepararon tubos con caldo de soya tripticaseína, como medio base, a los cuales se les agregó la combinación de COM/COA+A.A+ NaClO en concentración de 100 a 1 mg/mL. Los tubos fueron inoculados con una suspensión de *S. Typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes* ( $10^6$  UFC / mL). Todos los tubos

inoculados se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Considerando como CMI la última dilución del extracto que inhibió el crecimiento bacteriano después de este tiempo. Se realizaron cuatro repeticiones por experimento.

## 2.8. Análisis Estadístico

La evaluación de la actividad antimicrobiana en mango “Ataulfo” se realizó mediante un diseño experimental completamente al azar con 15 tratamientos y tres repeticiones por cada bacteria (Cuadro I). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) comparando las medias con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia  $p=0.05$ . Para esto se utilizó el programa estadístico SPSS versión 16.0.

**Cuadro. 1** Lista de tratamientos utilizados en la evaluación antimicrobiana sobre mango “Ataulfo”

Nº de estudio	Antimicrobiano	Genotipo	Extracto	Abreviatura
1	<i>H. sabdariffa</i>	Alma blanca	acetónico	ABA
2	<i>H. sabdariffa</i>	Alma blanca	etanólico	ABE
3	<i>H. sabdariffa</i>	Alma blanca	metanólico	ABM
4	<i>H. sabdariffa</i>	Criolla de Oaxaca	acetónico	COA
5	<i>H. sabdariffa</i>	Criolla de Oaxaca	etanólico	COE
6	<i>H. sabdariffa</i>	Criolla de Oaxaca	metanólico	COM
7	<i>H. sabdariffa</i>	Alma blanca	metanólico/ acetónico	ABM / ABA
8	<i>H. sabdariffa</i>	Criolla de Oaxaca	metanólico/ acetónico	COM+ COA
9	<i>H. sabdariffa</i>	Criolla de Oaxaca	acetato de etilo/metanólico	COAE+COM
10	<i>H. sabdariffa</i>	Criolla de Oaxaca	acetato de etilo/metanólico	COAE + COE
11	<i>H. sabdariffa</i>	Criolla de Oaxaca	metanólico/acet ónico/ácido acético	COM+COA+A.A
12	<i>H. sabdariffa</i>	Criolla de Oaxaca	metanólico/acet ónico/hipoclorito de sodio	COM+COA+Na ClO
13	<i>H. sabdariffa</i>	Criolla de Oaxaca	metanólico/acet ónico/ácido acético/hipoclori to de sodio	COM/COA+A.A +NaClO

---

14	Hipoclorito	-----	-----	NaClO
15	Testigo	-----	-----	Testigo

---

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Adherencia de los patógenos

La adherencia de patógenos en productos hortofrutícolas es el primer paso de la patogenicidad (Kondo *et al.*, 2006). Debido a esto, se realizaron estudios preliminares para determinar el nivel de inóculo que podrían retenerse en la superficie del mango. El nivel inicial de inóculo utilizado para los mangos no tratados (testigo), fue de 7 Log UFC/cm<sup>2</sup> de *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, sin embargo, la cantidad de patógenos adheridos a la superficie fue de 4.62, 4.27 y 4.56 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente, estudios como los realizados por Castro-Rosas *et al.*, (2011) reportan la adherencia de *E. coli* y *Salmonella* en Chile serrano de 3,8 hasta 7,9 log UFC, por su parte, Allende *et al.*, (2009), reportan 7 log UFC/g de adherencia en cilantro fresco cortado.

#### 3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *H. sabdariffa* sobre patógenos en mango "Ataulfo"

Los productos químicos que contienen grupos -SH como sulfitos y agentes a base de cloro, son empleados comúnmente en el proceso de desinfección de verduras y frutas frescas cortadas, como las papas (Beltrán, 2005). Sin embargo, existe una preocupación por la aplicación de estos compuestos en productos recién cortados, ya que podría afectar la seguridad humana y el medio ambiente, lo que ha creado la necesidad de investigar alternativas. En este sentido, en esta investigación se llevaron a cabo pruebas para medir el grado de efectividad antimicrobiana de extractos de *H. sabdariffa* en producto fresco (mango "Ataulfo"), con el fin de brindar alternativas en la desinfección de los frutos y hortalizas.

Durante las pruebas se obtuvieron diferentes resultados según el extracto y el patógeno en el que era evaluado. En el estudio uno, se evaluaron extractos solos de *H. sabdariffa* contra los diferentes patógenos. El extracto COE presentó mayor efecto antimicrobiano contra *S. Typhimurium* superviviendo solo 0.45 Log UFC/cm<sup>2</sup> (90.25%) (Fig. 1), este efecto fue mayor al que mostró el hipoclorito contra este mismo patógeno el cual solo pudo reducir 2.25 Log UFC/cm<sup>2</sup> teniendo una eficacia del 48.70 % (Fig.2). Así mismo, COE mostró mayor efectividad contra *E. coli*,

permitiendo una supervivencia de 0.53 Log UFC/cm<sup>2</sup> de este patógeno (Cuadro. 2). *L. monocytogenes* mostró mayor sensibilidad contra COM, reduciendo 4.14 Log UFC/cm<sup>2</sup> teniendo una eficacia del 90.78% (Fig. 3). El efecto bactericida de COE y COM se potencializó al utilizarse directamente sobre el alimento en comparación al que mostraron *in vitro*. Con respecto a los demás extractos evaluados en este estudio, en general, lograron reducir más de 3 Log UFC/cm<sup>2</sup> contra los tres patógenos, superando el promedio de los extractos de plantas y siendo estadísticamente diferente al testigo (bacterias adheridas sin tratamiento) (Cuadro 2).

**Cuadro. 2** Supervivencia de los patógenos (Log UFC/cm<sup>2</sup>) ante los extractos.

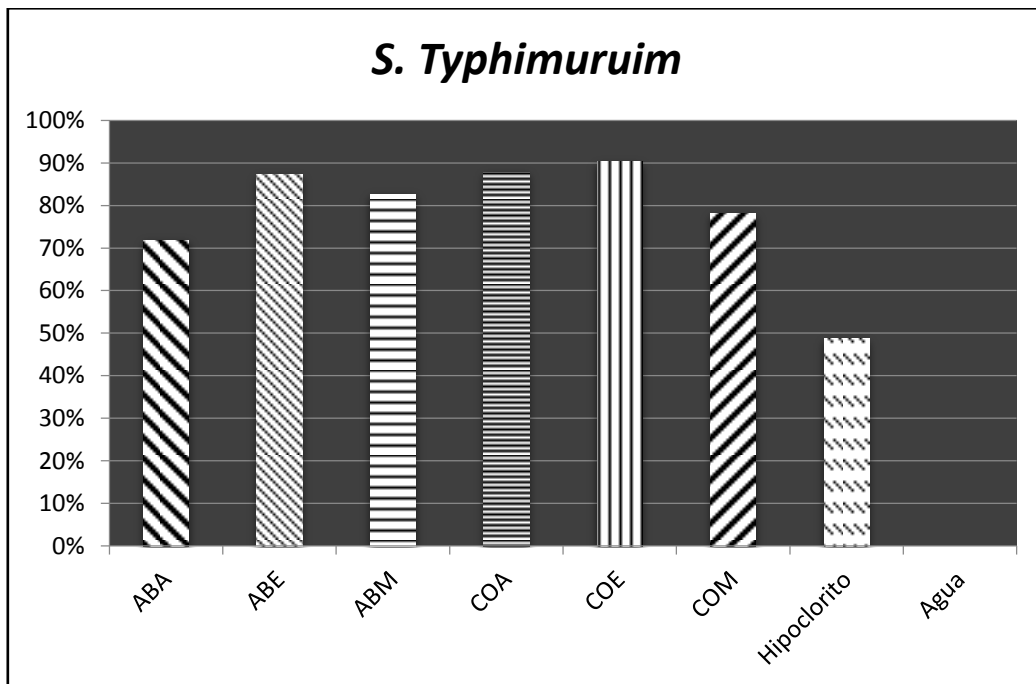
Tratamiento	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
ABA	1.30 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.40 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.27 <sup>a</sup>
ABE	0.59 ± 0.36 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.32 <sup>b</sup>	0.98 ± 0.34 <sup>b</sup>
ABM	0.80 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.37 <sup>a</sup>
COA	0.56 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.34 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.26 <sup>b</sup>
COE	0.45 ± 0.34 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.13 <sup>b</sup>
COM	1.01 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.14 <sup>a</sup>
NaClO*	2.37 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.20 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.24 <sup>b</sup>
Testigo**	4.62 ± 0.11 <sup>d</sup>	4.27 ± 0.15 <sup>c</sup>	4.56 ± 0.05 <sup>c</sup>

Medias con distinta letra en las fila son diferente estadísticamente (Tukey, ≤ 0.05).

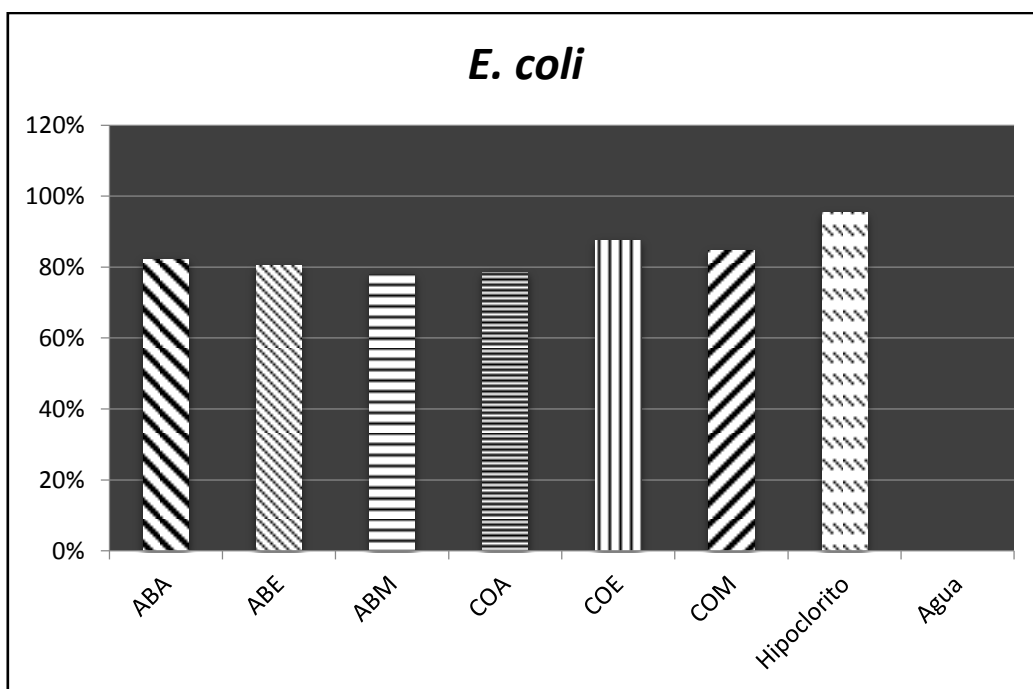
\*NaClO: Hipoclorito sódico (200 ppm)

\*\*Testigo: Adherencia de bacterias en 1 hora.

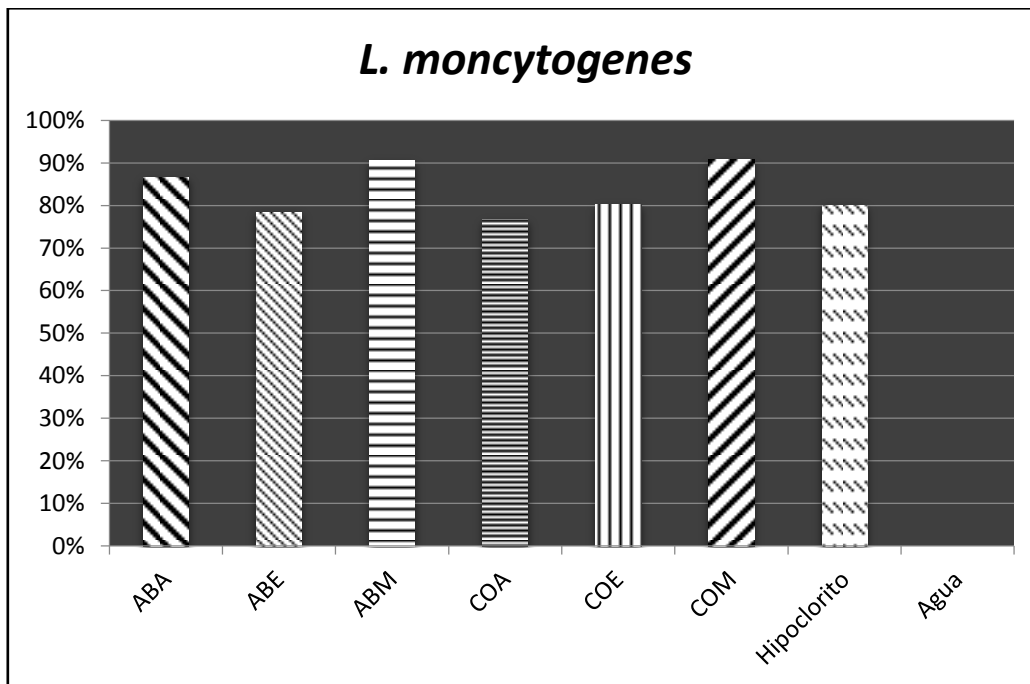




**Figura 1.** Porcentaje eficiencia de inhibición de los tratamientos solos contra *S. Typhimurium*.



**Figura 2.** Porcentaje eficiencia de inhibición de los tratamientos solos contra *E. coli*



**Figura 3.** Porcentaje eficiencia de inhibición de los tratamientos solos contra *L. monocytogenes*.

Los resultados obtenidos, cumplen con lo establecido por la FDA en la norma de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (HACCP por sus siglas en inglés), en la que se afirma que antes del envasado de jugos y frutas los niveles de microorganismos deben estar por debajo de  $5 \log^{10}$  (Parish, *et al.*, 2003). En este sentido, algunos investigadores como López *et al.*, (2011), reportan disminución de 2 Log UFC/g de *E. coli* al aplicar extractos de semilla de toronja (400 ppm) en lechuga, de igual forma, Allende y colaboradores (2009), reportan en cilantro fresco cortado una disminución de 1 log UFC/g y de más de 3 log UFC/g de *E. coli* después de lavar con ácido cítrico (6 g/L) y clorito de sodio acidificado (1 g/L) respectivamente.

Comparando los resultados con los obtenidos por Higginbotham *et al.*, (2014), que probaron extractos acuosos de *H. sabdariffa* (40 mg/mL) frente a *E. coli*O157:H7 y *S. aureus*, donde reportan una disminución de 3 y 2.7 Log UFC/mL respectivamente, después de 24 horas. Podemos afirmar, que los extractos metanólicos, etanólicos, acetónicos y acetato de etilo son más eficaces al probarse sobre los alimentos. Otras medidas que se han probado para reducir significativamente la concentración de patógenos sobre alimentos es lavar con extracto de *Citrus x bergamia* algunos alimentos, como las hojas de col, donde se ha comprobado que reduce cargas microbianas de 5-6 log de bacterias Gram positivas y Gram negativas incluyendo *C.jejuni*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, y *S. aureus* (Fisher y Phillips, 2008).

La aplicación de clorito de sodio acidificado (1.2 g/L) durante un minuto, en frutas y verduras frescas, matan al menos el 99,9% de serotipos de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en zanahorias, col, fresas, tomates, pepinos, lechuga, melón y manzanas (Conner y Beuchat, 1984 y Caldwell *et al.*, 2003). Sin embargo, no se recomiendan concentraciones superiores a 0.2 g/L debido a que se ha observado efectos de deterioro sobre fresas (Allende *et al.*, 2009).

La comparación de resultados con otros trabajos deja en claro que los extractos acetónico de *H. sabdariffa* tienen un gran potencial para usarse en la desinfección de frutas y verduras.

### 3.3. Evaluación de actividad microbiana de los extractos combinados sobre mango "Ataulfo"

A lo largo de este estudio se ha demostrado que los cálices de *H. sabdariffa* contienen compuestos que exhiben actividad antimicrobiana, pero poca investigación se ha realizado sobre su posible utilización en sistemas de alimentos como antimicrobianos. Para conocer, si los compuestos obtenidos mostraban mayor efecto en combinación que de forma individual (sinergismo) o si la combinación de estos mostraba un efecto menor en comparación con la aplicación individual (antagonismo), en el estudio dos, combinaciones de extractos se probaron contra los patógenos antes descritos previamente, de estas las que mostraron mayor compatibilidad frente a *E. coli* fueron el extracto ABM/ABA sobreviviendo solo 0.33 Log UFC/cm<sup>2</sup>; contra *L. monocytogenes*, la combinación que mostró mayor actividad fue COM/COA perdurando 0.43 Log UFC/cm<sup>2</sup>, finalmente, *S. Typhimurium* mostró mayor sensibilidad a la combinación COAE/COM permitiendo una sobrevivencia de 0.63 Log UFC/cm<sup>2</sup> (Cuadro 3). Por el contrario, frente a *L. monocytogenes* ABM/ABA no redujo ni 3 log, lo mismo sucedió con la combinación COAE/COE frente a este mismo patógeno. Sin embargo, todas las combinaciones mostraron mayor efecto con respecto al hipoclorito de sodio. Frente a *S. Typhimurium*, todos los resultados obtenidos fueron estadísticamente diferentes que los testigos.

El grado de inhibición de los extractos sobre los patógenos mostrados en este estudio, concuerdan con otros trabajos similares, en los cuales se sugiere que el lavado convencional y métodos de desinfección de frutas y vegetales en conjunto son necesarios para lograr una desinfección más eficaz, ya que ni usando agentes

sanitizantes nuevos, son capaces de reducir las poblaciones microbianas en más de un 90 o 99%, haciéndolos poco confiables para eliminar todo tipo de patógenos de los tejidos superficiales o internos de alimentos (Beuchat *et al.*, 2001; Sapers, 2001; López *et al.*, 2011), por lo que se recomienda hacer un manejo integral que incluya lavado, desinfección y un correcto almacenamiento. Esto es apoyado por estudios realizados por Park y Beuchat, (1999); González *et al.*, (2004); Ibarra-Sánchez, *et al.*,(2004); Ruiz-Cruz *et al.*, (2007), donde reportan que el tratamiento de lavado con agua por sí solo no logró un cambio significativo en el recuento de patógenos, ya que solo logró reducir 0,5 log UFC/g de *E. coli* O157: H7, *Salmonella* y *L. monocytogenes* en zanahoria picada.

Por otro lado, los resultados obtenidos son ligeramente rebasados por otras alternativas, como las evaluadas por Knight y McKellar (2007), en la que combinaron tratamiento térmicos con la adición de extractos de canela y clavo sobre manzana, logrando reducir 5 log de *E. coli* O157: H7, por el contrario, algunos estudios como el de Gutiérrez *et al.*,(2008), afirman que la actividad antimicrobiana de la combinación de algunos extractos como orégano y tomillo se incrementan al aumentar la concentración de proteína y condiciones de pH moderadamente ácido sobre el alimento.

**Cuadro. 3.** Supervivencia de los patógenos ante las combinaciones de extractos.

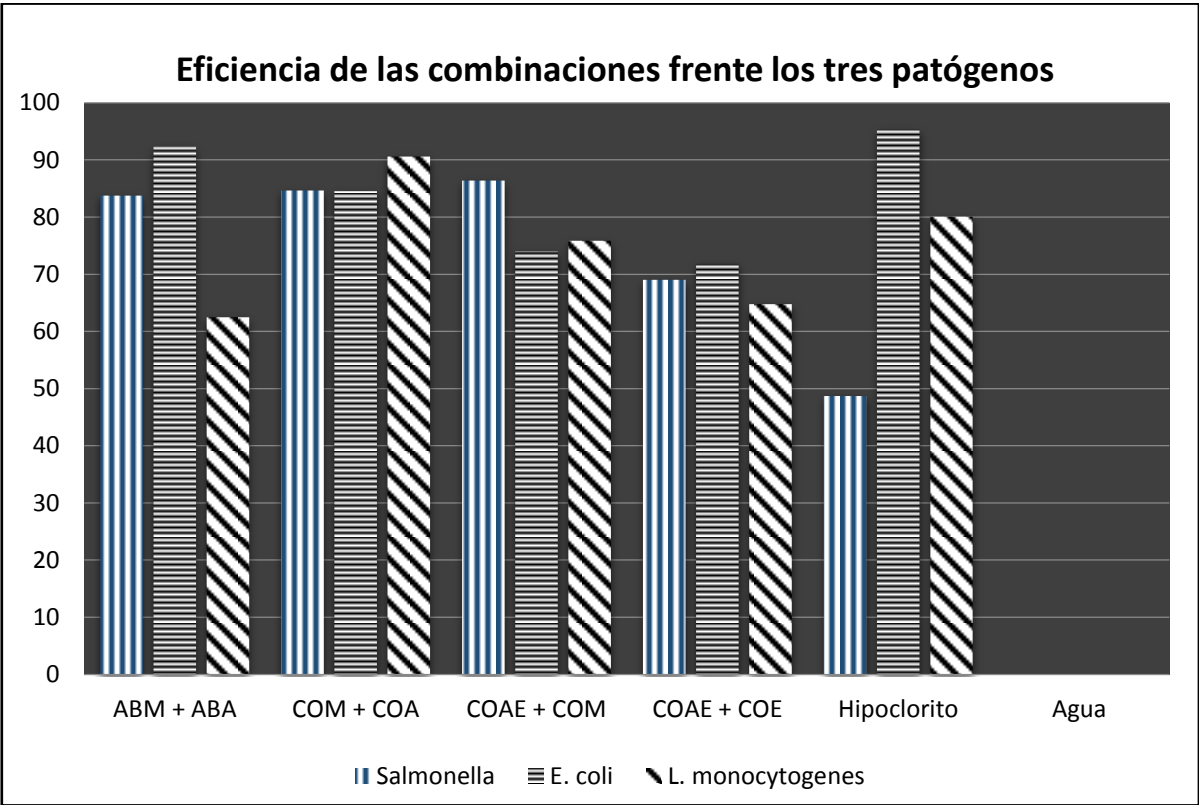
Tratamiento	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
ABM/ABA	0.75 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.12 <sup>b</sup>
COM/COA	0.71 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.31 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.23 <sup>a</sup>
COAE/COM	0.63 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.18 <sup>b</sup>	1.10 ± 0.17 <sup>b</sup>
COAE/COE	1.43 ± 0.6 <sup>b</sup>	1.20 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.60 ± 0.14 <sup>b</sup>
NaClO	2.37 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.20 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.24 <sup>a</sup>
Testigo	4.62 ± 0.11 <sup>d</sup>	4.27 ± 0.15 <sup>c</sup>	4.56 ± 0.05 <sup>c</sup>

Medias con distinta letra en las fila son diferente estadísticamente (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

\*NaClO: Hipoclorito sódico (200 ppm). \*\*Testigo: Adherencia de bacterias en 1 hora.

Se ha demostrado que la efectividad de la actividad antimicrobiana de los extractos en los vegetales son más exitosos contra la flora de deterioro natural y patógenos transmitidos por los alimentos cuando se incorporan al agua con la que son lavados, debido al bajo contenido de grasa de los productos (Tajkarimi *et al.*, 2010).

El realizar combinaciones de extractos toma su importancia de la hipótesis que podrían minimizar las concentraciones de aplicación y, en consecuencia reducir cualquier impacto adverso sensorial en los alimentos. Sin embargo, su aplicación para el control microbiano podría verse afectada por la composición de los alimentos, por lo tanto, se requiere una apropiada y cuidadosa selección de los extractos empleados para asegurar la calidad sensorial y composición del sistema alimentario (Tai-Ti y Tsung-Shi, 2012).



**Figura 4.** Eficiencia de inhibición extractos en combinación contra *S. Typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes*.

### 3.4. Evaluación de actividad microbiana de los sanitizantes sobre mango "Ataulfo"

La sanitización es en la actualidad una necesidad que se debe aplicar a todas las frutas y hortalizas, previo a su consumo para asegurar la calidad e inocuidad de los productos y con esto no generar enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). Debido a que los sanitizantes actúan por contacto, su aplicación debe ser en sistemas que aseguren mantener dicho contacto para que la acción biocida sea efectiva (Castro, 2003).

Es por esto que en esta etapa de la investigación, se desarrollaron 3 diferentes mezclas entre los extractos COM, COA, A. acético e hipoclorito de sodio, la combinación de los dos extractos con A. acético (COM+COA+A. Acético), redujeron 4.03, 3.91 y 3.93 ciclos logarítmicos de UFC/cm<sup>2</sup> de *S. Typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes* respectivamente. A su vez, la mezcla de los dos extractos con hipoclorito de sodio (COM + COA + NaClO) disminuyeron 4.21, 4.09 y 4.46 Log UFC/cm<sup>2</sup> sobre *S. Typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes* respectivamente (Cuadro 4).

La combinación que mostró mayor inhibición fue la que incluía todos los compuestos (COM+COA+A.acético+Hipoclorito), logró disminuir 4.45 (99.99 %), 4.13 (99.99 %) y 4.41 (99.99 %) *S. Typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes* respectivamente. Todos los resultados fueron diferente estadísticamente (Tukey,  $\leq 0.05$ ), con respecto a los testigos, además, los resultados obtenidos con el sanitizante lograron homogeneizar el efecto antimicrobiano contra los tres patógenos, así mismo se compensó el bajo rendimiento de algunos extractos combinándolos con extractos que presentaron mayor rendimiento pero poco efecto antimicrobiano.

La CMI mostrada por la formulación COM/COA+A.A+ NaClO a las 24 h fue de 1 mg/mL.

**Cuadro. 4** Supervivencia de los patógenos ante las formulaciones.

Tratamiento	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
COM+COA+A. Acético	0.59 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.27 <sup>a</sup>
COM+COA+NaClO	0.41 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.17 <sup>b</sup>
COM/COA+A. acético+NaClO	0.17 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.17 <sup>b</sup>
*NaClO	2.37 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.24 <sup>a</sup>
Agua	4.62 ± 0.11 <sup>c</sup>	4.27 ± 0.15 <sup>b</sup>	4.56 ± 0.05 <sup>c</sup>

Medias con distinta letra entre filas son diferente estadísticamente (Tukey,  $\leq 0.05$ ).

\*NaClO: Hipoclorito de sodio (200 ppm).

Los resultados obtenidos con las mezclas son similares a los reportados por Ramírez-Sucre *et al.*, (2009), con la combinación de cloro (100 ppm) y ácido láctico (4%), esta redujo 4.16 y 4.22 log en melón de mesófilos aerobios y coliformes totales respectivamente, en espinaca, la combinación de cloro (200 ppm), más ácido láctico (4%) y ácido acético (1%), redujeron 4.37 y 5.45 log de mesófilos aerobios y coliformes totales respectivamente. Otros estudios, como los realizados por Ukuku (2005), reporta disminuciones menores (2.6 log) a las obtenidas en este estudio al aplicar la combinación de cloro (200 ppm) y peróxido de hidrogeno (2.5 %), sobre melones.

Entre los factores que limitan la eficacia de los tratamientos sanitizantes, están la adherencia bacteriana a la superficie del producto, la presencia de bacterias en sitios inaccesibles, la formación de bio-películas resistentes y la internalización de microorganismos en el producto (Salveit, 2001). De igual forma, es importante considerar que cada tipo de hortaliza o fruta tiene una composición y características físicas únicas y están expuestas a diferentes condiciones durante su producción, almacenamiento y distribución (NACMCF, 1999), esto puede explicar, porque, en algunos estudios mismos tratamientos no muestran resultados iguales al probarse en diferentes productos, por ejemplo, el estudio realizado por Parnell *et al.*, (2005), solo redujo 1.8 log con una concentración de 200 ppm de cloro.

El efecto de soluciones de hipoclorito sobre microorganismos en la superficie de frutas y hortalizas se tiene bien documentado. (Garmendia y Vero, 2006). Lo recomendado por FDA, son concentraciones de 50 a 200 ppm. Estudios demuestran que ni usando la máxima concentración de hipoclorito reduce más de 3 ciclos logarítmicos de patógenos sobre naranjas y perejil (Winniczuk, 1994; Pao y Davis, 1999; Wu *et al*, 2000; Parnell *et al.*, 2005).

En México solo existe un estudio sobre desinfección en mango, donde Castro-del Campo y Chaidez-Quiroz (s/a), reportan que el cloro (50 ppm) reduce 4 log de *E. coli* al aplicarse en el agua del tratamiento térmico al que es sometido el mango después de 90 minutos con una turbidez ligera, al aumentar la turbidez del agua el efecto del cloro se vio afectado demostrando reducción de 2 log.

La reducción de efectividad del cloro en las aguas de enjuague de frutas y hortalizas se debe a la demanda de cloro libre por la materia orgánica presente en los tanques de agua, esto reduce significativamente la actividad bactericida del sanitizante (Block, 2001). En este sentido, se ha demostrado que la inmersión de frutas y hortalizas en agua caliente reduce significativamente carga microbiana (Castro-del Campo y Chaidez-Quiroz s/a; Pao y Davis, 1999; Ben-Yehoshua, 2003; Fan *et al.*, 2008), pero, en caso particular del manejo del tratamiento térmico del mango para controlar las larvas de la mosca de la fruta es perjudicial, ya que, la calidad microbiológica del agua utilizada en el tratamiento presenta bacterias termotolerantes, las cuales pueden permanecer viables después de los tratamientos hidrotermales (Alonso *et al.*, 1999; Sivapalasingam *et al.*, 2003), aunado a esto, hay que considerar la alta capacidad de adherencia de las bacterias al mango demostrada en este estudio y que por consecuencia podría transmitir enfermedades a los humanos.

Finalmente, es importante considerar que los extractos de cálices de *H. sabdariffa* además de tener alto potencial como agente antimicrobiano, también se caracterizan por un grado muy bajo de toxicidad. Badreldin *et al.*, (2005), reportaron una DL 50 del extracto de cáliz en ratas por encima de 5000 mg / kg.



## 4. CONCLUSIONES

Se demostró el potencial que tienen las bacterias *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7y *L. monocytogenes*, para adherirse al mango siendo esto un peligro potencial para el consumidor si no se desinfecta y maneja adecuadamente.

Se comprobó que los cálices de *H. sabdariffa* genotipos Alma Blanca y Criolla de Oaxaca tienen efecto antimicrobiano sobre *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *E. coli*, evaluado sobre mango "Ataulfo", siendo esto un potencial para su uso en la agroindustria con el fin de garantizar la inocuidad de este.

La combinación que mostró mayor inhibición fue la que incluía todos los compuestos (COM+COA+A.acético+Hipoclorito), la CMI de esta combinación fue de 1 mg/mL.

Los fitocompuestos se comportan de manera muy diferente sobre los alimentos en comparación a las pruebas *in vitro*, por eso, es importante evaluar en cada tipo de hortaliza o fruta y así adecuar a cada sistema de producción

## 5. LITERATURA CITADA

- Allende, A., Aguayo, E., and Artés, F. 2004. Quality of commercial minimally processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, 91:109–117.
- Allende, A., Selma, M. V., López-Gálvez, F., Villaescusa, R., and Gil, M. I. 2008. Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 49:155–163.
- Allende, A., McEvoy J., Tao Y. and Luo Y. 2009. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro. *Food Control*. 20:230-234.
- Alonso, J. L., Soriano, A., Carbajo, O., Amoros, I. and Garelick, H. 1999. Comparison and recovery of *Escherichia coli* and Thermo tolerant coliforms in water with chromogenic medium incubated at 41 and 44.5°C. *Applied and Environmental Microbiology*.65:3746-3749.
- Badreldin H. A., Wabel, N. A. and Blunden, G. 2005. Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Hibiscus sabdariffa*L.: A Review. *Wiley InterScience*. 19:369-375.
- Beltrán, D., Selma, M. V., Tudela, J. A. and Gil, M. I. 2005. Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. *Postharvest Biology and Technology*. 37:37-46.
- Ben-Yehoshua, S. 2003. Effect of postharvest heat and UV applications on decay, chilling injury and resistance against pathogens of citrus and other fruits and vegetables. *ISHS Acta Horticulturae*. 599:159-173.
- Block, S. 2001. Disinfection, sterilization and preservation. *Lippincott Williams and Wilkins*. New York, 74-77, 135-157.

- Burnett, S.L. and Beuchat, L.R. 2001. Food-borne pathogens: Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 27: 04–110.
- Behorasing, J., Winkler, S., Franz, P., & Premier, R. 2000. Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* on vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 19:187–192.
- Beuchat, L. R. 1998. Surface disinfection of raw produce. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 12:6–9.
- Caldwell, K. N., Adler, B. B., Anderson, G. L., Williams, P. L., and Beuchat, L. R. 2003. Ingestion of *Salmonella enterica* serotype poona by a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, and protection against inactivation by produce sanitizers. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:4103–4110.
- Castro, E. 2003. Principios de control microbiológico con oxidantes. En línea <http://www.agualatinoamerica.com/docs/PDF/oxidation.pdf> Fecha de consulta: 1 de Junio de 2015.
- Castro, C. N., Chaidez, C., Rubio, C. W. y Benigno, V. T. J. 2004. Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. *Revista Cubana de Salud Pública*. 30(1).
- Castro-Rosas, J. and Escartín. F. 2000. Survival and Growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology and Safety*. 65:1.
- Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Acevedo-Sandoval, O. A., Ramírez, C. A., Villagomez-Ibarra, Roberto, J., Hernández, N. C., Villarruel-López, A. and Torres-Vitela, M. R. 2011. Frequency and Behavior of *Salmonella* and *Escherichia coli* on Whole and Sliced Jalapeño and Serrano Peppers. *Journal of Food Protection*. 74(6):874-881.
- Castro-del Campo, N. y Chaidez-Quiroz, C. S/A. Efecto de la Calidad del Agua y Temperatura en la Descontaminación del Mango. En línea:

[http://sistemanodalsinaloa.gob.mx/archivoscomprobatorios/10\\_articulosrevista\\_arbitraje/424.pdf](http://sistemanodalsinaloa.gob.mx/archivoscomprobatorios/10_articulosrevista_arbitraje/424.pdf) Fecha de consulta: 20 de agosto de 2015.

Cava, R., E. Nowak, A. Taboada, and F. Marin-Iniesta. 2007. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal Food Protection*. 70:2757-2763.

Conner, D. E. and Beuchat, L. R., 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science* 49(1):429–434.

DOF. 1999. NOM-023-FITO-1995. Por la que se establece la Campaña Nacional contra Moscas de la fruta. *Diario Oficial de la Federación*. En Línea: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=693> Fecha de Consulta: 16 de agosto de 2015.

Erickson, M. C., and Doyle, M. P. 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 70(1):2426–2449.

Fan, X; Annous, B.A.; Beaulieu, J.C. and Sites, J.E. 2008. Effect of hot water surface pasteurization of whole fruit on shelf life and quality of fresh-cut cantaloupe. *Journal of Food Science*. 73:91-98.

Fisher, K. and Phillips, C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in Food Science and Technology* 19:156-164

Food and Drug Administration. 2006. The FDA: Fresh Leafy Greens Grown in the United States Are Safe. En Línea: [http://www.fda.gov/fdac/features/2006/606\\_greens.html](http://www.fda.gov/fdac/features/2006/606_greens.html) Fecha de Consulta: 23 de agosto de 2015.

Garmendia, G. y Vero, S. 2006. Métodos para desinfección de frutas y hortalizas. *Catedra de Microbiología. Facultad de Química*. 197:18-27.

González, A., Camargo, N., Castellanos, P., González, G., Perdomo, M., Grillo, M. y Romero, A. 2004. Guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos (VETA) y la investigación de brotes de toxiinfecciones alimentarias. En

Línea:[http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/cursos\\_virtuales/VETA/bibliografia/Guia\\_veta.pdf](http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/cursos_virtuales/VETA/bibliografia/Guia_veta.pdf) Fecha de Consulta: 15 de Junio de 2015.

- Gutierrez J; Barry-Ryan C. and Bourke P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*.124:91-97.
- Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., Michael, D. P. and Stewart, C. N. 2014. Antimicrobial Activity of Hibiscus sabdariffa Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in a Microbiological Medium and Milk of Various Fat Concentrations. *Journal of Food Protection*. 77(2):262-268.
- Ibarra-Sánchez, L. S., Alvarado-Casillas, S., Rodríguez-García, M. O., Martínez-González, N. E., & Castillo, A. 2004. Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemical. *Journal of Food Protection*, 67:353–1358.
- Kondo, N.; Murata, M. and Isshiki, K. 2006. Efficiency of sodium hypochlorite, fumaric acid, and mild heat in killing native microflora and *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* DT104, and *Staphylococcus aureus* attached to Fresh-Cut Lettuce. *Journal of Food Protection*.69 (2): 323-329.
- Kim, T. J., Weng, W. L., Stojanovic, J., Lu, Y., Jung, Y. S., and Silva, J. L. 2008. Antimicrobial effect of water-soluble muscadine seed extracts on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 71(7):1465–1468.
- Knight, K. P., & McKellar, R. C. 2007. Influence of cinnamon and clove essential oils on the D- and Z-values of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2089–2094.
- López, V. L., Romero, R. J. y Ueta, F.V. 2011. Tratamientos de desinfección de lechugas (*Lactuca saliva*) y fresas (*Fragaria chiloensis*). *Alan* 51:4.
- Lukasik, J., Bradley, M. L., Scott, T. M., Dea, M., Koo, A., Hsu, W.-Y. 2003. Reduction of poliovirus 1, bacteriophages, *Salmonella* Montevideo, and

- Escherichia coli O157:H7 on strawberries by physical and disinfectant washes. *Journal of Food Protection*, 66:188–193.
- NACMCF. 1999. National Advisory Committee on Microbial Criteria for Food . Microbial safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Journal of Food Control*. 10:117-143.
- Parnell, T. L., Harris, L. J. and Suslow, T. V. 2005. Reducing Salmonella on cantaloupes and honeydew melons using wash practices applicable to postharvest handling, foodservice, and consumer preparation. *International Journal of Food Microbiology*. 99(1):59-70.
- Parish, E. P., Baum, D., Kryger, R., Goodrich, R., and Baum, R. 2003. Fate of Salmonellae in citrus oils and aqueous aroma. *Journal of Food Protection*, 66(9):1704-1707.
- Pao, S. y Davis, C. L. 1999. Enhancing microbiological safety of fresh orange juice by fruit immersion in hot water and chemical sanitizers. *Journal Food Protection*. 62:756-760
- Park, C. M., and Beuchat, L. R. 1999. Evaluation of sanitizers for killing Escherichia coli O157:H7, Salmonella and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 19:842–847.
- Ramírez-Sucre, M. O., López-Malo, A. y Palou-García, E. 2009. Eficacia de diversos agentes sanitizantes en la sanitización de hortalizas frescas. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos* 3.5-14.
- Ruiz-Cruz, S., Acedo-Félix, E., Díaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M. A. and González-Aguilar, G. A. 2007. Efficacy of sanitizers in reducing Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. *Food Control*. 18:1383-1390.
- Salveit, G. 2001. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology*. 39(4):305-311.

- Sivapalasingam, S., Barret, E., Kimura, A., Van Duyne, S., De Witt, W., Ying, M., Frisch, A., Phan, Q., Gould, E., Shillam, P., Reddy, V., Copper, T., Hoekstra, M., Higgins, C., Sanders, J.P., Tauxe, R.V. and Sluske, L. 2003. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport infection linked to mango consumption: impact in water-dip disinfection technology. *Clinical Infectious Diseases*. 37:1585-1590.
- Tai-Ti, L. and Tsung-Shi, Y. 2012. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. *International Journal of Food Microbiology*. 156(1):68-75.
- Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A, Cliver D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199-1218.
- Ukuku, D. O. 2005. Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella* spp. *International Journal Food Microbiology*. 95(2):137-146.
- Winniczuk, P. P. 1994. Effects of sanitizing compounds on the microflora of orange fruit surfaces and orange juice (M.S). Gainesville (FL): University of Florida Graduate School.
- Wiley, R. C. 1994. Introduction to minimally processed fruits and vegetables. In R. C. Wiley (Ed.), *Minimally processed refrigerated fruits and vegetables*. New York, London, UK: Chapman and Hall. 1–14.
- Wu, F. M., Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Wells, J. G., Mintz, E. D. and Swaminathan, B. 2000. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. *Journal Food Protection*. 63:568-572.