



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA**

**División de Estudios de Posgrado:**

**Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos**

**Control de *Salmonella* en fresa empleando hidrolato de orégano  
y extracto de chaya, ricos en compuestos polifenólicos**

**Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias**

Presenta:

**I.A. Maivelyne Terán Velásquez**

Directora de tesis:

**Dra. Edith Graciela González Mondragón**

Huajuapán de León, Oaxaca, México. Septiembre de 2023

Las actividades de este proyecto de tesis se realizaron en las instalaciones de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca. Laboratorios de Biotecnología, así como de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ubicados en el Edificio de Productos Naturales. Laboratorio de Ciencias de los Alimentos y Microbiología (Instituto de Agroindustrias).

Parte de los resultados generados se presentaron en el 10° Congreso de la Facultad de Ingeniería Química (CONFIQ-10) que se llevó a cabo en Mérida, Yucatán, modalidad oral en línea.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca, por darme la oportunidad recibir una educación de calidad durante mis estudios de Licenciatura y Maestría.

Al CONAHCyT por la beca otorgada (1149843) para realizar mis estudios de posgrado.

A la Dra. Edith Graciela González Mondragón, por haber aceptado ser mi directora de tesis, por su dedicación, paciencia y por todos los conocimientos brindados que sin duda alguna han contribuido en mi formación académica.

A los integrantes del comité revisor: Dra. Beatriz Hernández Carlos (Edificio de Productos Naturales y Alimentos, UTM), Dr. Raúl Salas Coronado (Instituto de Agroindustrias, UTM), M. en C. Alma Yadira Salazar Govea (Edificio de Productos Naturales y Alimentos, UTM), Dra. Aída Irma Gómez Sánchez (Universidad de la Cañada) y Dr. Héctor Manuel Arreaga González (Edificio de Productos Naturales y Alimentos, UTM), por su apoyo en la revisión del documento de tesis, así como orientación y aportes que permitieron mejorar el presente trabajo.

A la M. en C. Alma Yadira Salazar Govea por sus consejos y experiencias compartidas, que sin duda fue una parte importante para la toma de decisiones. Al Dr. Raúl Salas Coronado por todo el apoyo brindado para la continuación y conclusión del posgrado en tiempo y forma. A la Dra. Beatriz Hernández Carlos por proporcionarme la cepa de *Salmonella*, reactivos, así como facilitarme y capacitarme para el uso de las instalaciones del laboratorio de microbiología para llevar a cabo la parte experimental del trabajo.

A la Q.F.B. María Griselda Bravo Villa por su capacitación para la reactivación de la cepa de *Salmonella*. A la Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez por proporcionarme reactivos y

facilitarme el uso del espectrofotómetro en las instalaciones del Laboratorio de Ciencias y Tecnología de los Alimentos (CyTA) (UTM). A la Técnico de Laboratorio I.A. Marlitt Sánchez Cruz por su apoyo en el laboratorio de CyTA.

A la I.A. Joselyn Scarlett Cabrera Villanueva por la obtención del polvo de hojas de chaya que utilicé en las pruebas preliminares de mi proyecto de tesis. A los integrantes del cuerpo Académico UTMIX-CA-029 por proporcionarme el hidrolato de orégano.

A mi compañero, el Biol. Julio César López Enriquez por su apoyo en la toma de fotografías. Al I.A. Luis Barragán Gracida, por su apoyo en la identificación de alcaloides en el extracto de hojas de chaya.

A los profesores que me impartieron clases y que han contribuido en mi formación académica.

A todo el personal administrativo que hicieron posible la gestión de trámites en tiempo y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron para este logro.

## **DEDICATORIAS**

A Dios, por darme la salud, la sabiduría y por permitirme llegar a este momento tan importante de mi formación académica. A mis padres, Guillermina Velásquez Jiménez y Sadot Terán Gopar, por ser los pilares más importantes de mi vida, por todo su amor, por las enseñanzas y por siempre decirme que soy capaz de lograr todo lo que me proponga: gracias mamá porque siempre has estado presente de manera incondicional, me animas en todo y, a cada paso, me recuerdas lo fuerte que soy; gracias papá porque siempre me has dado todo lo que ha estado en tus manos para ser una persona de bien pero además, te agradezco tanto por inculcarme el deseo de la superación, la puntualidad, la responsabilidad, la perseverancia y la dedicación en lo que uno hace. Estoy en deuda con ustedes. A mi hermano, gracias por escucharme, aconsejarme y apoyarme en los momentos en que te he necesitado, gracias por todo tu amor.

En especial dedico esta tesis a mi hija Maivellyne Aroa Serra Terán y a mi esposo German Serra Suarez: hija aunque todavía no lo entiendas eres mi más grande inspiración y mi motivación, gracias a ti deseo continuar creciendo como persona y profesionalmente, gracias por haber llegado a mi vida; gracias a mi compañero de vida, los dos sabemos que no ha sido nada fácil pero estoy segura que todo ha valido la pena, es por ello que, te agradezco el apoyo incondicional y el amor que me has brindado en este proceso, por la comprensión y paciencia, por animarme a no rendirme y por todos los consejos que me has dado cuando he tenido que tomar decisiones en mi vida profesional. Este logro es de los tres y, que esta tesis solo sea un espacio más para plasmar mi gratitud y mi amor hacia ustedes. ¡LOS AMO!

A mis suegros, Petra Suarez Agüero y German Serra Santiago, por adoptarme como una hija más y dejarme ser parte de su familia; gracias por todo el apoyo que me han brindado cuando he necesitado de ustedes. Los quiero y aprecio mucho.

No podían faltar mis cuñis, Adi y Citla gracias por siempre darme palabras de aliento, por considerarme una hermana más, por ayudarme a cuidar a Mai, y por siempre estar pendientes de mis procesos académicos. Las quiero mucho.

A mis amigos, que han hecho más amena la estancia en la universidad, gracias Merary, Ale, Mayra, Jorge, Julio y Luisito.

Finalmente, agradezco a cada una de las personas que sin darme cuenta me dieron un empujón para finalizar este escalón en mi vida profesional. Les agradezco infinitamente.

## RESUMEN

En el presente proyecto de tesis se estudió por primera vez el efecto del extracto metanólico de hojas secas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) e hidrolato de hojas orégano mexicano (*Lippia graveolens*), como alternativas naturales para el control de *Salmonella* en fresas frescas. Primeramente, se reactivó la cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* empleando ensayos establecidos para esta bacteria en Normas y Manuales. Se obtuvo un extracto metanólico a partir de polvo de hojas de chaya por Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), a dicho extracto se le aplicó un proceso de limpieza de clorofilas (ECH). El hidrolato de hojas secas de orégano (HO) se recuperó como el subproducto líquido de la extracción de aceite esencial de esta especie, y no se le aplicó ningún proceso de concentración posterior. La caracterización de las fuentes naturales se hizo con respecto a su contenido de polifenoles totales (CPT) por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por el método del DPPH\*. La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Mínima Bactericida (CMB) por el método cuantitativo en microplaca. Se utilizó una suspensión de *Salmonella*  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL basándose en el estándar 0.5 de McFarland, 24 h de incubación a 37 °C. Como controles de inhibición y esterilidad se utilizaron NaClO a 200 ppm y caldo Mueller-Hinton (MHB). La CMB se hizo con 10 µL de los pozos de la placa del ensayo de la CMI, en los que no se observó crecimiento (turbidez) se inoculó por estriado en agar Mueller-Hinton (MHA) y se incubó a 37 °C por 24 h. En el ensayo de actividad antimicrobiana de ECH en fresas contaminadas con *Salmonella* se utilizó una concentración de 116.44 µg de Equivalente de Ácido Gálico por mililitro (µg EAG/mL) (concentración mayor que la CMB); como control se utilizaron fresas desinfectadas con NaClO a 200 ppm mediante inmersión en una solución salina de fosfatos (PBS) estéril. Se prepararon diluciones seriadas tanto para el experimento con el ECH como para el control y posteriormente se tomaron 100 µL para su crecimiento en agar xilosa lisina dexosicolato (XLD). Estas disoluciones se incubaron a 37 °C por 24 h.

Los resultados del estudio mostraron que el crecimiento de la cepa de *Salmonella* fue acorde con lo publicado para esta bacteria tipificada. El HO no presentó actividad antimicrobiana contra *Salmonella* a las concentraciones ensayadas. La CMI y CMB del ECH fueron de 29.11 µg EAG/mL y 58.22 µg EAG/mL, respectivamente. En el ensayo con fresas, el ECH a una concentración de 116.44 µg EAG/mL logró reducir el crecimiento de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, únicamente creció una colonia en el caso de las fresas rebanadas. Esto sugiere que la chaya puede llegar a emplearse para el control antimicrobiano de *Salmonella* en frutos frescos y dicha capacidad está en función del CPT. Sin embargo, se requiere profundizar en el estudio de la propiedad antimicrobiana de este extracto.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ABREVIATURAS .....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 Generalidades de la fresa .....	4
2.2 Producción de fresa .....	5
2.3 Patógeno transmitido por la fresa: <i>Salmonella</i> .....	8
2.3.1 Infecciones por <i>Salmonella</i> .....	9
2.4 Generalidades del género <i>Salmonella</i> .....	12
2.5 Compuestos químicos de fuentes vegetales .....	17
2.5.1 Compuestos polifenólicos .....	18
2.5.2 Actividad antioxidante .....	20
2.5.3 Actividad antimicrobiana .....	21
2.6 Chaya ( <i>Cnidoscolus aconitifolius</i> ) .....	22
2.7 Hidrolato de la extracción de aceite esencial de hojas de orégano ( <i>Lippia graveolens</i> ) .....	27
2.8 Extracción Asistida por Ultrasonido .....	28
2.9 Compuestos de origen natural con actividad contra bacterias entéricas .....	29
2.9.1 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....	29
3. ESTADO DEL ARTE .....	33
4. JUSTIFICACIÓN .....	34
5. OBJETIVOS .....	35
5.1 Objetivo general .....	35
5.2 Objetivos específicos .....	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
6.1 Equipos, materiales, cepa bacteriana, material vegetal y reactivos .....	37
6.2 Reactivación de la cepa de <i>Salmonella</i> .....	38
6.3 Obtención del extracto de hojas de chaya ( <i>Cnidoscolus aconitifolius</i> ) e hidrolato de orégano ( <i>Lippia graveolens</i> ) .....	40
6.3.1 Adquisición y acondicionamiento de las hojas de chaya .....	40
6.3.2 Obtención del extracto metanólico de chaya ( <i>Cnidoscolus aconitifolius</i> ) .....	40

6.3.3 Limpieza de clorofilas .....	41
6.3.4 Hidrolato de la destilación de hojas de orégano ( <i>Lippia graveolens</i> ) .....	41
6.4 Caracterización del ECH e HO: Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante.....	42
6.4.1 Contenido de polifenoles totales (CPT) .....	42
6.4.2 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método del DPPH* .....	43
6.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida .....	44
6.5.1 Preparación del estándar de McFarland 0.5 .....	44
6.5.2 Obtención de la suspensión bacteriana de <i>Salmonella</i> .....	45
6.5.3 Concentración Mínima Inhibitoria .....	45
6.5.4 Concentración Mínima Bactericida.....	48
6.6 Caracterización de fresas ( <i>Fragaria</i> ).....	48
6.6.1 Adquisición de los frutos de fresa y su acondicionamiento .....	48
6.6.2 Lotificación de fresas frescas y su almacenamiento .....	49
6.6.3 Índice de madurez (IM) de fresas frescas.....	49
6.7 Actividad antimicrobiana de la fuente natural contra <i>Salmonella</i> en fresa .....	50
6.8 Análisis estadístico .....	51
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	52
7.1 Reactivación de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> .....	52
7.2 Contenido de Polifenoles Totales (CPT) y actividad antioxidante (AA) .....	52
7.3 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Mínima Bactericida (CMB).....	55
7.4 Inhibición de <i>Salmonella</i> en fresa fresca .....	66
8. CONCLUSIONES.....	72
9. PERSPECTIVAS .....	73
10. REFERENCIAS .....	75
ANEXO 1. PRUEBA DE ANTIPLAGIO.....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

2.1	Fruto de la fresa ( <i>Fragaria</i> ).....	4
2.2	Producción nacional de fresa en México.....	6
2.3	Valor económico de la producción de fresas en México.....	6
2.4	Situación epidemiológica de la EDA por <i>Salmonella</i> .....	10
2.5	Morfología y estructura del género <i>Salmonella</i> .....	13
2.6	Componentes estructurales en el cuerpo basal del flagelo de una bacteria gram negativa.....	14
2.7	Crecimiento de <i>Salmonella</i> en agar: XLD, VB y EH.....	17
2.8.	Ruta metabólica del ácido shiquímico.....	19
2.9	Clasificación de los compuestos polifenólicos.....	20
2.10	Hojas del género <i>Cnidocolus</i> .....	23
2.11	Principio de cavitación acústica.....	28
2.12	Esquematización del fenómeno de cavitación, colapso y liberación del material vegetal.....	29
6.1	Metodología de la parte experimental del proyecto de tesis.....	36
6.2	Distribución de concentraciones ensayadas del ECH e HO y controles para determinar la CMI.....	47
7.1	Reactivación de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> .....	52
7.2	Curva de calibración para el cálculo del contenido de polifenoles totales.....	53
7.3	Evaluación de la CMI del ECH e HO contra <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> .....	56
7.4	Ensayo de la CMI con el ECH e HO.....	57
7.5	Determinación de la CMB para ECH.....	58
7.6	Réplica de la determinación de la CMB con el ECH.....	59
7.7	Tercer ensayo de la CMI con el ECH.....	60
7.8	Tercer ensayo de la CMB con el ECH.....	60
7.9	Identificación de alcaloides en el ECH con el reactivo de Dragendorff.....	64
7.10	Posible mecanismo de la actividad antimicrobiana de los ácidos ferúlico y <i>p</i> -cumárico contra <i>Salmonella</i> . ....	65
7.11	Fresas utilizadas para los ensayos de actividad antimicrobiana contra <i>Salmonella</i> .....	66
7.12	Fresas utilizadas en la prueba del efecto inhibitorio del ECH contra <i>Salmonella</i> .....	67
7.13	Solución homogénea de fresas en PBS estéril.....	68
7.14	Crecimiento de <i>Salmonella</i> en XLD.....	68
7.15	Fresas enteras utilizadas en la prueba del efecto inhibitorio del ECH contra <i>Salmonella</i> .....	69
7.16	Crecimiento de <i>Salmonella</i> en XLD.....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

2.1	Composición química de la fresa .....	7
2.2	Alimentos contaminados con <i>Salmonella</i> causantes brotes de infección.....	9
2.3	Condiciones óptimas de crecimiento de <i>Salmonella</i> .....	16
2.4	Compuestos identificados en especies del género <i>Cnidocolus</i> .....	25
2.5	CMI de extractos vegetales contra <i>Salmonella</i> en alimentos frescos....	31
3.1	Productos químicos en el control de <i>Salmonella</i> en fresa.....	33
7.1	Obtención del extracto metanólico de polvo de hojas de chaya.....	53
7.2	Caracterización del extracto metanólico e hidrolato con respecto al CPT y AA.....	54

## ABREVIATURAS

AA	Actividad antioxidante
AG	Ácido gálico
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CPT	Contenido de polifenoles totales
DGE	Dirección General de Epidemiología
DNASA	Agar enzima desoxirribonucleasa
DPPH <sup>*</sup>	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
ECD	Extracto estandarizado de semillas cítricas y glicerina
ECH	Extracto metanólico de hojas de chaya con limpieza de clorofilas
EH	Agar Entérico de Hektoen
FAO	Organización Mundial de la Alimentación
FAOSTAT	Base de datos estadísticos corporativos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación
FD	Factor de dilución
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (por sus siglas en inglés)
HO	Hidrolato de la destilación de aceite esencial de hojas de orégano
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (por sus siglas en inglés)
HPLC-DAD-ESI-MS	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos y espectrometría de masas (por sus siglas en inglés)
IM	Índice de madurez
ISP	Instituto de Salud Pública de Chile
MHA	Agar Mueller-Hinton
MHB	Caldo Mueller-Hinton
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución salina de fosfatos (por sus siglas en inglés)
RP-HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa con arreglo de diodos (por sus siglas en inglés)
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad, y Calidad Agroalimentaria
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SS	Agar Salmonella-Shigella
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPLC-QTOF	Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas con analizador cuádruplo de tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)
VBB	Caldo Verde-Brillante Bilis al 2 %
XLD	Agar xilosa lisina desoxicolato

## 1. INTRODUCCIÓN

El fruto de la fresa (*Fragaria*) a nivel mundial es altamente consumido en fresco por sus características sensoriales y propiedades nutricionales (Fierascu et al., 2020), así como, en una amplia gama de productos procesados: congelados, enlatados, deshidratados, mermeladas, concentrado de jugos, licores, barras de cereales, en panadería, en productos lácteos, para impartir aroma en helados y yogures, extendiendo la vida de anaquel de éste fruto (Giampieri et al., 2012; Hussain et al., 2021). Además, la fresa contiene flavonoles, flavanoles, antocianinas, elagitaninos, ácidos fenólicos, vitaminas (Hussain et al., 2021); a dichos compuestos se les han atribuido propiedades benéficas para la prevención de enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, obesidad, por lo que es considerado un alimento funcional (Giampieri et al., 2012; Fierascu et al., 2020; Hussain et al., 2021).

Por otro lado, los alimentos que se comercializan en fresco pueden contaminarse cuando no se aplican buenas prácticas de higiene desde su cultivo, cosecha y postcosecha, así como por procesos de desinfección ineficientes (Contreras-Soto et al., 2019). En el 2003, en Estados Unidos se tuvo un brote infeccioso causado por *Salmonella* spp. en el fruto de la fresa (Pérez-Lavalle et al., 2021). Dicha bacteria fue catalogada por la OMS en el 2017 como un patógeno que representa una amenaza para la salud humana a nivel mundial, y que puede provocar diarreas agudas e incluso la muerte (Manso et al., 2021).

*Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo anaerobio gram negativo, no encapsulado, no esporulante, y posee antígenos flagelares, somáticos y de cubierta exterior característica (Kaur y Jainista, 2012). Tiene la capacidad de adaptarse y sobrevivir en temperaturas de refrigeración, pHs ácidos, concentraciones elevadas de sal y baja actividad de agua (González-Salas et al., 2023).

Hasta el momento, el hipoclorito de sodio (NaClO) es el desinfectante químico con mayor efecto contra *Salmonella* presente en frutas y vegetales frescos (Cortés-Higareda et al., 2021); sin embargo, los inconvenientes de su uso son:

1. La reducción de la cantidad de cloro disponible para la desinfección porque puede reaccionar con los compuestos orgánicos de los alimentos (Yen-Con y Waters, 2017).
2. La producción de especies de cloro ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{HCOI}$  y  $\text{ClO}^-$ ) dependiendo del pH, que a su vez reaccionan con los compuestos orgánicos presentes formando subproductos como cloraminas, ácidos haloacéticos y trihalometanos (THM), estos últimos a largo plazo y a dosis elevadas han mostrado ser cancerígenos en animales de experimentación (roedores) (FAO y WHO, 2009).

Por lo tanto, los desinfectantes a base de productos naturales, como la chaya (*Cnidioscolus aconitifolius*) y el orégano (*Lippia graveolens*), se consideran una alternativa importante para el control de esta bacteria en frutas y vegetales como la fresa, principalmente por la presencia de compuestos del grupo de los polifenoles que poseen actividad antimicrobiana (Coppo y Marchese, 2014).

Los polifenoles presentes en el material vegetal se extraen por diferentes métodos. Uno de los más utilizados es la Extracción Asistida por Ultrasonido (EUA) que se basa en el fenómeno de cavitación, el cual provoca la formación e implosión de burbujas sobre la matriz vegetal, lo que permite la difusión de dichos compuestos hacia el disolvente (Chemat et al., 2017).

Por otro lado, mediante pruebas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria se determina la sensibilidad de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos. En este caso, metabolitos secundarios principalmente del grupo de los polifenoles.

El presente proyecto de tesis tuvo como objetivo estudiar el extracto metanólico de hojas de chaya y el hidrolato de orégano (subproducto de la destilación por arrastre de vapor del aceite esencial de las hojas de orégano) para el control de *Salmonella* en fresa. En trabajos previos del grupo de investigación, demostraron que estas fuentes naturales contienen polifenoles con posible actividad antimicrobiana.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades de la fresa

La fresa también es conocida como frutilla, pertenece a la familia Rosaceae y al género *Fragaria*, su nombre proviene del latín *fraga* que significa “fragancia”. Las variedades comerciales son híbridos de *F. chiloensis* y *F. virginiana* cuyo origen es chileno y del Este de Norteamérica, respectivamente (Hussain et al., 2021; Kirshchbaum, 2022). Su longitud puede variar entre 5-10 cm y el ancho de 2-3 cm (Fierascu et al., 2020). Botánicamente, la fresa es un sistema floral con muchas semillas (aquenios) incrustadas en la superficie del fruto, tiene forma de corazón y es de color rojo brillante (Figura 2.1), por la presencia de pelargonidina 3-glucósido y cianidina 3-glucósido (Alvarado Cepeda, 2020).



**Figura 2.1.** Fruto de la fresa (*Fragaria*).

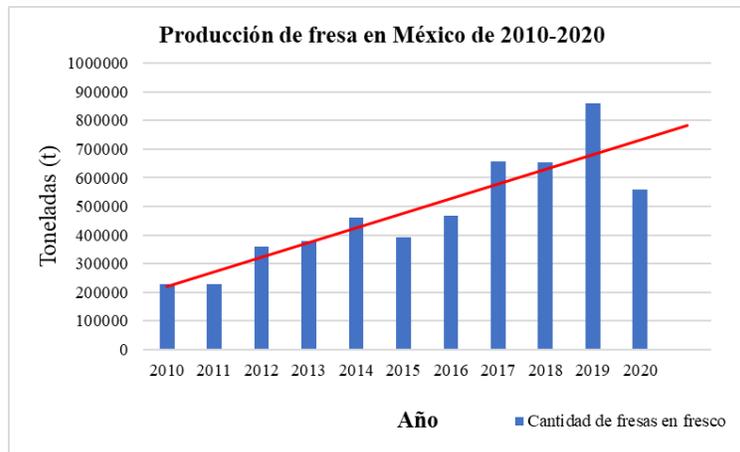
En la NMX-FF-062-SCFI-2002 se establecen seis estadios de madurez de la fresa considerando la proporción pigmentada de su epidermis en una escala de 0 (fruto de color blanco verdoso bien desarrollado o de madurez fisiológica) a 6 (el color rojo intenso cubre todo el fruto), en este punto máximo de la escala las fresas poseen madurez de consumo, lo que implica que su estado fisiológico presenta las características físicas, químicas y sensoriales apropiadas para su consumo. También se suele utilizar el índice de madurez que

se calcula a partir de los grados Brix y la acidez titulable. Los °Brix se definen como “el porcentaje de sólidos disueltos en producto derivado de las frutas o de algún líquido azucarado” (NOM-173-SCFI-2009). Por otro lado, el contenido alto de ácidos orgánicos (cítrico, por ejemplo) se evalúa mediante el parámetro de la acidez titulable (acidez libre) por medio de su neutralización con una base fuerte como el NaOH, hasta que se alcanza un valor específico de pH medido por un potenciómetro. El índice de madurez de los frutos de fresa con madurez de consumo depende de la variedad y se pueden tomar valores entre 5 y 14 (López-Valencia et al., 2018).

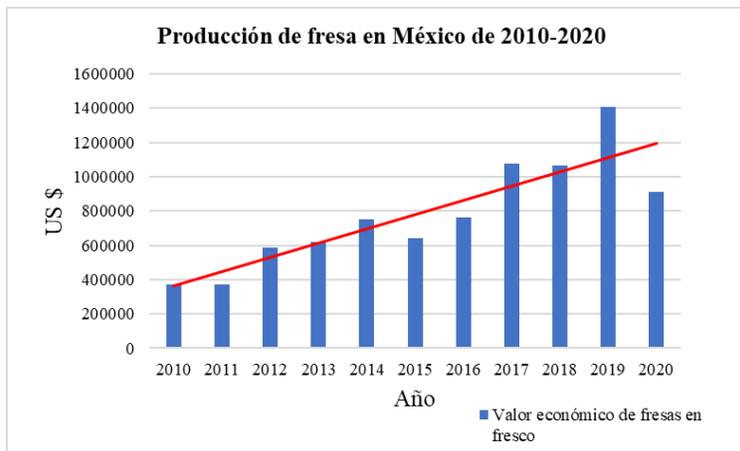
## **2.2 Producción de fresa**

Las condiciones climáticas que favorecen el cultivo de la planta de fresa son suelos ricos en materia orgánica, aireados, buen drenado, pero con cierta capacidad de retención de agua, pH entre 6 y 7, así como temperatura de 15-20 °C; su distribución a nivel mundial es diversa geográficamente siendo los principales productores China, Estados Unidos, México, Turquía, y Egipto (FAOSTAT, 2019).

La producción de fresa en México en 2016 fue de 468.25 Megatoneladas (Mt) y más del 50 % se exportó en fresco a Canadá, Brasil y Estados Unidos, representando un valor económico mayor a los 650 millones de dólares (SAGARPA, 2017); el resto fue para consumo interno, esto expone la gran demanda comercial por este fruto. En las Figuras 2.2 y 2.3 se exhiben el histórico de la producción para fresa en fresco y la derrama económica, respectivamente (FAOSTAT, 2023).



**Figura 2.2.** Producción nacional de fresa en México. Tomado de FAOSTAT (2023).



**Figura 2.3.** Valor económico de la producción de fresas en México. Tomado de FAOSTAT (2023).

Además, México fue el tercer exportador de fresas a nivel mundial durante el periodo 2010-2020 (FAOSTAT, 2023); se proyecta para el 2030 un aumento global en la demanda de este fruto y a nivel nacional será 1.3 veces más Megatoneladas (SAGARPA, 2017). Lo anterior expone la importancia comercial de la fresa.

La gran demanda de la fresa para su consumo a nivel mundial está relacionada con su color, sabor y aroma característicos, así como a su contenido de nutrientes (Tabla 2.1) (Fierascu et al., 2020). Se consume en fresco o en productos procesados mediante los cuales se logra extender la vida de anaquel de la fresa (Giampieri et al., 2012; Hussain et al., 2021):

congelados, enlatados, deshidratados, mermeladas, concentrado de jugos, licores, barras de cereales, en panadería, en productos lácteos (imparte aroma en helados y yogures).

**Tabla 2.1.** Composición química de la fresa.

<b>Componentes</b>	<b>g/100 g</b>
Agua (g)	89.97
Energía (kcal)	35
Proteína (g)	0.43
Grasa total (g)	0.11
Carbohidratos (g)	9.13
Fibra (g)	2.1
Calcio (Ca) (mg)	16
Hierro (mg)	0.75
Magnesio (mg)	11
Fósforo (mg)	13
Potasio (mg)	148
Cobre (mg)	0.05
Vitamina C (mg)	41.2
Vitamina E (mg)	0.30
Niacina (mg)	0.46

Tomado de Hussain et al. (2021)

La fresa posee otros compuestos como flavonoles, flavanoles, antocianinas, elagitaninos, ácidos fenólicos, vitaminas. El grupo de los fenólicos tienen propiedades benéficas para la prevención o tratamiento de enfermedades de los consumidores, entre ellas, cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y la obesidad (Giampieri et al., 2012; Fierascu et al., 2020; Hussain et al., 2021).

### **2.3 Patógeno transmitido por la fresa: *Salmonella***

Las tendencias actuales por una alimentación saludable han propiciado un aumento en el consumo de frutas y hortalizas en fresco (Kowalska, 2023); sin embargo, se tiene el riesgo de la presencia de microorganismos patógenos si no se aplican las buenas prácticas de higiene durante su cultivo, cosecha y manejo postcosecha. La inseguridad se incrementa principalmente con el uso de agua de riego contaminada, la falta de higiene por parte del personal durante el trabajo de campo, uso de estiércol con un compostaje inadecuado y el cambio climático (Wang et al., 2018; Pérez-Lavalle et al., 2021; Kowalska, 2023).

Como se muestra en la Tabla 2.2 el género *Salmonella* ha estado asociado con brotes de enfermedades transmitidas por vegetales y frutos (Pérez-Lavalle et al., 2021), debido probablemente a procesos ineficientes de desinfección del fruto (Contreras-Soto et al., 2019). Por lo tanto, las infecciones transmitidas por frutos siguen siendo un problema mundial a pesar de las mejoras en el sistema de salud pública (Kowalska, 2023).

En el aspecto microbiológico los frutos rojos se consideran alimentos seguros porque poseen un pH ácido; no obstante, se han reportado brotes de toxiinfección asociados al consumo de estos, provocados por la contaminación con bacterias patógenas como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* (Viñas et al., 2020). Por ejemplo, las fresas son frutos portadores de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (Ortiz-Solá et al., 2022). Las principales fuentes de contaminación de la planta de fresa por *Salmonella* es el contacto directo con el suelo (Kowalska, 2023) o que normalmente no llevan un proceso de lavado ni desinfección para su comercialización después de su cosecha porque se reducen sus atributos sensoriales y, por lo tanto, disminuye su vida útil (Wang et al., 2018).

**Tabla 2.2.** Alimentos contaminados con *Salmonella* causantes de brotes de infección.

Alimento	Año	Cepa	Lugar de origen	Referencia
Fresa	2003	<i>Salmonella</i> spp.	Estados Unidos	CDC <sup>a</sup> (2018). Pérez-Lavalle et al. (2021).
Jitomate	2006	<i>S. Typhimurium</i>	Estados Unidos	Cortés-Higareda et al. (2021).
Jitomate	2008	<i>Salmonella</i>	Estados Unidos	Hussain y Dawson (2013).
Papaya de Campeche, Colima y Jalisco	2017	<i>S. Thompson</i> , <i>S. Agona</i> y <i>S. Gaminara</i>	Estados Unidos	FDA <sup>b</sup> (2017).
Fresa	2018	<i>Salmonella</i>	Estados Unidos	CDC <sup>a</sup> (2018). Pérez-Lavalle et al. (2021).
Se desconoce el origen de la contaminación	2022	<i>S. Enteritidis</i>	Restaurante Buba Noodle Bar, Ciudad de Manchester, New Hampshire	SENASICA <sup>c</sup> (2022).
Ensalada a base de lechuga iceberg, pepino y chícharo	2022	<i>Salmonella</i> spp.	Finlandia	SENASICA <sup>c</sup> (2022).
Cebolla de Chihuahua	2022	<i>S. Oranienburg</i>	Estados Unidos	SENASICA <sup>c</sup> (2022).
Germinado de alfalfa	2022	<i>S. Typhimurium</i>	Estados Unidos	SENASICA <sup>c</sup> (2023).
Chile Cayena molido, originario de Nuevo Casas Grandes, Chihuahua, México	2023	<i>Salmonella</i> spp.	Estados Unidos	SENASICA <sup>c</sup> (2023).

<sup>a</sup> Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

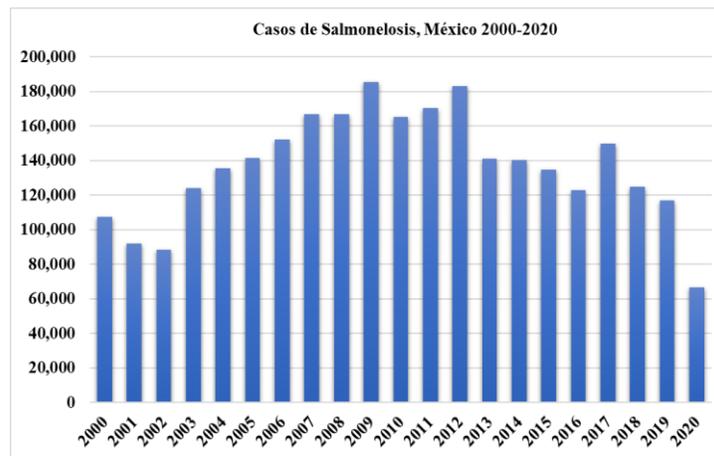
<sup>b</sup> Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés).

<sup>c</sup> Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad, y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

### 2.3.1 Infecciones por *Salmonella*

Dentro de los patógenos de atención prioritaria a nivel mundial se encuentra *Salmonella* debido a que representa una amenaza para la salud humana. En el 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos donde se incluyeron 12 familias de bacterias entre las que se localiza *Salmonella* (Manso et al., 2021). En el 2015, *Salmonella enterica* no tifoidea fue uno de los agentes etiológicos que causó enfermedades diarreicas y 230,000 muertes (OMS, 2015). En México, el Sistema Nacional de Vigilancia

Epidemiológica (SINAVE) reportó 8,800 casos por salmonelosis en el país (Contreras-Soto et al., 2019); también dio a conocer la tendencia entre el 2000 y 2020 de las enfermedades diarreicas agudas en el país causadas por *Salmonella* (Figura 2.4), teniéndose un máximo de casos (185,290) en 2009, una disminución (116,925) del 2013 al 2019 y solamente 50,478 casos en el 2020 (DGE, 2022).



**Figura 2.4.** Situación epidemiológica de EDA por *Salmonella*. Tomado de DGE (2022).  
EDA: Enfermedades Diarreicas Agudas.

### *Síntomas y tratamiento de la infección en humanos*

En personas sanas, la salmonelosis es una infección autolimitada (asintomática o levemente severa), pero en niños, ancianos o inmunodeprimidos, esta enfermedad puede provocar complicaciones graves y posiblemente la muerte (Khan, 2014). Para que se presente una infección por *Salmonella*, lo primero que debe ocurrir es la transmisión de la bacteria por medio de alimentos contaminados a un huésped susceptible. La dosis del patógeno varía entre  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^6$  bacterias aunado al estado fisiológico del huésped (Darwin y Miller, 1999; Kaur y Jainista, 2012).

La enfermedad puede llegar a prolongarse hasta la cuarta semana sin el diagnóstico y/o tratamiento correcto (Kaur y Jainista, 2012). A continuación, se presentan los síntomas clínicos asociados a la infección por *Salmonella*:

1. Primera semana: Bacteriemia y fiebre, así como escalofríos, cefalea, anorexia, dolor de garganta, mialgias, psicosis y confusión mental en un 5-10 % de los casos. También se llegan a presentar manifestaciones como la lengua saburral (capa blanquecina), el abdomen sensible, la hepatomegalia (agrandamiento del hígado) y la esplenomegalia (agrandamiento del bazo).
2. Segunda semana: Entre el 5-30 % de los casos aparecen en el abdomen y pecho manchas rosadas de 2-4 mm de diámetro aprox., lesiones maculopapulares eritematosas (erupciones cutáneas). También puede presentarse bradicardia relativa asociada con fiebre, estreñimiento intestinal o diarrea en menor número de pacientes (principalmente en niños pequeños y adultos con infección por VIH).
3. Tercera semana: Se intensifican lesiones inflamatorias en la mucosa intestinal. Se produce una hiperplasia linfoide (crecimiento de tejido) en el área ileocecal seguida de ulceración y necrosis (muerte celular), con sangrado o perforación intestinal. Lo que deriva en la aparición de síntomas clínicos como ictericia (muerte de hepatocitos y activación de colangiocitos) y aumento de la actividad enzimática de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), glutamil transpeptidasa, fosfatasa alcalina, etc. Complicaciones adicionales en esta semana de la enfermedad puede provocar la muerte en el 10-15 % de los pacientes.
4. El 90% de los supervivientes que no tuvieron tratamiento con antibiótico muestran disminución de la fiebre en la cuarta semana de iniciada la infección. Sin embargo, la debilidad y la pérdida de peso pueden persistir durante meses.

En el tratamiento contra la salmonelosis se utilizan antibióticos como amoxicilina, cotrimoxazol y cloranfenicol, así como hidratación con electrolitos. Desafortunadamente, cada vez los serotipos de *S. Typhi* son más resistentes lo que provoca que la fiebre tifoidea sea más difícil de diagnosticar y tratar (Calva, 2009; Kaur y Jainista, 2012).

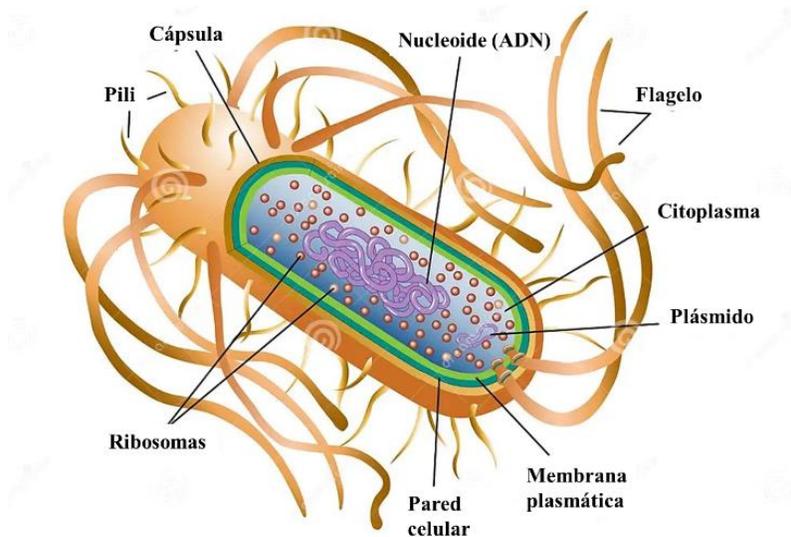
Todo lo que se expuso enfatiza la importancia a nivel mundial y nacional, que tienen las infecciones ocasionadas por *Salmonella* como agente causal agresivo y de mayor incidencia. Por lo tanto, es necesario continuar investigando nuevas estrategias que garanticen su eliminación para tener alimentos frescos inocuos para los consumidores. En este contexto los productos naturales con actividad antimicrobiana, en específico contra *Salmonella*, son relevantes para su investigación.

#### **2.4 Generalidades del género *Salmonella***

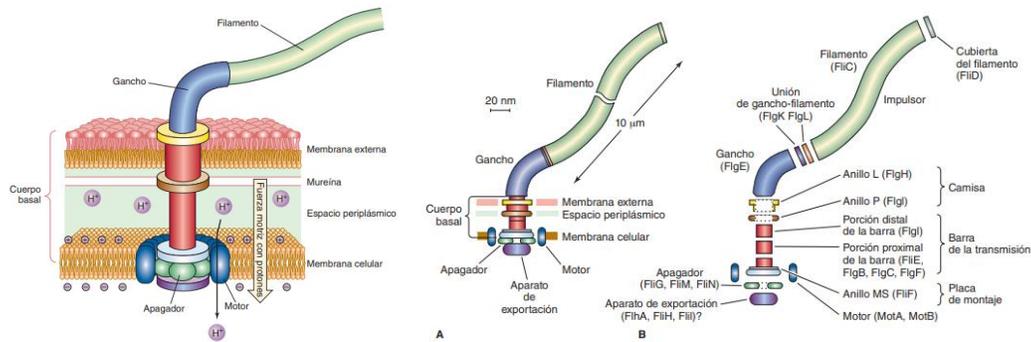
Theobald Smith en 1855 descubrió y aisló *Salmonella* a partir de los intestinos de cerdos y se nombró así en honor al Dr. Daniel Elmer Salmon, patólogo estadounidense que trabajó con Smith (Eng et al., 2015; Popa y Popa, 2021). Es importante resaltar que la taxonomía de esta bacteria es compleja y en consecuencia también su nomenclatura (Eng et al., 2015; Jajere, 2019; Popa y Popa, 2021), sin embargo, se usa el sistema recomendado por el Centro Colaborador de la OMS en el cual se clasifica para el género *Salmonella* en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*, mediante análisis de secuenciación del ARN ribosómico (ARNr) 16S (Eng et al., 2015; Alfaro-Mora, 2018; Jajere, 2019; ISP, 2019). *S. enterica* se clasifica a su vez en 6 subespecies que se denotan con números romanos: *S. enterica* subsp. *enterica* (I); *S. enterica* subsp. *salamae* (II); *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa); *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb); *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (Brooks et al., 2011; Eng et al., 2015; Alfaro-Mora, 2018; Jajere, 2019; ISP, 2019). Por otro lado,

*Salmonella* se clasifica en más de 2600 serotipos o serovariedades, donde la serotipificación se basa en el esquema de Kauffmann-White-Le Minor que utiliza a antígenos somáticos (O), el antígeno de la superficie Vi y antígenos flagelares. Cabe destacar que la subespecie entérica comprende casi todos los serotipos patogénicos para el ser humano (ISP, 2019).

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo anaerobio facultativo, gram negativo no encapsulado, no esporulante, con un diámetro de 0.7 a 1.5  $\mu\text{m}$  y una longitud de 2 a 5  $\mu\text{m}$  (Cortés-Higareda et al., 2021). En la Figura 2. 5 se muestra la célula de *Salmonella* donde se puede observar el flagelo (Kaur y Jainista, 2012).



**Figura 2.5.** Morfología y estructura del género *Salmonella*. Modificado de: Dreamstime (2023).



**Figura 2.6.** Componentes estructurales en el cuerpo basal del flagelo de una bacteria gram negativa. A) Estructura general del flagelo, B) Subestructuras y proteínas del flagelo. Tomado de: Carroll et al. (2016).

Los flagelos funcionan como rotores helicoidales semirrígidos que imparten la motilidad a *Salmonella* en ambientes líquidos o sólidos. Esta rotación funciona por el flujo de protones dentro de la célula bacteriana (Figura 2.6A). Esto se produce a través de una diferencia en el gradiente de concentración de protones, originada en la ausencia de una fuente de energía metabólica (Carroll et al., 2016). Cuando una bacteria peritrica (tiene más de un flagelo) se desplaza, los flagelos se asocian para formar una hebra ulterior que favorece el desplazamiento de la célula en línea recta mediante su rotación en sentido contrario a las manecillas del reloj. Sin embargo, en ciertos intervalos de tiempo la hebra invierte su dirección de rotación sufriendo una separación momentánea provocando que la célula dé volteretas hasta que restablece su desplazamiento nuevamente con dirección aleatoria.

Este comportamiento de *Salmonella* es lo que le confiere la propiedad de la **quimiotaxis** (Carroll et al., 2016), en la cual “Están implicados una serie de receptores específicos de superficie, que recogen la señal química (o sea, el quimioefector) y que inician un proceso de transducción intracelular de esta señal que finalmente llega a un complejo conmutador del corpúsculo basal flagelar. En el sistema sensorial de la bacteria, ante un gradiente espacial, se origina una migración neta (acercamiento o alejamiento, respectivamente) haciendo que

la duración de una carrera en la dirección favorable sea mayor, y para ello influye sobre el conmutador flagelar binario que determina el sentido de la rotación” (Iañez Pareja, 1998).

Otro mecanismo de supervivencia y protección de este patógeno es su capacidad para formar una matriz de exopolisacáridos a partir de células microbianas, denominada biopelícula (De los Santos Villamil et al., 2012; Cortés-Higareda et al., 2021), que puede adherirse y desarrollarse en superficies bióticas y abióticas. Los factores importantes para la formación óptima de dicha biopelícula son los nutrientes presentes, las condiciones ambientales y el metabolismo bacteriano, lo que provoca una variación en su composición con respecto a carbohidratos, péptidos, proteínas, lípidos o una combinación de estas sustancias, no obstante, el volumen mayor de la biopelícula lo constituye el agua (90 % del contenido total) (De los Santos Villamil et al., 2012). Las etapas de formación de las biopelículas son:

1. Adhesión o contacto con la superficie, inicialmente es reversible, pero con el paso del tiempo se vuelve irreversible.
2. Agregación o formación de microcolonias, ocurre cuando se adicionan más células microbianas a las ya presentes.
3. Maduración de la biopelícula, se multiplican los microorganismos y se producen de manera excesiva los exopolisacáridos, proteínas y se libera ADN extracelular.
4. Disgregación, el exceso de metabolitos presentes no pueden ser eliminados y por medio de algunos procesos de inducción o represión de genes que codifican factores de virulencia o enzimas, se origina la biosíntesis de los principales componentes de la matriz extracelular como exopolisacáridos y proteínas (*quorum sensing*) (Ortega-Peña y Hernández-Zamora, 2018).

Los mecanismos mencionados influyen en la capacidad de adaptación y supervivencia de *Salmonella* en diferentes condiciones ambientales, incluyendo temperaturas de refrigeración,

pHs ácidos, concentraciones elevadas de sal (Tabla 2.3). Además, la bacteria se inactiva a 70 °C (Alfaro-Mora, 2018).

**Tabla 2.3.** Condiciones óptimas de crecimiento de *Salmonella*.

Parámetro	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (°C)	2-4	35-37	54
pH	4	6.5-7.5	9
NaCl (%)	0.4	-	4
Actividad acuosa (Aw)	0.94	0.99	0.99 <

Tomado de Alfaro-Mora (2018).

### ***Identificación y aislamiento***

Los procedimientos para la identificación y aislamiento de *Salmonella* spp. se encuentran en la Norma ISO 6579-1:2017 y se aplica a productos destinados para el consumo humano y alimentación animal; de igual modo en la NOM-114-SSA1-1994.

1. *Preenriquecimiento*: Las células de *Salmonella* que se encuentren dañadas se restauran hasta una condición fisiológica estable. Se requiere de un medio nutritivo no selectivo.
2. *Enriquecimiento selectivo*: Se incrementa la población de *Salmonella* y se inhiben otros microorganismos presentes en la muestra. Los medios de cultivo son líquidos o semisólido como Mueller, selenito-cistina, tetrationato, Vassiliadis-Rappaport y soya tripticaseína.
3. *Selectividad en placa*: Se utilizan medios de cultivo selectivos (Figura 2.7) que inhiben el crecimiento de microorganismos de géneros diferentes a *Salmonella*, permitiendo de este modo la identificación visual de colonias sospechosas. Algunos de estos medios de cultivo que se utilizan son agares como Verde-Brillante (VB), con

sulfito de bismuto, Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), *Salmonella* y *Shigella* (SS) y Entérico Hektoen (EH).

4. *Identificación bioquímica*: Permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y descartar aquellos que no lo son.
5. *Serotipificación*: Se basa en el esquema Kauffmann-White, internacionalmente reconocido. Consiste en la caracterización en portaobjetos, generalmente por aglutinación de los antígenos; somáticos O, flagelares H y rara vez con respecto al capsular Vi.



**Figura 2.7.** Crecimiento de *Salmonella* en agar: XLD, VB y EH. Tomado de Robledo-López (2015).

Es importante mencionar que ningún alimento debe contener *Salmonella* y los resultados se reportan como “presencia” o “ausencia” de *Salmonella*” (Codex Alimentarius, 1983, NOM-210-SSA1-2014).

## 2.5 Compuestos químicos de fuentes vegetales

Las plantas tienen un papel fundamental en la vida del hombre para cubrir sus necesidades como alimento, vivienda, vestido, medicina, aromatizantes, etc. (Lock, 1987). Además, han recibido atención especial por la gran variedad de compuestos orgánicos que producen como parte de su metabolismo secundario, comúnmente llamados productos naturales. Se

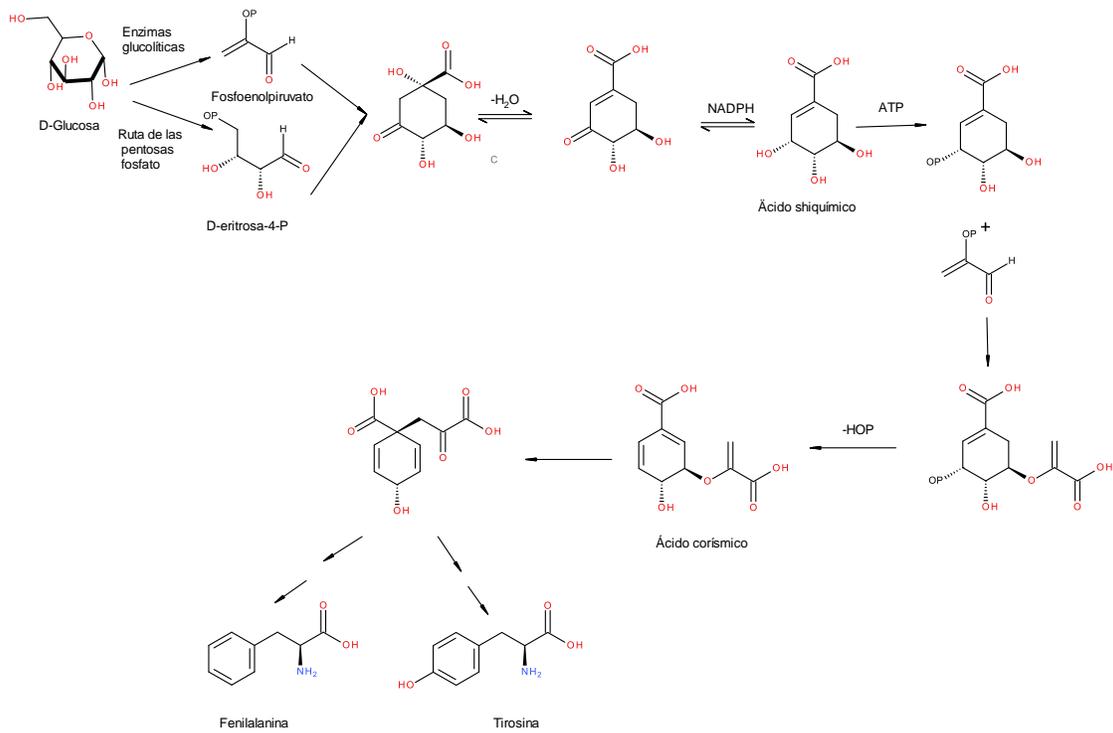
sintetizan a partir de metabolitos primarios y suelen encontrarse en concentraciones en el orden de los mg en el reino vegetal.

Los metabolitos secundarios no tienen función en el metabolismo básico de las plantas y hasta el momento se sabe que son importantes para conferirles color, como atrayentes de insectos para la polinización, de defensa contra microorganismos, insectos y animales herbívoros, así como agentes alelopáticos, es decir, que pueden tener interacciones complejas, dañinas o benéficas, con otras plantas de su entorno en su germinación, crecimiento o desarrollo (Lock, 1987; Cruz-Torres et al., 2019).

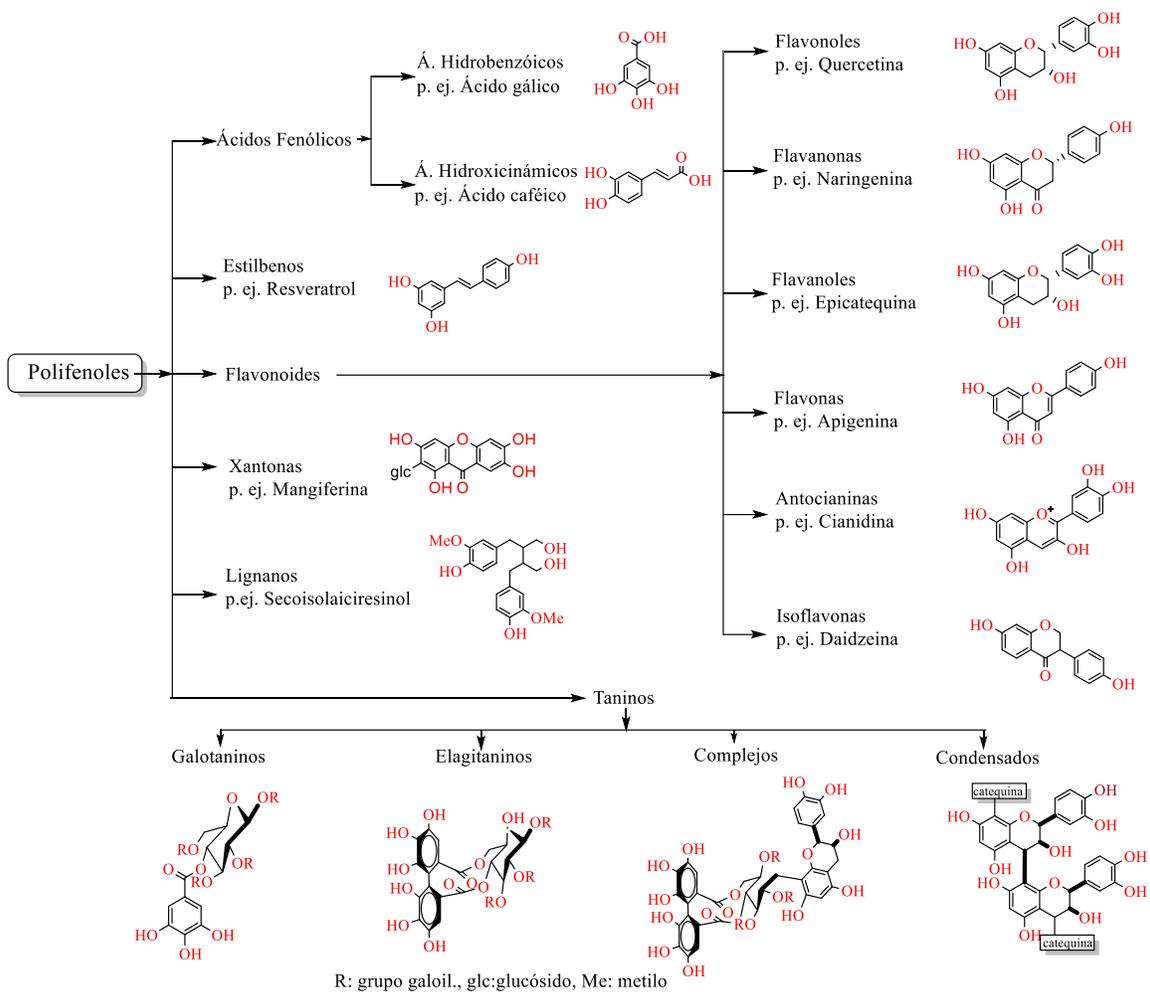
### **2.5.1 Compuestos polifenólicos**

Los polifenoles son metabolitos secundarios que se sintetizan en las plantas por la ruta del ácido shiquímico (Figura 2.8), principalmente (Dewick, 2002; Tsao, 2010); se encuentran en prácticamente todas las partes de estas: semillas, raíces, tallos, hojas, flores, frutos completos y en mayor cantidad en la cáscara o piel (Coppo y Marchese, 2014). Su estructura base un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, que a su vez puede unirse a otras estructuras aromáticas o alifáticas (Gimeno-Creus, 2004). Con base en su estructura química se clasifican en lignanos, estilbenos, flavonoides, alcoholes y ácidos fenólicos (Figura 2.9).

El interés por los compuestos polifenólicos se centra en las diversas propiedades biológicas asociadas a su estructura química (Abbas et al., 2017), como la antioxidante, principalmente, antifúngica, antimicrobiana, antiinflamatoria, antihipertensiva, antidiabética, antitrombótica, anticancerígena, cardioprotectora, neuroprotectora, osteoprotectora, hepatoprotectora y antienvjecimiento (El Gharras, 2009; Durazzo et al., 2019; Manso et al., 2021).



**Figura 2.8.** Ruta metabólica del ácido shiquímico. Adaptada de Dewick (2002).



**Figura 2.9.** Clasificación de los compuestos polifenólicos. Tomado de López-Hernández (2017).

### 2.5.2 Actividad antioxidante

En las células la defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) depende de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa (Bailiak et al., 2017; Santos-Sánchez et al., 2019). Sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo (desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes), son insuficientes por lo que es conveniente ingerir compuestos con actividad antioxidante como los polifenoles. Esto reduce el impacto negativo que el estrés oxidativo tiene en la salud tanto de humanos como de animales (Rudrapal et al., 2022). Esta propiedad de los compuestos

polifenólicos está asociada al número de grupos hidroxilo que poseen en su estructura y a su arreglo espacial (Olszowy, 2019); los más estudiados son: quercetina, catequina, kaempferol, resveratrol, apigenina y la luteolina (Rasouli et al., 2017).

Los dos mecanismos de acción propuestos para la actividad antioxidante de los polifenoles son la transferencia de un átomo de hidrógeno al radical libre y la transferencia de un electrón singulete (todos los espines de los electrones están apareados en el estado electrónico molecular) de la molécula oxidante al polifenol. Los productos de la reacción en ambos casos son un radical oxidado, un radical catión y una especie energéticamente estable (Leopoldini et al., 2011; Mendoza-Isaza et al., 2020).

### **2.5.3 Actividad antimicrobiana**

Una estrategia emergente para la inhibición de microorganismos patógenos es el uso de extractos vegetales con base a los componentes presentes en estos y que poseen actividad antimicrobiana, con atención principal en el grupo de los flavonoides (Coppo y Marchese, 2014). Por ejemplo, Ferrazzano et al. (2011) reportaron que la catequina actúa sobre: *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*.

Como posibles mecanismos de acción antibacteriana se ha propuesto que las infecciones microbianas pueden estar relacionadas con el estrés oxidativo y se han observado mejoras en cuanto se revierte esta situación en el organismo (Komaravelli et al., 2015). Sin embargo, no siempre se ve este efecto, por ejemplo, cuando Borrás-Linares et al. (2015) analizaron la actividad antimicrobiana de *Hibiscus sabdariffa* contra *Salmonella enteritidis*, observaron

que no presentó una correlación de Pearson fuerte (0.320) con la actividad antioxidante, determinada por el método del DPPH'.

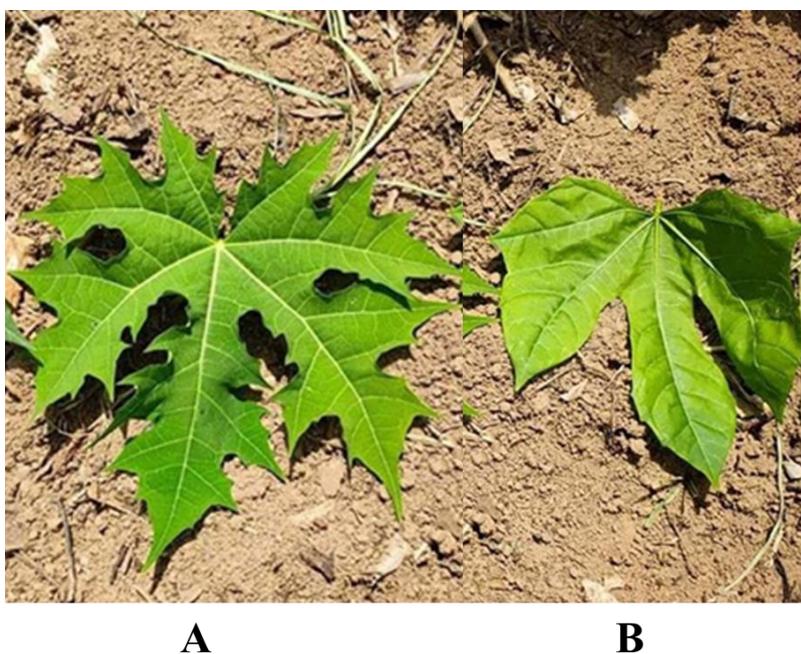
Por otro lado, también se ha planteado que la interacción polifenoles-células bacterianas propicia su acumulación en la superficie de estas (Bouarab-Chibane et al., 2019); otros posibles mecanismos son la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos o de las funciones de la membrana citoplasmática (Coppo y Marchese, 2014). En cuanto al segundo mecanismo, puede haber interferencias en la replicación del ADN, se inhibe la transcripción lo que dificulta la síntesis de metabolitos primarios en los microorganismos (Paredes y Roca, 2004). Con respecto a la afectación de la membrana celular debido a que constituye una barrera semipermeable y lleva a cabo funciones de transporte activo, si su integridad funcional se altera, los iones y macromoléculas se escapan entonces la célula se lesiona y muere (Paredes y Roca, 2004).

## **2.6 Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*)**

La chaya es una planta que pertenece a la familia Euphorbiaceae y el género *Cnidoscolius*, su nombre en maya es Tzin-tzin chay (chaya), se cultiva desde la época prehispánica y se utiliza principalmente como alimento y medicina (Ross-Ibarra, 2003) en el sureste mexicano donde se consume en una variedad de platillos regionales y bebidas. Las especies principales en la Península de Yucatán, México, son *C. aconitifolius* y *C. chayamansa* (Chin-Chan et al., 2021).

Esta planta es un arbusto arborescente semi-perenne y semi-leñoso, alcanza hasta 6 m de altura, es de fácil propagación (por esquejes) y alta producción de follaje en corto tiempo. Es tolerante a condiciones ambientales pobres, resistente a pestes, enfermedades, sequía y tolera la falta de cuidado, aunque es de baja longevidad. Sus hojas son grandes de 30-35 cm aprox.,

su forma se toma como un aspecto para diferenciar las especies del género *Cnidoscolus*. La especie *aconitifolius* tiene hojas pentalobuladas, bordes lobulados y aserrados (Figura 2.10A), poseen peciolo largo, sin pubescencias (o vellosidades), base sagitada, presencia de glándulas y flores blancas. Por otro lado, *C. chayamansa* tiene hojas trilobuladas con bordes lobulados y lisos (Figura 2.10B), peciolo corto, sin pubescencias, de igual manera con base sagitada, con glándulas y flores blancas (Kuri-García et al., 2017).



**Figura 2.10.** Hojas del género *Cnidoscolus*. A) *C. aconitifolius* y B) *C. chayamansa*. Modificado de: Nabor (2020)

Los compuestos que han sido identificados en las hojas de la chaya (Tabla 2.4) son flavotaninos, flavonoides glucósilados, alcaloides, taninos, saponinas, antraquinona libre y combinada (Awoyinka et al., 2007) y se ha expuesto que presentan actividad contra *Salmonella* los flavonoides glucosilados (Tereschuk et al., 2007), taninos (Villanueva et al., 2023), saponinas (Góngora-Chi et al., 2023) y alcaloides (Yan et al., 2021).

También está presente el ácido ferúlico (Ortiz-Mora et al., 2017) unido a la pared celular vegetal como deshidrodímeros, son componentes estructurales importantes que sirven para mejorar su rigidez y resistencia; su recuperación se dificulta debido a que se deben romper los enlaces éster (Kuri-García et al., 2017). Posee también actividad antioxidante, efecto contra algunas enfermedades crónicas (Sgarbossa et al., 2015).

De acuerdo con lo antes expuesto, “a la chaya se le considera un cultivo subutilizado debido al conocimiento general limitado que existe sobre ella, su escasa representación en colecciones ex situ y la falta de programas de conservación” (Chin-Chan et al., 2020).

**Tabla 2.4.** Compuestos identificados en especies del género *Cnidoscopus*.

Género <i>Cnidoscopus</i>	País	Acondicionamiento y proceso de extracción	Compuestos identificados	Método de identificación
<i>C. aconitifolius</i> (Escalante-Erosa et al., 2004)	México	Extracto crudo a partir de 15-20 hojas frescas, estas fueron sumergidas por 20 s en 1 L de diclorometano. Se evaporó el disolvente y se obtuvieron 533.33 mg de extracto. Se realizó una purificación mediante columna flash empleando hexano/diclorometano como eluyente. Obtuvieron cinco fracciones (A-E).	Amirenona (31.3 mg), acetato de $\alpha$ -amirina (3.3 mg) y acetato de $\beta$ -amirina (67.4 mg), en B, D y E, respectivamente. $\beta$ y $\alpha$ amirina en C.	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).
<i>C. aconitifolius</i> (Kuti y Konuru, 2004).	Estados Unidos	Hojas frescas lavadas se almacenaron a 5 °C toda la noche, se trituraron 500 g con procesador de alimentos. Se obtuvo el extracto (5 g/20 mL) con etanol/acetona/agua/ácido acético (40:40:20:0,1), se calentó a 60 °C por 1 h en baño de agua, en viales con tapón para evitar la evaporación del disolvente. Adicionalmente hojas crudas (500 g) se trocearon se hirvieron con 10 mL de agua en un recipiente con tapa de vidrio. Se añadieron 10 mL de agua y se cubrió el recipiente con una tapa de vidrio para favorecer la cocción al vapor durante 2 min. Se obtuvo un extracto con estas hojas como ya se describió. Ambos extractos se homogeneizaron durante 1 min con un homogeneizador de tejidos, se filtraron a través de una membrana y se almacenaron a -20 °C.	Extracto de hojas crudas: kaempferol y quercetina. Extracto de hojas cocidas: kaempferol y quercetina.	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).
<i>C. aconitifolius</i> (Awoyinka et al., 2007)	Nigeria	Extracto acuoso y uno etanólico al 96 % obtenido a partir de hojas secas por el método de soxhlet por 3 h, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio a 30 °C por 25 min. Se colocó en una estufa de secado a 45 °C hasta peso constante.	Extracto acuoso: taninos, flobataninos, saponinas y glucósidos cardíacos. Extracto etanólico: alcaloides, taninos, saponinas y glucósidos cardíacos.	Métodos cualitativos estandarizados.
<i>C. aconitifolius</i> (Oyagbemi et al., 2011)	Nigeria	Las hojas se lavaron y secaron a temperatura ambiente. Se obtuvo un polvo fino y se almacenó a 4 °C en recipiente de polietileno. Se obtuvo un extracto en agua.	Taninos, saponinas, alcaloides y flavonoides	Pruebas químicas estándar.
<i>C. aconitifolius</i> (Fagbohun et al., 2012)	Nigeria	Las hojas se secaron a temperatura ambiente por 3 semanas, se obtuvo un polvo fino utilizando un mortero. Se obtuvo un extracto por maceración durante 5 días a partir de 1.5 kg de polvo en 1000 mL de metanol. Se descartó el sobrenadante y se llevó a sequedad total en un evaporador rotatorio a 40 °C, se almacenó a 4 °C.	Alcaloides, taninos, flobataninos, flavonoides, saponinas y glucósidos cardíacos	Métodos estándar descritos por Harbone, Trease, Evans y Sofowora.
<i>C. aconitifolius</i>	-	Extracto etanólico de hojas	Fenoles, saponinas, flobataninos y glucósidos cardíacos, ácidos grasos	No se mencionó.

(Jiménez-Arellanes et al., 2014)			(palmítico, esteárico, mirístico, oléico, entre otros), esteroles ( $\beta$ sitosterol), triterpenos ( $\beta$ y $\alpha$ amirina), alcaloides, flavonoides (kaempferol-3-O-glucósido y quercetina-3-O-glucósido), antraquinonas, terpenos (taraxasterona) y taninos.	
<i>C. aconitifolius</i> (Numa et al., 2015)	Colombia	Hojas secas se molieron, se obtuvo un extracto por maceración durante 7 días, con etanol al 96 %, se cambió el disolvente diariamente por fresco.	Sulfato de hispidulina, eucaliptina, polianxantona C, cadesina G, parvixantona D, epigalocatequina di-O-galato, epicatequina di-O-gallato, fraxetina, acutifolina D, hamaudol, ácido moreólico, triptofordin D-1, tiegusanina F.	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos y espectrometría de masas (HPLC-DAD-ESI-MS)
<i>C. chayamansa</i> Mc Vaugh (Mena-Linares et al., 2016)	Cuba	Hojas lavadas y secadas a la sombra y en estufa a 40 °C por 5 días. Se obtuvo un polvo fino (tamaño de partícula de 3 mm). Se obtuvo un extracto por maceración sin agitación, utilizando como disolventes, sucesivamente: éter de petróleo, etanol y agua destilada, durante 24 h en cada uno.	Extracto etéreo: ácidos grasos. Extracto etanólico: triterpenos, esteroides, saponinas, alcaloides, azúcares reductores, polifenoles, taninos, flavonoides y aminoácidos.	Tamizaje fitoquímico descritos por Miranda y Cuellar.
<i>C. chayamansa</i> <i>C. aconitifolius</i> (Kuri-García et al., 2017)	México	Se aplicaron diferentes tratamientos a las hojas. Los disolventes empleados fueron: agua, metanol, etanol, acetato de etilo y hexano.	-Extracto acuoso: polifenoles, taninos y flavonoides. -Extracto etanólico para <i>C. aconitifolius</i> : polifenoles, taninos, flavonoides, coumarinas y flavotaninos. -Extracto metanólico de <i>C. aconitifolius</i> y <i>C. chayamansa</i> : polifenoles, flavonoides y taninos. -Extracto con acetato de etilo para <i>C. aconitifolius</i> : polifenoles, coumarina y flavonoides. -Extracto hexánico para <i>C. aconitifolius</i> : polifenoles.	Los métodos de identificación fueron por reacciones químicas.
<i>C. aconitifolius</i> (Godínez-Santillán et al., 2019)	México	Los extractos se obtuvieron a partir de hojas crudas y hervidas (5 min en agua), fueron secadas en horno a 40 °C por 48 h, pulverizadas en un molino eléctrico con un tamiz (0.5 mm). Se obtuvieron extractos (1:10, p/v), con metanol/agua y etanol/agua (80:20 y 50:50, para ambos), por maceración en un agitador orbital a temperatura ambiente durante toda la noche, sin exposición a la luz. Se filtraron a través de papel filtro, se llevaron a sequedad total, se liofilizaron y almacenaron a -80 °C.	Se identificaron los ácidos: gálico, clorogénico, cafeico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, vainillico, rosmarínico; resveratrol, luteolina y apigenina.	Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa con arreglo de diodos (RP-HPLC-DAD).

## **2.7 Hidrolato de la extracción de aceite esencial de hojas de orégano (*Lippia graveolens*)**

Se nombra como hidrolato, hidrosol o agua madre al residuo líquido de apariencia turbia que se obtiene del proceso para obtener aceites esenciales a partir de material vegetal por medio de la destilación por arrastre de vapor (hidrodestilación). En el caso del orégano es una especia ampliamente utilizada en la elaboración de platillos mexicanos y su aceite esencial es de suma importancia por las propiedades biológicas que posee tales como la antioxidante, antibacteriana, antiparasítica, antigenotóxica y antifúngica (Arcila-Lozano et al., 2004; García-Pérez et al., 2012), principalmente porque contiene limoneno,  $\beta$ -cariofileno,  $\rho$ -cimeno, linalol,  $\alpha$ -pineno, carvacrol y timol (Arcila-Lozano et al., 2004). En el grupo de trabajo a partir de 2.5 kg de hojas secas de orégano se obtuvieron 66 mL de aceite esencial y 10,000 mL de hidrolato (150 veces mayor volumen), por lo tanto, el uso alternativo le conferirá un valor agregado a este subproducto.

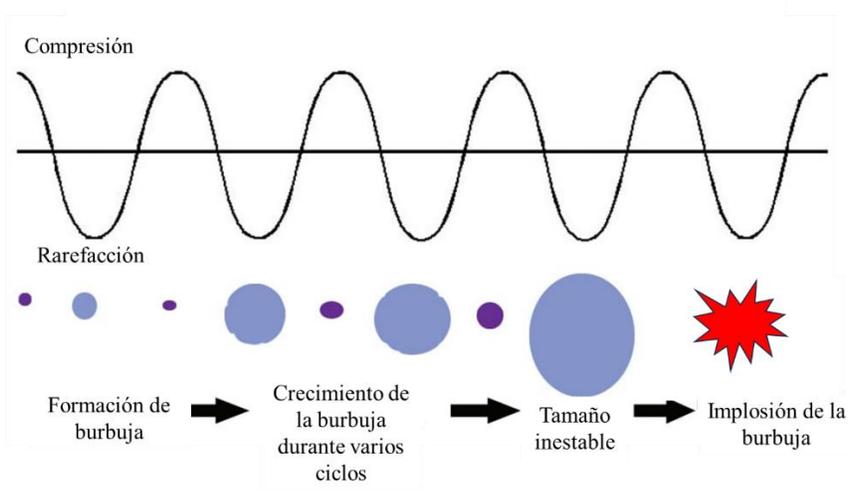
Con base a sus componentes principales se encontró que 18 de 44 hidrolatos analizados fueron diferentes con respecto a sus aceites esenciales, lo que deja ver que no necesariamente ambos van a presentar la misma composición. Considerando los compuestos principales presentes en los hidrolatos analizados estos fueron clasificados en grupos funcionales: aldehído, alcohol, fenol, cetona, éster y grupos fenol metil éter (D'Amato et al., 2018).

Existe evidencia de que los hidrolatos poseen actividad antimicrobiana debido a la presencia de los compuestos presentes (D'Amato et al., 2018). García Ángeles y colaboradores (2022) adicionaron hidrolato de orégano (*Oreganum vulgare*) en la formulación de nuggets de carne de conejo y observaron una disminución en el conteo total de estafilococos y enterobacterias.

## 2.8 Extracción Asistida por Ultrasonido

Los métodos más utilizados para la extracción de metabolitos secundarios a partir de plantas son la maceración, la decocción, percolación, soxhlet, extracción acelerada por disolventes, extracción asistida por microondas, extracción con fluido supercrítico, extracción asistida por enzimas, así como la extracción asistida por ultrasonido (Sridhar et al., 2021; Fongang Fotsing et al., 2021; Bitwell et al., 2023), esta última fue usada en el presente trabajo y se detalla a continuación.

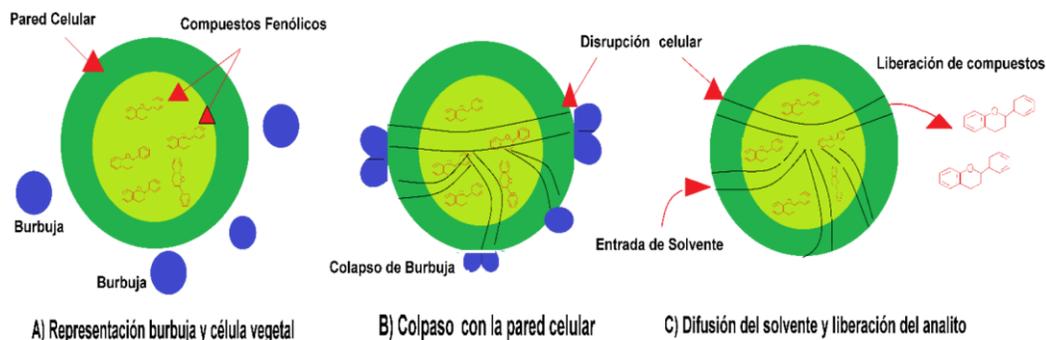
El fundamento de la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) es el uso de la cavitación acústica (Figura 2.11) que es capaz de inducir una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del disolvente provocando la formación de burbujas como consecuencia de los cambios de temperatura y de presión (Shirsath et al., 2012).



**Figura 2.11.** Principio de cavitación acústica. Modificado de Hielschel Ultraonics, (2023).

La implosión de las burbujas sobre la matriz vegetal provoca el deterioro de su superficie y mejora la accesibilidad del disolvente, también induce la reducción del tamaño de partícula por las colisiones y a las ondas ultrasónicas, lo que facilita la transferencia de masa (Figura 2.12) (Chemat et al., 2017). Es un método ampliamente utilizado porque no se aplica calor y

requiere menor tiempo de extracción lo que conlleva a la menor afectación de compuestos como lo polifenoles.



**Figura 2.12.** Esquematación del fenómeno de cavitación, colapso y liberación del material vegetal. Tomado de Medina-Torres et al. (2017).

## 2.9 Compuestos de origen natural con actividad contra bacterias entéricas

Con las nuevas tendencias, los consumidores exigen alimentos frescos sin aditivos químicos ni compuestos tóxicos que puedan afectar su salud. Por lo tanto, es de gran relevancia el uso de extractos de plantas como una alternativa natural para eliminar y/o reducir la carga microbiana de bacterias patógenas como la *Salmonella*. Para esto se debe investigar empleando métodos cuali y/o cuantitativos en los cuales se confronta el antimicrobiano, a concentraciones conocidas, con una suspensión bacteriana ( $10^8$  UFC/mL, por lo general), y de este modo se determina si el extracto vegetal posee actividad antimicrobiana y se establece la concentración necesaria de este. A continuación, se detallan los métodos que se utilizaron en el presente trabajo de tesis.

### 2.9.1 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es una prueba cuantitativa (MacGowan y Wise, 2001) *in vitro* de sensibilidad de los microorganismos frente a un agente antimicrobiano en

condiciones específicas. Permite establecer la concentración más baja del antimicrobiano (extracto vegetal, por ejemplo) que inhibe el crecimiento de la bacteria que se expuso a este, se expresa como mg/L o  $\mu\text{g/mL}$  (Andrews, 2001; Kowalska-Krochmal y Dudek-Wicher, 2021). En la Tabla 2.5 se presenta información relacionada con la CMI establecida para algunas fuentes de origen natural contra *Salmonella* infectando vegetales.

**Tabla 2.5.** CMI de extractos vegetales contra *Salmonella* en alimentos frescos.

Fuente	Compuesto(s)	Alimento	Condiciones de obtención del extracto	Bacterias (CMI)	Referencia
Berenjena ( <i>Solanum melongena</i> )	Ácido clorogénico Cianidina 3-O (acetilglucósido) Ácido 4-cafeoilquinico.	Lechuga	-Lavado y desinfección de la cáscara de berenjena (CB) con NaClO al 2 % por 5 min, enjuague con agua estéril, se guardó a -20 °C. -Homogenización de 10 g de CB durante 30 s utilizando 20 mL de diferentes soluciones (1-3 %): sulfato de calcio (CaSO <sub>4</sub> ), carbonato de calcio (CaCO <sub>3</sub> ) y cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ). -Tratamiento térmico a 95 °C durante 30 min, con agitación cada 5 min. -Homogenización durante 3 h a 30 °C, antes de incubarlas 16 h a 4 °C. -Centrifugación a 4000 rpm por 15 min. Recuperación del sobrenadante y filtración con membrana 0.22 µm, se almacenó a 4 °C.	<i>Salmonella</i> Typhimurium El extracto obtenido con CaCO <sub>3</sub> al 1 % mostró una inhibición bacteriana del 40 %.	Rochín-Medina et al. (2019)
Clavo ( <i>Caryophyllus aromaticus</i> )	Eugenol.	Lechuga	-Se utilizaron flores, corteza, hojas, así como, la planta completa. -Los aceites esenciales se obtuvieron por destilación.	<i>Salmonella enterica</i> (serotipos Derby, Thompson, Napoli, Kasenyi y Veneziana). Para la canela se obtuvo la mejor CMI = 1.25 -1.87 µL/mL	Rossi et al. (2019)
Árbol de canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	Cinamaldehído.				
Orégano ( <i>Oreganum vulgare</i> )	Carvacrol, timol, cimeno, terpineno.				
Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	Eucaliptol, α-pineno, alcanfor, β-cariofileno, acetato de bornilo, canfeno, β-pineno, limoneno, felandreno y γ-terpineno.				
Salvia ( <i>Salvia officinalis</i> )	Sesquiterpenos				
Salvia romana ( <i>Salvia sclarea</i> )	Aristoleno, germacreno, β-farneseno				

Tomillo ( <i>Satureja montana</i> )	Timol				
Tomillo rojo ( <i>Thymus vulgaris</i> )	Carvacrol, flavonoides y compuestos fenólicos				
Cilantro ( <i>Coriandrum sativum</i> )	(S)- (+)-linalol, <i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno, <i>cis</i> -geraniol, alcanfor	Zanahoria	Semillas (1 kg) se sometieron a destilación por arrastre de vapor para la obtención del aceite esencial de cilantro (CEO) e hidrolato (CH), ambos se recuperaron y almacenaron a 4 °C. Se obtuvo un extracto con etanol al 100 %.	<i>Salmonella enterica</i> CMI = 5 $\mu$ L/mL	Pellegrini et al. (2020)

### 3. ESTADO DEL ARTE

La *Salmonella* es uno de los principales patógeno que infecta al fruto de la fresa, la evaluación del efecto de compuestos químicos en el fruto para el control de esta bacteria se muestra en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Productos químicos en el control de *Salmonella* en fresa

Compuesto químico	Especie	Inhibición	Referencia
ClO <sub>2</sub> gaseoso	<i>Salmonella</i> spp.	Niveles indetectables (100 mg totales de ClO <sub>2</sub> gaseoso)	Yuk et al. (2006)
ClO <sub>2</sub>	<i>Salmonella enterica</i>	Fresas en ClO <sub>2</sub> durante 10 min, a 5 mg/mL se disminuyó las UFC, se logró una vida útil de 16 días.	Mahmoud et al. (2007)
NaClO CH <sub>3</sub> COOH	<i>Salmonella Typhimurium</i>	NaClO a 200 ppm. CH <sub>3</sub> COOH al 5 %. No se logró reducir < 0.5 Log UFC/cm <sup>2</sup> .	Portillo-Torres et al. (2016)
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> COOH	<i>Salmonella enterica</i>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> a 80 ppm, 5 % de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y 2.5 % de ácidos orgánicos después de 2 min de tratamiento.	Ortiz-Solá et al. (2020)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>Salmonella enterica</i>	2 Log UFC/g	Cortés-Higareda et al. (2021)

ClO<sub>2</sub>: Dióxido de cloro. NaClO: Hipoclorito de sodio, CH<sub>3</sub>COOH: ácido acético, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: ácido peracético, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>: ácido cítrico, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: ácido láctico.

A la fecha, no se ha evaluado extracto de chaya o hidrolato de orégano en fresa contaminada con *Salmonella*, solamente existe evidencia de la aplicación en fresa de dos desinfectantes comerciales que contienen compuestos naturales (Salgado-Escobar et al., 2020). Uno contiene un extracto estandarizado de semillas cítricas y glicerina (ECD) y se aplicó después del lavado de la fresa con detergente; otro contiene extracto de semillas cítricas, ácidos láctico y ascórbico, aplicado en la fresa directamente. El porcentaje de disminución de la carga bacteriana (no fue *Salmonella*) en fresa fue del 96.83 %, con respecto a los otros desinfectantes utilizados (ozono, desinfectantes comerciales a base de ClO<sub>2</sub> y plata coloidal).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la información expuesta anteriormente, la relevancia del presente trabajo de tesis se centra en que el consumo de productos frescos, como la fresa, ha desencadenado brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, siendo esto un problema grave al comprometerse la salud de los consumidores. El género *Salmonella* afecta a las fresas que llega al fruto por el riego con aguas contaminadas y/o por el manejo postcosecha inadecuado, aunado a que se comercializa en fresco sin ningún tratamiento de limpieza y desinfección para no disminuir su vida útil.

Se decidió trabajar con la fresa debido a que no hay reportes sobre el control de *Salmonella* empleando fuentes de origen natural, como se expuso en el *Estado del arte* y, por consiguiente, tampoco hay evidencia a la fecha del uso como desinfectantes naturales de extractos de hoja chaya e hidrolato de orégano. En un trabajo previo de este grupo de investigación, se evidenció que la chaya es una fuente potencial de ácido ferúlico (Ortiz-Mora et al., 2017), y se sabe que este compuesto tiene actividad antimicrobiana. En el caso del hidrolato de orégano se propone darle un uso alternativo al residuo líquido del proceso de obtención del aceite esencial de esta planta, que también contiene compuestos hidrosolubles con posible actividad contra *Salmonella*. Los resultados que se obtengan en el presente trabajo de investigación contribuirán en el tema del control con compuestos naturales de la salmonelosis transmitida por las fresas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

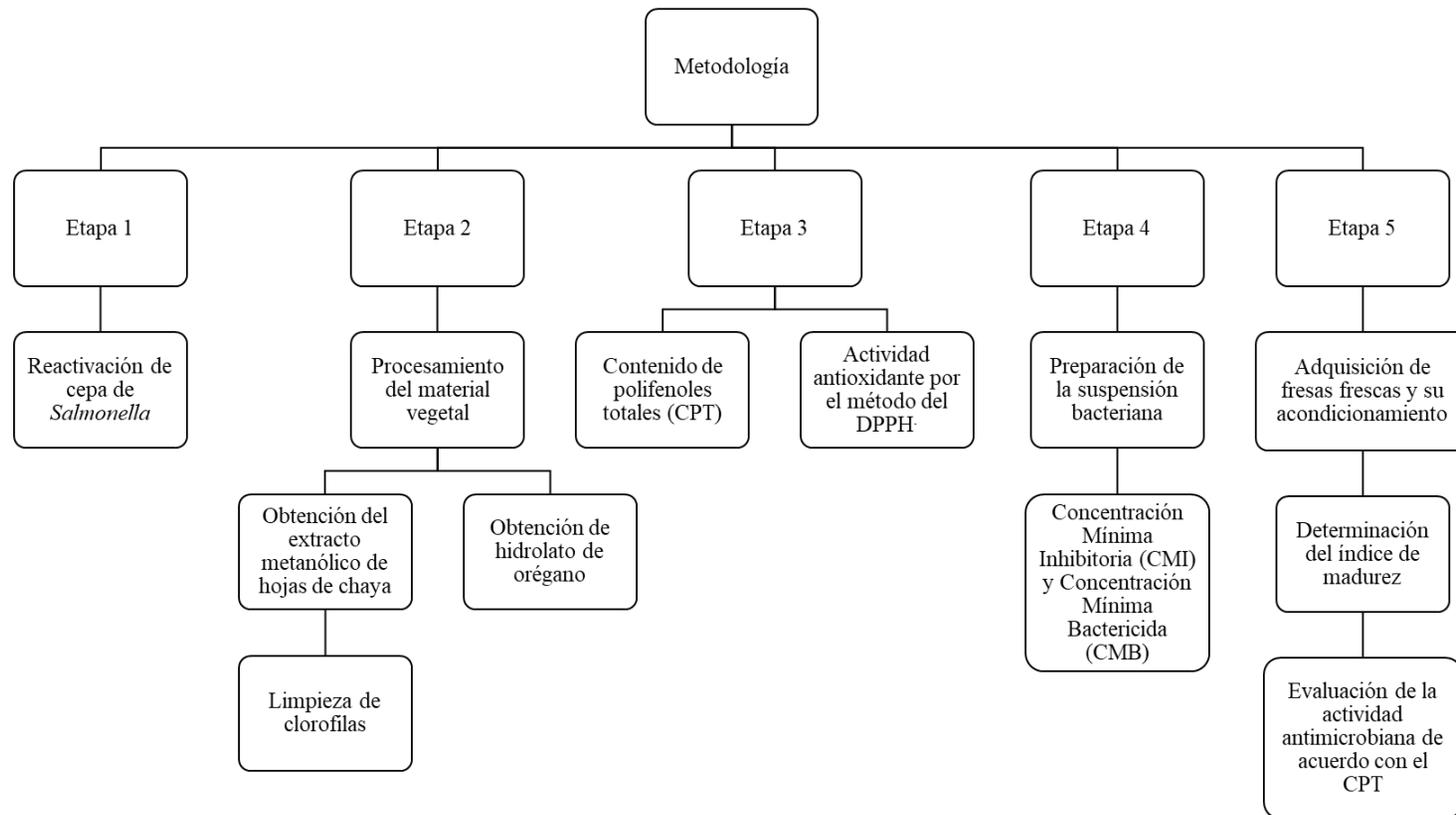
Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de chaya y del hidrolato de orégano en fresas contaminadas con *Salmonella*.

### **5.2 Objetivos específicos**

- 5.2.1 Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida del extracto de chaya contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* mediante el método de microdilución en caldo.
- 5.2.2 Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida del hidrolato de orégano contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* mediante el método de microdilución en caldo.
- 5.2.3 Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de la fuente natural que presente inhibición total de *Salmonella* en fresas contaminadas con esta bacteria.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

En el siguiente esquema se ilustran las etapas y actividades experimentales que se desarrollaron en el presente trabajo de tesis.



**Figura 6.1.** Metodología de la parte experimental del proyecto de tesis.

## 6.1 Equipos, materiales, cepa bacteriana, material vegetal y reactivos

**Equipos:** Cabina de seguridad biológica clase II tipo A2 (Labconco Logic +), espectrofotómetro de UV-Vis (Hinotek, UV765), rotaevaporador (IKA®, RV 10) con bomba de vacío (Vacuubrand, ME4NT) y chiller (PolyScience, MX-7L-HT), autoclave vertical automático (Prendo, AV-2550), autoclave (Prendo, ACH-22), autoclave eléctrica (All American), balanza analítica (Ohaus, PA214), balanza granataria (Ohaus), balanza granataria de triple brazo (MB-2610), baño maría con recirculación de agua (Prendo, CM-5), baño de ultrasonido (Branson, CPX8800), centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5810 R) con rotor (FA-45-6-30), refrigerador (Torrey, VRD-18), congelador (Torrey, CHTC9), incubadora (Prendo, DBO-4), parrilla de calentamiento con agitación (IKA®, C-MAG HS 4), parrilla de calentamiento con agitación (Prendo, PCA-1500), potenciómetro con electrodo para pH (Hanna, HI2210), refractómetro digital (Hanna, HI96801), vórtex (IKA, Vortex3), licuadora de inmersión (Kitchen Aid ®), molino eléctrico (Hamilton Beach, 80393), micropipetas: 3, 10 y 20 µL (Biohit), 100 y 1000 µL (Science Med), 1000 µL (DLAB).

**Materiales:** Bolsas estériles de plástico con filtro (Nasco Whirl-Pak), matraz con junta esmerilada de 250 y 1000 mL para rotaevaporador (IKA®), adaptador de vial para rotaevaporador (Sigma), bureta de 25 mL (Kimax), cajas Petri de vidrio de Ø 90 mm (Pyrex®), cajas Petri de plástico estériles de Ø 100 mm (crmglobe), celdas de plástico de 1 mL (Brand®) frascos de vidrio con tapa de 250 mL (Pyrex®), matraces volumétricos aforados de 50 y 100 mL (Kimax), microplacas con tapa estériles de 96 pozos con fondo plano (crmglobe), tubos de ensaye de vidrio con tapa (100 mm x 10 mm), tubos eppendorf de 2 mL, tubos Falcon estériles de 50 mL (Falcon™), asa bacteriológica, pipeta Pasteur, bulbo para pipeta Pasteur, pinzas de metal, pipeta de vidrio de 10 mL, embudo de plástico, puntas para micropipeta de diferentes volúmenes, soporte universal, pinza de tres dedos, gradilla

metálica, barras magnética para agitación de diferentes medidas, centrífuga manual para ensalada, mini Picadilly (Tupperware), pliego de papel filtro de poro mediano, papel Parafilm, papel kraft, cinta testigo, gasas estériles, bolsas de plástico para esterilizar, botes de plástico transparente con tapa capacidad medio litro, jabón neutro Extran, papel aluminio, chuchillo casero, charola de plástico, tabla para picar, colador metálico para cocina, recipientes de plástico para coleccionar líquidos.

**Cepa bacteriana, material vegetal y reactivos:** *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (CDBB 1251), polvo de hojas de chaya (*Cnidocolus aconitifolius*), polvo de hojas de orégano (*Lippia graveolens*), frutos de fresas frescas, hipoclorito de sodio comercial (NaClO), agua pasada por ósmosis inversa, agua desionizada, agua para beber. **Reactivos.** J.T. Baker: soluciones amortiguadoras estándar para calibración de electrodo de pH 7.0 y 10.0, solución estandarizada 0.1 N de hidróxido de sodio (NaOH), metanol (MeOH), alcohol etílico desnaturalizado, cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub>). Meyer: alcohol etílico absoluto, carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado. Sigma-Aldrich: ácido gálico, radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>), reactivo de Folin-Ciocalteu 2N. Virmel: solución salina de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) pH de 4 a 10x. Difco <sup>TM</sup>: caldo Mueller-Hinton (MHB), agar Mueller-Hinton (MHA). Bioxon: agar para *Salmonella*-*Shigella* (SS), agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), agar enzima desoxirribonucleasa (DNASA), caldo Verde-Brillante Bilis al 2 % (VBB), carbón activado (sin marca).

## 6.2 Reactivación de la cepa de *Salmonella*

La cepa tipificada que se utilizó fue *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, conservada en glicerol a -50 °C, fue proporcionada por la Dra. Beatriz Hernández Carlos, Profesora-Investigadora adscrita al Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la

Mixteca. La reactivación de la bacteria se llevó a cabo de acuerdo con la metodología establecida por Sánchez-Leal y Corrales-Ramírez (2005), con algunas modificaciones.

Se prepararon 100 mL de cada uno de los medios de cultivo utilizados, siguiendo las recomendaciones del proveedor, en frascos de vidrio con tapa de 250 mL. Los agares usados fueron: Mueller-Hinton (MHA), Salmonella-Shigella (SS), Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), enzima desoxirribonucleasa (DNASA). Los caldos fueron: Mueller-Hinton (MHB) y Verde-Brillante (VBB). Las condiciones de esterilización de los medios de cultivo fueron 121 °C y 15 psi durante 15 min en una autoclave, en conjunto con los materiales requeridos y agua pasada por ósmosis inversa. Los medios de cultivo se dejaron a 45 °C en un baño maría con recirculación de agua. Los agares se vaciaron en cajas Petri desechables y los caldos en tubos Falcon, ambos estériles, en una cabina de Seguridad Biológica Clase II. Cuando el agar se gelificó y el caldo se atemperó, se guardaron en refrigeración hasta su uso.

Primeramente, la cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* se tomó de un criotubo y se inoculó en tubos con MHB, se sellaron e incubaron a 37 °C durante 24 h, siempre se utilizaron estas condiciones de incubación. Cuando se observó crecimiento bacteriano se tomó una asada e inoculó en MHA por siembra directa mediante la técnica de estriado, se incubó. Posteriormente, se realizó una resiembra también por estriado, en los medios de cultivo selectivos: XLD, DNASA, SS y VBB; se incubaron a las condiciones mencionadas. Al término de este tiempo las cajas Petri y los tubos con cultivos se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

### **6.3 Obtención del extracto de hojas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) e hidrolato de orégano (*Lippia graveolens*)**

#### **6.3.1 Adquisición y acondicionamiento de las hojas de chaya**

El material vegetal utilizado en este proyecto de tesis fue proporcionado por la Dra. Edith Graciela González Mondragón, Profesora-Investigadora adscrita al Instituto de Agroindustrias en la Universidad Tecnológica de la Mixteca. La planta fresca de chaya se compró en un mercado de la Ciudad de México y se transportó al laboratorio de Biotecnología, Edificio de Productos Naturales y Alimentos de la UTM. Se separaron las hojas de los tallos, se colocaron en una charola de plástico con papel kraft para el secado a la sombra durante una semana. Posteriormente, se redujo su tamaño de partícula primero manualmente y después utilizando un molino eléctrico. El polvo se pasó por un tamiz del número 40, para homogenizar el tamaño de partícula (0.0165 in). Se guardó a 4 °C en frascos con tapa de cierre hermético, sin exposición a la luz hasta su uso. Se tuvo la participación de la I.A. Joselyn Scarlet Cabrera Villanueva, como parte de su Servicio Social.

#### **6.3.2 Obtención del extracto metanólico de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*)**

El extracto del polvo de las hojas de chaya se obtuvo empleando el método de extracción asistida por ultrasonido, usando metanol (MeOH) al 100% como disolvente en una proporción 1:50 (p/v). En un tubo Falcon se colocaron 0.5 g de polvo de hojas de chaya y 25 mL de MeOH, se hizo por duplicado. Se colocaron en un baño de ultrasonido a temperatura ambiente, 40 kHz por 15 min. A continuación, se sometieron a centrifugación a 10,000 rpm, 4 °C durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. La extracción y centrifugación se realizó dos veces más con el precipitado recuperado (agotamiento del polvo de hojas de chaya). Finalmente, se juntaron los tres sobrenadantes recuperados, se llevaron a sequedad total en

un rotaevaporador a 45 °C. Se registró el peso del extracto seco obtenido y se guardó hasta su uso a 4 °C sin exposición a la luz.

### **6.3.3 Limpieza de clorofilas**

El extracto metanólico de chaya presentó un color verde oscuro por la presencia de clorofilas por lo que se le realizó un proceso de limpieza debido a que existe evidencia de que interfieren en la cuantificación de metabolitos secundarios (polifenoles, flavonoides, esteroides, xantinas, entre otros) pudiendo provocar una sobreestimación de estos (Aguilar-Molina, 2018; Figueroa-Bastidas, 2022).

Se siguió la metodología descrita por Ríos-Cortés et al. (2017), con algunas modificaciones. El extracto seco de chaya se disolvió en 55 mL de MeOH al 100 % y se le añadieron 0.015 g de carbón activado/mL de extracto, empleando un vórtex. La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 10 min. Pasado este tiempo se dejó sedimentar el carbón y con cuidado, se decantó a través de un papel filtro de poro mediano. El extracto se recuperó en un tubo de ensaye y se llevó a sequedad total en un evaporador rotatorio a 45 °C, se registró el peso del extracto seco y se guardó a 4 °C sin exposición a la luz, hasta su uso. De aquí en adelante se referirá como ECH al extracto metanólico obtenido a partir de polvo de hojas de chaya con el proceso de limpieza de clorofilas. Adicionalmente, se alicuotaron en un tubo eppendorf 300 µL del extracto metanólico de hojas de chaya sin la limpieza de clorofilas, se almacenó a 4 °C y en ausencia de luz, hasta su uso para el análisis comparativo con el ECH respecto al contenido de polifenoles totales.

### **6.3.4 Hidrolato de la destilación de hojas de orégano (*Lippia graveolens*)**

El material vegetal utilizado en este proyecto de tesis fue proporcionado por la Dra. Edith Graciela González Mondragón, Profesora-Investigadora adscrita al Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, en forma conjunta con los

integrantes del Cuerpo Académico UTMIX-CA-029. Las plantas de orégano fueron colectadas en Huajuapán de León, Oaxaca, y fue identificado en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM como *Lippia graveolens* HBK (número de vouchers 47938). Las hojas se separaron de los tallos y se seleccionaron aquellas que tenían apariencia de estar sanas. Posteriormente, estas hojas se lavaron con agua de la llave y se dejaron secar a la sombra sobre papel kraft en charolas de plástico. Las hojas secas se trituraron manualmente, y mediante destilación por arrastre de vapor se extrajo el aceite esencial de orégano, el cual se almacenó en un frasco con tapa de color ámbar a 4 °C. El hidrolato, el subproducto líquido de este proceso se recuperó y no se le aplicó ningún tratamiento de concentración posterior. Se almacenó en frascos de plástico con tapa a -20 °C. Antes de su uso, primeramente, se descongeló a 4 °C y después se atemperó. De aquí en adelante este hidrolato será referido como HO.

## **6.4 Caracterización del ECH e HO: Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante**

### **6.4.1 Contenido de polifenoles totales (CPT)**

*Preparación de disoluciones.* A partir de una solución de 1000 µg/mL de AG (se disolvieron 0.01 g de AG en etanol al 70 % y se aforó hasta 10 mL) se preparó 1 mL de cada una de las siguientes diluciones: 100, 300, 500, 700 y 900 µg/mL. Solución de Folin-Ciocalteu 1 N: a partir del reactivo comercial 2 N se prepararon 10 mL mezclando en una proporción 1:1 (v/v) con agua desionizada. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %: Se pesaron 10 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se disolvieron y aforaron hasta 50 mL con agua desionizada.

*Cuantificación.* Se utilizaron 50 µL del HO, así como del extracto metanólico de chaya con y sin la limpieza de clorofila. Se mezclaron con 3 mL de agua desionizada y 250 µL del reactivo de Folin Ciocalteu 1 N. La mezcla se agitó en un vórtex por 10 s y se dejó reposar durante 5 min, se adicionaron 750 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 % y 950 µL de agua desionizada. Se homogenizó la mezcla empleando un vórtex y se dejó reposar por 40 min sin exposición a la luz. Pasado este tiempo, se leyó la absorbancia a 765 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis.

Para la curva de calibración se siguió el mismo procedimiento con 50 µL de cada una de las disoluciones de las diferentes concentraciones de AG. Se graficaron los valores de absorbancia vs [AG], los datos se ajustaron con la ecuación de la línea recta y a partir de los parámetros de ajuste se calculó el CPT en µg de Equivalente de Ácido Gálico por mililitro (µg EAG/mL). El ensayo se realizó por triplicado. El CPT obtenido se utilizó en el ensayo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (apartado 6.5.3).

#### **6.4.2 Actividad antioxidante *in vitro* por el método del DPPH'**

*Solución 0.1 mM del radical comercial DPPH':* Se disolvieron hasta homogeneidad 0.004 g del reactivo en MeOH al 100 % y se aforó hasta 100 mL, se trasvasó a un frasco ámbar con tapa de cierre hermético y se conservó en refrigeración hasta su uso.

Se adicionaron 50 µL del ECH o del HO en 2 mL de disolución del DPPH' 0.1 mM, se mezclaron a homogeneidad empleando un vórtex, se dejó reposar 30 min sin agitación ni exposición a la luz. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 517 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis. Se calculó el porcentaje de inhibición del DPPH' con la Ecuación 1.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - A_M}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde;  $A_{\text{control}}$ : absorbancia de la disolución del DPPH' 0.1 mM y  $A_M$ : absorbancia de la mezcla del ECH o del HO y el DPPH'. Se realizó por triplicado.

## **6.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración**

### **Mínima Bactericida**

#### **6.5.1 Preparación del estándar de McFarland 0.5**

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utiliza recurrentemente el estándar de turbidez de McFarland 0.5 para ajustar en una suspensión bacteriana el número de estas ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), midiendo en un espectrofotómetro UV-Vis la absorbancia entre 0.08 y 0.1 (García, 2010). Para preparar el estándar de McFarland se añade cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) al 1 % en ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 1 % y se produce el precipitado de sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ), que le confiere la turbidez a la solución. Es importante mencionar que el estándar tiene un tiempo de vida de hasta 3 meses a partir de la fecha en que fue preparado.

*Solución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 1 % (v/v).* En un matraz aforado de 100 mL se adicionaron aprox. 90 mL de agua pasada por ósmosis inversa, a continuación, se agregó 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, se aforó hasta 100 mL con agua, la solución se mezcló y se trasvasó a un frasco con tapa rosca, se etiquetó y almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

*Solución de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) al 1 % (p/v).* Se pesó 1 g de  $\text{BaCl}_2$  en un vaso de precipitados de 50 mL, se agregó agua pasada por ósmosis inversa, se disolvió con agitación constante. Se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL, se realizaron varios enjuagues al vaso de precipitados y el agua se adicionó al matraz hasta el aforo de los 100 mL, y se mezcló por

inversión del matraz. Esta disolución se colocó en un frasco con tapa rosca, se etiquetó y almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

*Estándar de McFarland 0.5.* En un matraz volumétrico de 100 mL se agregaron aproximadamente 85 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 %, se adicionaron 0.5 mL de BaCl<sub>2</sub> al 1 % por goteo y con agitación constante (3 a 5 min). En seguida, se aforó hasta 100 mL con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 % y se mantuvo la agitación durante 3-5 min. La solución resultante presentó turbidez de apariencia homogénea cuya absorbancia a 625 nm fue de 0.08-0.1. La solución del estándar de McFarland 0.5 preparada se alicuotó en volúmenes de 10 mL en tubos de ensaye de vidrio con tapa, se sellaron con papel Parafilm y se almacenaron a 4 °C.

### **6.5.2 Obtención de la suspensión bacteriana de *Salmonella***

La cepa reactivada (apartado 6.2) se atemperó, se tomó una azada y se inoculó en 10 mL de MHB contenido en tubos de ensaye con tapa. Se incubó a 37 °C durante toda la noche previa al ensayo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se hizo por triplicado. Cuando se observó el crecimiento de la bacteria se tomaron 100 µL de la suspensión bacteriana, se adicionaron en 10 mL de solución salina de fosfatos (PBS) estéril contenida en tubos de ensaye y se homogeneizó empleando un vórtex con agitación suave. Seguido, se leyó la absorbancia a 625 nm tomando como referencia la del estándar de MacFarland 0.5 (0.08-0.1), y se ajustó con la adición de más cultivo de *Salmonella*, cuando fue necesario. Las soluciones se hicieron por triplicado. La suspensión con la concentración de bacterias ajustada a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL se usó en un tiempo no mayor a los 15 min posteriores a su preparación para garantizar que el número de UFC/mL no varió.

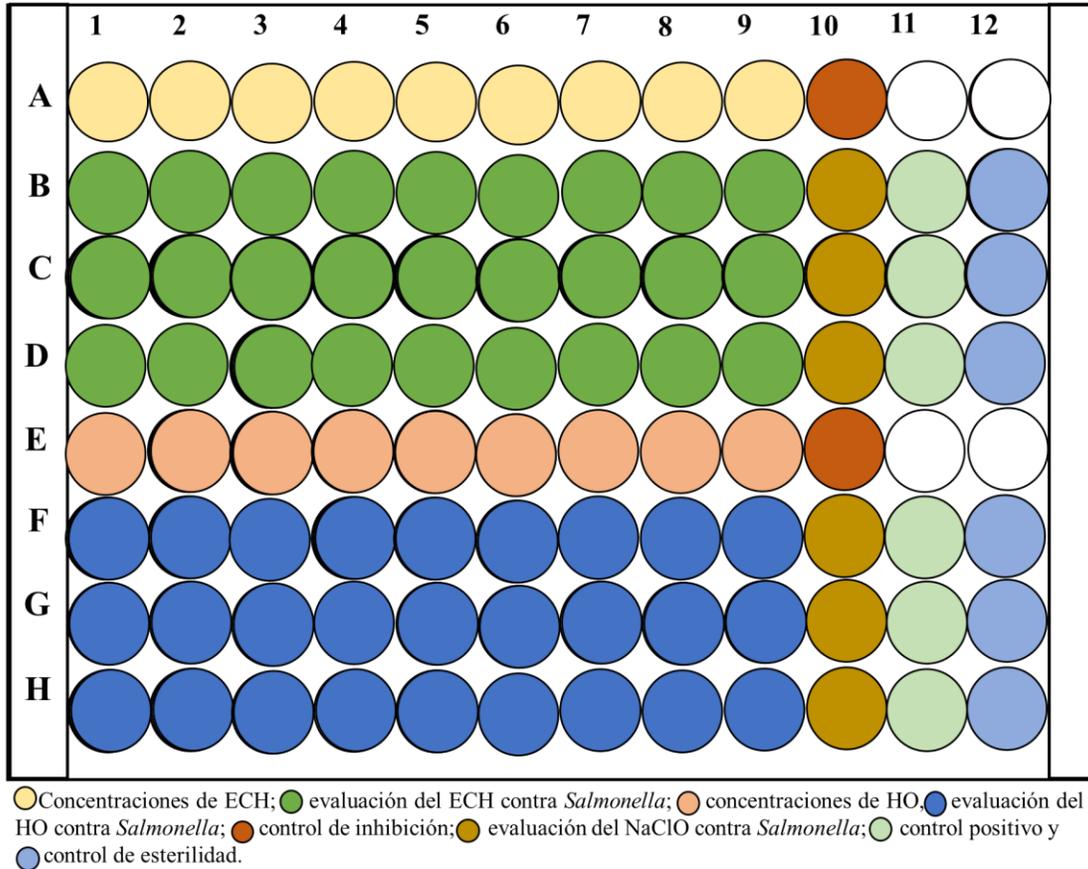
### **6.5.3 Concentración Mínima Inhibitoria**

La metodología para determinar la CMI del ECH y el HO contra *Salmonella* se estableció con base a lo publicado por varios autores empleando el método de microdilución (Pellegrini

et al., 2020; Cortés-Higareda et al., 2021; Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, 2012 (CLSI, por sus siglas en inglés)). Se realizó en placas de 96 pozos a diferentes concentraciones determinadas con base al CPT ( $\mu\text{g}$  EAG/mL) de ECH o HO. El volumen total de cada pozo de la microplaca es de 200  $\mu\text{L}$ , por lo que se estableció un volumen máximo en cada uno de 150  $\mu\text{L}$  constituido como se describe más adelante.

Por otro lado, la CLSI recomienda que la concentración máxima evaluada de los agentes antimicrobianos sea la mitad de la solución concentrada y que a partir de esta se preparen diluciones sucesivas también al 50 % de concentración. En el presente trabajo, se partió del CPT del ECH o HO, que fue determinado 24 h antes del ensayo de la CMI, para preparar las diluciones al 50 % como ya se mencionó.

Se usó hipoclorito de sodio comercial ( $\text{NaClO}$ ) a una concentración de 200 ppm como control de inhibición debido a que es el agente químico más efectivo para eliminar *Salmonella* presente en fresa (Portillo-Torres et al., 2016; Cortés-Higareda et al., 2021). La distribución de las concentraciones que se ensayaron del ECH e HO, así como los diferentes controles, se muestra en la microplaca de 96 pozos (Figura 6.2).



**Figura 6.2.** Distribución de concentraciones ensayadas del ECH e HO y controles para determinar la CMI.

A continuación, se detalla la ubicación y preparación de las diferentes soluciones utilizadas en el experimento de la CMI:

**A1-A9:** se prepararon 180  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones del ECH establecidas.

**B1-B9, C1-C9 y D1-D9:** triplicados donde se adicionaron en cada pozo 50  $\mu\text{L}$  de MHB + 50  $\mu\text{L}$  de ECH a cada una de las concentraciones establecidas + 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

**E1-E9:** se prepararon 180  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones del HO establecidas.

**F1-F9, G1-G9 y H1-H9:** triplicados donde se adicionaron en cada pozo 50  $\mu\text{L}$  de MHB + 50  $\mu\text{L}$  de HO a cada una de las concentraciones establecidas + 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

**10A y 10E:** contiene NaClO a 200 ppm que se preparó mezclando 600  $\mu\text{L}$  de NaClO + 400  $\mu\text{L}$  de MHB.

**B10, C10, D10, F10, G10 y H10:** control de inhibición de *Salmonella* que contiene 50  $\mu\text{L}$  de MHB + 50  $\mu\text{L}$  de NaClO a 200 ppm + 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

**B11, C11, D11, F11, G11 y H11:** control positivo que contiene 100  $\mu\text{L}$  de MHB + 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

**B12, C12, D12, F12, G12 y H12:** control de esterilidad que contiene 150  $\mu\text{L}$  de MHB.

**A11, A12, E11 y E12:** pozos vacíos.

La CMI se determinó con base a la concentración más baja de ECH y/o HO, en la cual no se observó turbidez después de la incubación a 37 °C por 24 h.

#### **6.5.4 Concentración Mínima Bactericida**

La CMB se determinó tomando 10  $\mu\text{L}$  de cada pozo de la microplaca en la que no se observó crecimiento microbiano para el ECH y/o HO. Se inocularon en cajas de MHA mediante siembra con un asa microbiológica. Se incubaron a 37 °C por 24 h. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### **6.6 Caracterización de fresas (*Fragaria*)**

#### **6.6.1 Adquisición de los frutos de fresa y su acondicionamiento**

Se compró 1 kg de fresas frescas en un mercado local de la Heroica Ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca. Los frutos se seleccionaron con madurez de consumo (color rojo brillante

homogéneo), sin daños físicos o con presencia de hongos. Se transportaron al laboratorio de Biotecnología, Edificio de Productos Naturales y Alimentos, de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM). Para su acondicionamiento, primero se enjuagaron al chorro de agua de la llave para remover tierra y materia extraña de los frutos, luego se talló su superficie con jabón líquido y estropajo evitando daños físicos; nuevamente se enjuagaron con agua de la llave y se sumergieron durante 10 min en una solución de NaClO preparada de acuerdo con las instrucciones de uso para la desinfección de alimentos del producto comercial (10 gotas o 250 µL/L), luego se enjuagaron con agua para beber y se dejaron escurriendo en una charola de plástico sobre toallas de papel a temperatura ambiente (NOM-251-SSA1-2009).

#### **6.6.2 Lotificación de fresas frescas y su almacenamiento**

Las fresas se compraron un día antes de la prueba de inhibición de *Salmonella* por el ECH o HO. Se pesaron y, a continuación, se retiró el pedúnculo y sépalo de los frutos. Se procedió a cortar manualmente rodajas de 5 mm de grosor, aproximadamente. Después se pesaron 25 g de rebanadas de fresa y se colocaron en recipientes de plástico con tapa, limpios, secos y etiquetados, de este modo se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Adicionalmente, se desinfectaron fresas completas siguiendo el procedimiento antes descrito.

#### **6.6.3 Índice de madurez (IM) de fresas frescas**

Se determinó el IM como un parámetro cuantitativo del grado de madurez de los frutos que se utilizaron en los ensayos. A partir de fresas completas se obtuvo un jugo homogéneo empleando una licuadora de inmersión, luego se filtró a través de un colador. El jugo de fresa obtenido fue empleado para determinar los °Brix y acidez titulable como se detalla a continuación.

Para la medición de los °Brix se colocaron unas gotas del jugo de fresa en un refractómetro digital, previamente calibrado con agua pasada por ósmosis inversa a 20 °C, se realizó la determinación por triplicado (NMX-F-103-1982). Para la determinación de la acidez titulable, se siguió la metodología establecida en la NMX-F-102-S-1978: 10 mL de jugo de fresa se aforaron hasta 50 mL con agua desionizada, previamente hervida y atemperada. Luego, se trasvasaron a un vaso de precipitados y, con agitación constante, se llevó a cabo una titulación potenciométrica con una solución de NaOH 0.1 N hasta que alcanzó un pH igual a 8.2, y se registró el volumen gastado. La determinación se realizó por triplicado. Se calculó el valor de la acidez titulable considerando que 1 mL de NaOH 0.1 N gastado equivale a 0.006404 g de ácido cítrico anhidro. Los resultados se expresaron como g/100 mL de jugo de fresa (%). A partir de los valores de °Brix y acidez titulable se calculó el IM de la fresa con la Ecuación 2 (NMX-F-102-S-1978).

$$IM = \frac{^{\circ}Brix}{Acidez\ titulable\ (\%)} \quad (\text{Ec. 2})$$

### **6.7 Actividad antimicrobiana de la fuente natural contra *Salmonella* en fresa**

Para llevar a cabo el análisis se usó la metodología establecida en literatura con algunas modificaciones (Gonzalez et al., 2004; Pellegrini et al., 2020). En una Cabina de Seguridad Biológica Clase II, se utilizaron 100 mL de una suspensión bacteriana de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL en PBS estéril. Se tomaron 25 g de fresas rebanadas y se sumergieron durante 30 min a temperatura ambiente en la suspensión bacteriana contenida en un recipiente mini Picadilly. Utilizando pinzas estériles, las fresas se transfirieron a una centrífuga manual y fueron centrifugadas por 5 min para eliminar el exceso de la suspensión de *Salmonella*. Nuevamente, utilizando pinzas estériles, las

rebanadas se sumergieron por 4 min en 100 mL de solución del ECH o HO a la CBI determinada; luego se eliminó el exceso de la fuente natural con una centrífuga manual por 5 min. Como control se emplearon las mismas condiciones utilizadas para las rebanadas de fresas sustituyendo únicamente la suspensión bacteriana y la fuente natural por PBS estéril. Posteriormente, las fresas se transfirieron a una bolsa estéril con filtro y se le agregaron 225 mL de PBS estéril; mediante estrujado se obtuvo una solución homogénea del fruto de fresa, a partir de la cual se prepararon diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-1}$ - $1 \times 10^{-6}$ ) en PBS estéril, las cuales fueron inoculadas en medio de cultivo XLD para evaluar la inhibición de *Salmonella* por la fuente natural, se incubó durante 24 h a 37 °C. El análisis microbiológico se realizó por duplicado.

Los cálculos para determinar las UFC/mL fueron los siguientes:

- a) Factor de Dilución (FD): dilución inicial (1/10) x diluciones sucesivas (1/10)
- b) Factor Decimal de Dilución (FDD): 1/FD
- c) 
$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{número de colonias contabilizadas en la placa} \times FDD}{\text{volmen inicial sembrado (mL)}}$$
- d) Los resultados se expresaron como: 1) no hubo crecimiento microbiano, 2) recuentos significativos entre 30 y 300 UFC y 3) UFC/mL como potencia de base 10.

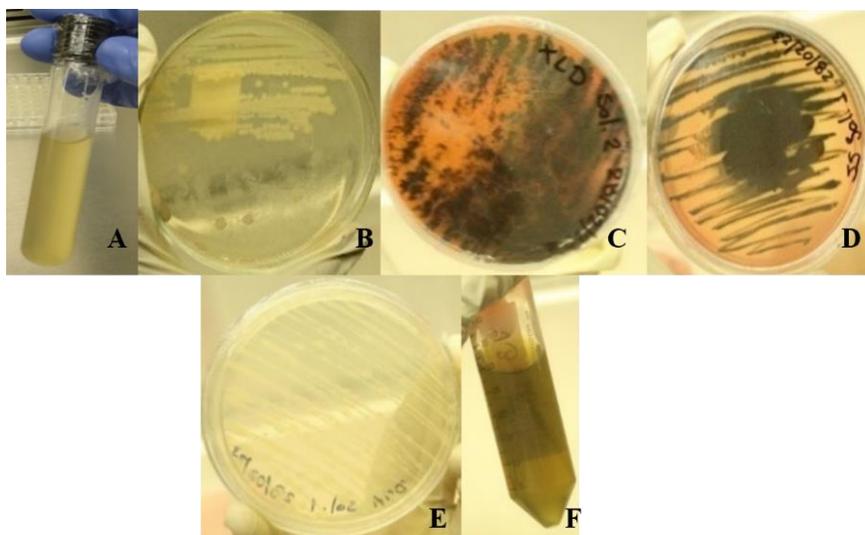
## 6.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar para lo cual se utilizó el programa OriginPro 2016.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Reactivación de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

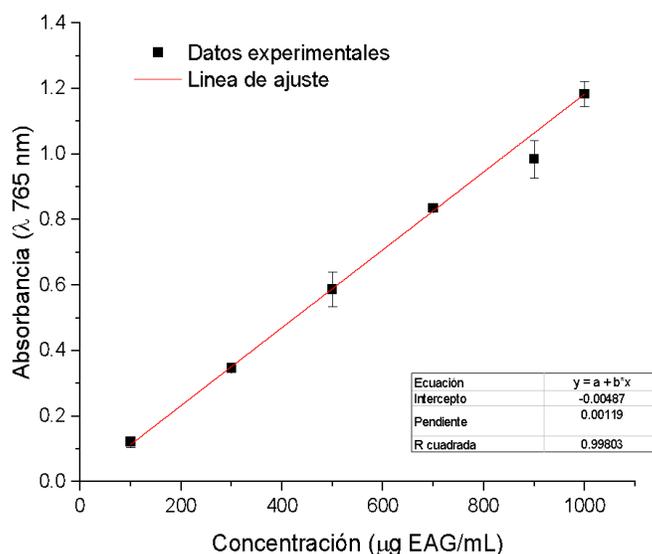
Los resultados de los ensayos microbiológicos para cada uno de los medios de cultivo utilizados para la reactivación de la cepa de *Salmonella* se presentan en la Figura 7.1: turbidez en el MHB (A); colonias blancas, cremosas e incontables para MHA (B); colonias rojas y negras incontables para el XLD (C); colonias completamente negras e incontables para el SS (D); colonias blancas e incontables, que no presentaron transparencia para el DNASA (E); y turbidez sin producción de gas para el VBB (F). Estos resultados permitieron comprobar que el crecimiento de la cepa *S. enterica* subsp. *enterica* fue conforme con lo establecido en Normas y Manuales para este género (NOM-114-SSA1-1994; Britania Laboratorio, 2015; Britania Laboratorio, 2021).



**Figura 7.1.** Reactivación de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

### 7.2 Contenido de Polifenoles Totales (CPT) y actividad antioxidante (AA)

Se utilizaron los parámetros de ajuste que se obtuvieron del gráfico de la Figura 7.2, para calcular el CPT.



**Figura 7.2.** Curva de calibración para el cálculo del contenido de polifenoles totales. Se utilizó el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu a 765 nm y la [ác. gálico] en  $\mu\text{g EAG/mL}$ .

**Tabla 7.1.** Obtención del extracto metanólico de polvo de hojas de чая.

Polvo de hojas de чай (g)	Disolvente (mL)	Extracto seco con clorofilas (g)	CPT ( $\mu\text{g EAG/mL}$ ) <sup>a</sup>
1	150	0.890	$349.330 \pm 3.40$
2	300	1.692	$342.910 \pm 1.3$

Se obtuvo mediante extracción asistida por ultrasonido y agotamiento de la muestra. CPT: contenido de polifenoles totales. <sup>a</sup>Valor promedio de triplicados del CPT, se usó el extracto de чай después de la limpieza de clorofilas.

Como se puede observar en la Tabla 7.1, cuando se utilizaron 2 g de polvo de hojas de чай el peso del extracto seco se incrementó también al doble aprox., en comparación de cuando se utilizó 1 g, como era de esperarse. Dicho resultado expuso la reproducibilidad del proceso de extracción utilizado con respecto al CPT independientemente de la relación polvo:disolvente empleado para la obtención del ECH, lo que es importante porque su variación puede llegar a influir en la reproducibilidad de los resultados de inhibición de *Salmonella* debido a que al grupo de los polifenoles se les está confiriendo esta propiedad biológica.

El CPT del extracto de chaya con clorofilas y con el tratamiento de limpieza de estas, así como del HO se exponen en la Tabla 7.2 y también contiene los resultados de la actividad antioxidante.

**Tabla 7.2.** Caracterización del extracto metanólico e hidrolato con respecto al CPT y AA.

Fuente natural	CPT µg EAG/mL	CPT mg EAG/g (b.s.)	AA % inhibición
Extracto metanólico de chaya con clorofilas.	227.20 ± 1.70	3.06 ± 0.23	ND
ECH	349.33 ± 3.40	4.71 ± 0.50	15.7 ± 0.04
HO	219.00 ± 0.02	ND	35.4 ± 0.01

ND: No se determinó. b.s.: base seca. CPT: Contenido de polifenoles totales. AA: Actividad antioxidante.

El proceso de eliminación de clorofilas favoreció el incremento del CPT 1.5 veces, con lo que se pudo constatar que el uso de carbón activado no provocó la disminución de este tipo de compuestos en el ECH. Por lo que, este tratamiento pudo haber eliminado posibles interferencias con el reactivo de Folin-Ciocalteu, como el ácido ascórbico (Muñoz-Bernal et al., 2017) que ha sido identificado en chaya (Kuri-García et al., 2017). En cuanto a la actividad antioxidante se observó que el ECH fue menor 2 veces con respecto al HO, a pesar de que el CPT fue mayor, lo que puede deberse a que los compuestos presentes en el extracto posiblemente tienen menor actividad antioxidante o una sinergia negativa entre ellos (Boik et al., 2009).

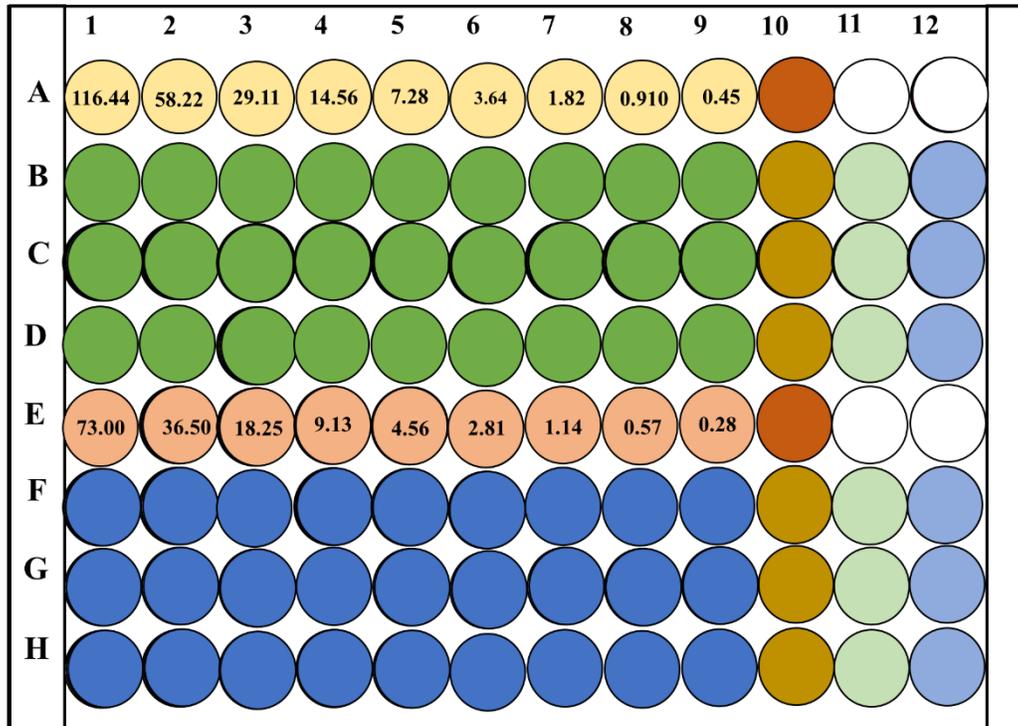
Us-Medina y colaboradores (2020), empleando hojas de *Cnidocolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst obtuvieron valores mayores de CPT en el intervalo de 10.44-70.61 g EAG/100 g extracto liofilizado (EL) o 104.4-706.1 mg EAG/g EL. Es importante resaltar que la concentración de polifenoles determinado en el presente trabajo se encuentra dentro de los valores registrados para este tipo de compuestos obtenidos de fuentes naturales (4.1-68 mg de EAG/g de extracto b.s.) (Osorio-Tobón, 2020). Para un extracto etanólico de hojas de

chaya (*C. aconitifolius*) el CPT fue de 5.6-35.7 mg EAG/g de extracto b.s. (Kuri-García et al., 2017); Godínez-Santillán et al. (2019) determinaron este parámetro a partir de un EL de hojas de esta planta donde utilizaron como disolvente metanol:agua (80:20) obteniendo un valor del CPT de  $61.1 \pm 2.6$  mg EAG/g EL. Como ha sido demostrado, la variación en el CPT puede deberse a ciertos factores como condiciones bióticas y abióticas del lugar de cultivo, método de secado (si lo hay), disolvente utilizado y método de extracción (Kuri-García et al. 2017).

Mediante el método del DPPH<sup>\*</sup> Us-Medina y colaboradores (2020) determinaron una AA del 17 % aprox. para 300 µg EAG/mL de extracto de chaya, este es un valor cercano al que se obtuvo en el presente trabajo a la misma concentración de ECH. Utilizando el mismo método Kuri-García et al. (2017) evaluaron la AA para un extracto etanólico de hojas de chaya (*C. aconitifolius*) donde la inhibición fue del 10.6 %. Por lo tanto, el resultado obtenido en este trabajo se encontró en el intervalo de valores de AA publicado para extractos de hojas de chaya.

### **7.3 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Mínima Bactericida (CMB)**

Se prepararon nueve concentraciones del ECH o del HO (A1-A9 y E1-E9, respectivamente, en la Figura 7.3) en una microplaca con base al CPT (µg EAG/mL) que fue determinado para cada uno de ellos. La distribución del resto de las soluciones para el ensayo de inhibición contra *Salmonella*, así como los controles fue detallado en el apartado de la Metodología.



● Concentraciones de ECH en  $\mu\text{g EAG/ mL}$ , ● evaluación del ECH contra *Salmonella* para determinar la CMI,  
 ● concentraciones de HO en  $\mu\text{g EAG/ mL}$ , ● evaluación del HO contra *Salmonella* para determinar la CMI,  
 ● control de inhibición: hipoclorito de sodio (NaClO) a 200 ppm, ● evaluación del NaClO contra *Salmonella*,  
 ● control positivo: 100  $\mu\text{L}$  de MHB + 50  $\mu\text{L}$  de suspensión de *Salmonella* y ● control de esterilidad: 150  $\mu\text{L}$  de MHB.

**Figura 7.3.** Evaluación de la CMI del ECH e HO contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. La suspensión bacteriana tuvo una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL.

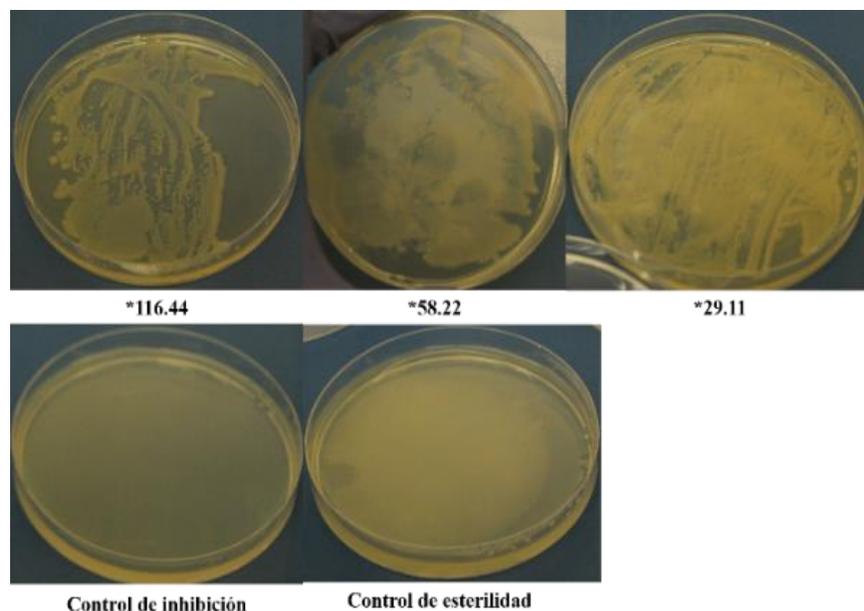
Los resultados mostraron que a las 24 h de incubación no se observó turbidez para las tres soluciones de mayor concentración del ECH: 116.440, 58.222 y 29.111  $\mu\text{g EAG/mL}$  (Figura 7.4). A pesar de que el método para determinar la CMI recomienda un tiempo de incubación de 24 h (Rochín-Medina et al., 2019; Budiati et al., 2022), se realizó por 48 h y se observó que las muestras de los pozos B1-3, C1-3 y D1-3 se mantuvieron sin cambio. Por lo tanto, el ECH a estas concentraciones tuvo actividad antimicrobiana contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* y la CMI para el ECH fue 29.111  $\mu\text{g EAG/mL}$ .



**Figura 7.4.** Ensayo de la CMI con el ECH e HO. Se utilizó una suspensión bacteriana de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Se incubó a 48 h a 37 °C.

Para el caso del HO ninguna de las nueve concentraciones evaluadas presentó actividad contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Figura 7.4). La turbidez en los pozos fue por el crecimiento bacteriano debido a que los controles de inhibición y esterilidad no la presentaron (Figura 7.4).

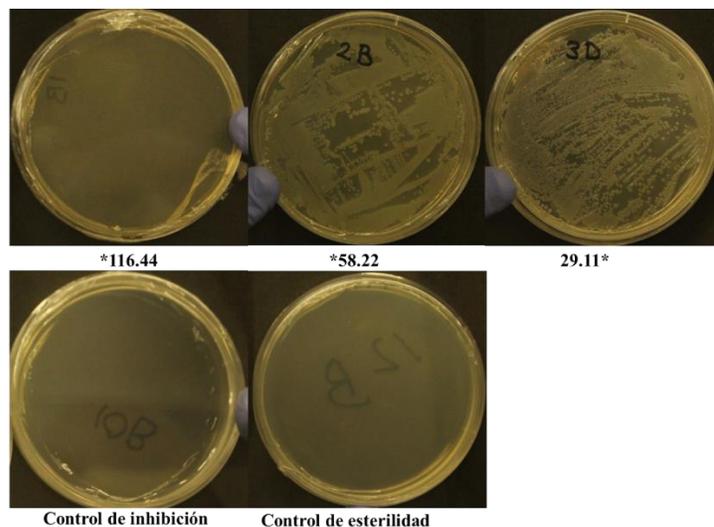
A continuación, se determinó la CMB solo para el ECH, se tomaron 10  $\mu$ L de cada uno de los pozos sin turbidez y se inocularon e incubaron como se detalló en el apartado de Metodología. A las 24 h todos los cultivos mostraron crecimiento de *Salmonella* a excepción los controles de inhibición y de esterilidad (Figura 7.5).



**Figura 7.5.** Determinación de la CMB para ECH. Se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  de los pozos correspondientes a las tres concentraciones del extracto de chaya donde no se observó crecimiento (turbidez) de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en la prueba de la CMI. Se incubaron durante 24 h a 37 °C. \*Concentraciones de ECH en  $\mu\text{g}$  EAG/mL.

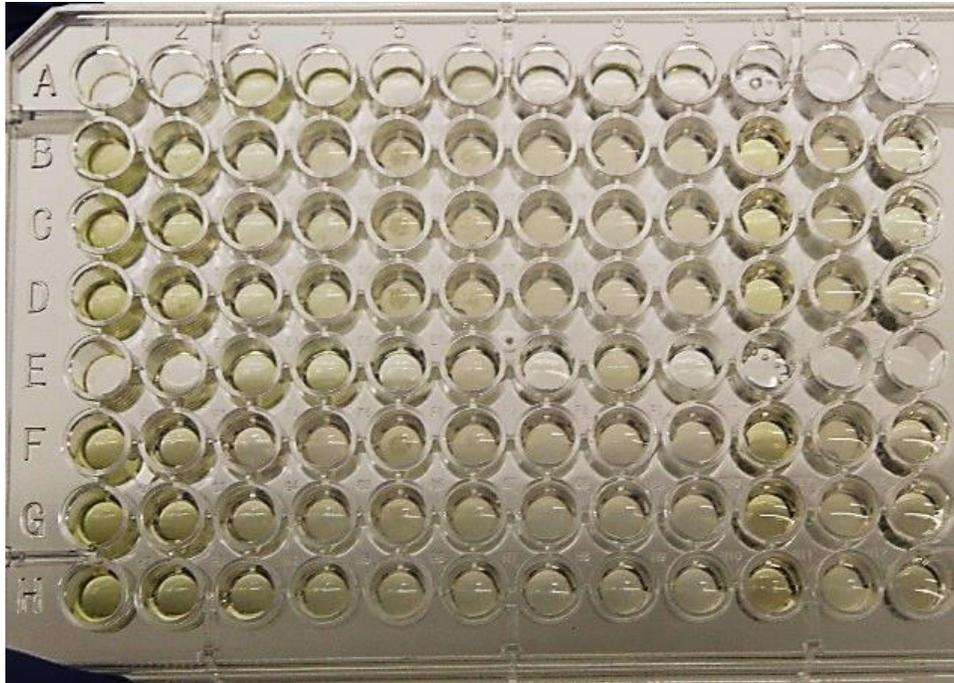
De acuerdo con estos resultados se decidió realizar nuevamente el ensayo de la CMI solamente con el ECH y la única variante del tiempo de incubación por 24 h que, como ya se mencionó, es el tiempo establecido en la literatura para este ensayo. Se observaron sin turbidez únicamente las dos concentraciones mayores del ECH, por lo tanto, no hubo reproducibilidad con respecto al primer ensayo para la CMI. Lo anterior pudo deberse posiblemente a que en esta ocasión la estandarización de la suspensión bacteriana se hizo en 60 min aprox. en comparación con 20 min requeridos en el ensayo previo, lo que implicó el traslado en más de una ocasión al laboratorio donde está ubicado el espectrofotómetro UV-Vis para leer la absorbancia. Durante este tiempo la microplaca con las soluciones del ECH a las diferentes concentraciones, permaneció expuesta a la luz de la lámpara de la cabina de seguridad, lo que pudo haber provocado una degradación de los polifenoles del ECH, ya que se ha demostrado que este tipo de compuestos son fotosensibles (Liang et al., 2020). Para la

CMB empleando 10  $\mu\text{L}$  de los dos pozos con las concentraciones mayores del ECH mostró que la dilución de 116.44  $\mu\text{g}$  EAG/mL no tuvo crecimiento bacteriano (Figura 7.6).

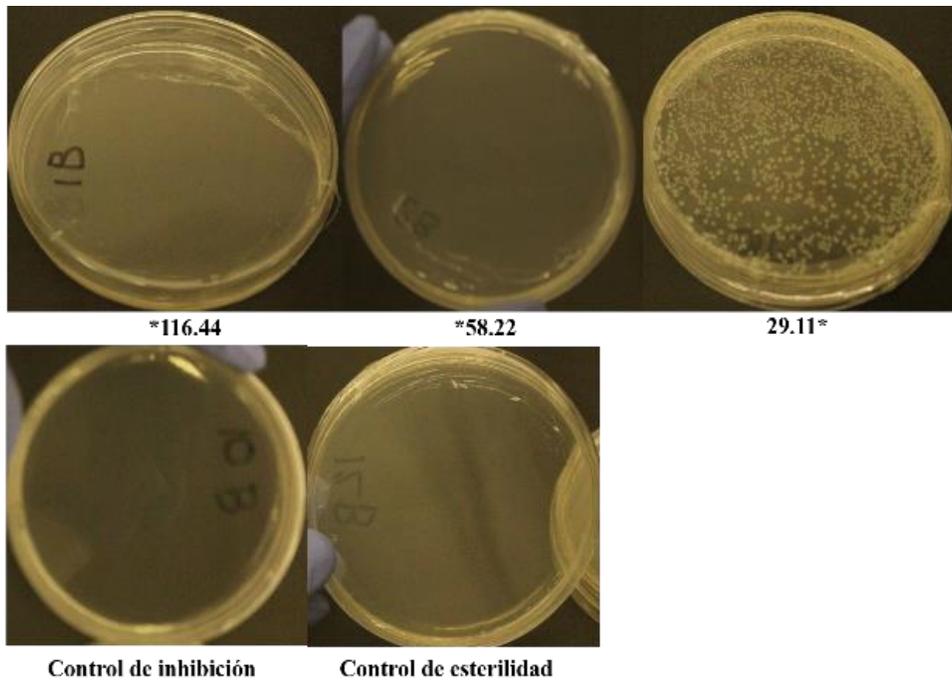


**Figura 7.6.** Réplica de la determinación de la CMB con el ECH. Se utilizó una suspensión de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, 24 h de incubación a 37 °C. \*Concentraciones en  $\mu\text{g}$  EAG/mL.

Por tercera ocasión se repitieron los ensayos de la CMI y la CMB con el siguiente procedimiento: 1) se estandarizó la suspensión bacteriana a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL y se mantuvo a 4 °C hasta su uso, 2) se adicionó a los pozos de la microplaca el MHB y se prepararon las cinco concentraciones mayores del ECH ( $\mu\text{g}$  EAG/mL), 3) se agregó la suspensión bacteriana estandarizada a cada uno de los pozos y se homogeneizaron. Finalmente, se incubó por 24 h a 37 °C. Los resultados fueron reproducibles con respecto al primer ensayo realizado y se confirmó que la CMI fue 29.111  $\mu\text{g}$  EAG/mL (Figura 7.7); mientras que la CMB fue 58.222  $\mu\text{g}$  EAG/mL (Figura 7.8).



**Figura 7.7.** Tercer ensayo de la CMI con el ECH. Se utilizó una suspensión de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, 24 h de incubación a 37 °C.



**Figura 7.8.** Tercer ensayo de la CMB con el ECH. Se utilizó una suspensión de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, 24 h de incubación a 37 °C. \*Concentraciones en  $\mu\text{g}$  EAG/mL.

Con base a los resultados obtenidos, se puede aseverar que el extracto metanólico de polvo de hojas de chaya tiene actividad antimicrobiana contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en el intervalo de concentraciones, referidas como CPT, de 116.440 a 58.222 µg EAG/mL. La actividad antimicrobiana de las hojas de chaya contra *Salmonella*, fue publicada en una Comunicación corta en el 2007 por Awoyinka y colaboradores. Los autores usaron hojas de chaya cultivadas en una Universidad de Nigeria, obtuvieron un extracto con etanol al 96 % por el método de soxhlet durante 3 h, lo filtraron a través de un papel filtro Whatman y el filtrado se concentró en un rotaevaporador a 30 °C por 35 min, finalmente, en una estufa de secado a 45 °C lo llevaron a peso constante. Realizaron una prueba de sensibilidad cualitativa (método de difusión en disco) con este extracto (20 mg/mL por disco) y *Salmonella* Typhi que fue obtenida de pacientes de un hospital; la suspensión fue estandarizada entre 1 y  $2 \times 10^7$  UFC/mL con respecto al estándar 0.5 de McFarland, como control utilizaron cloranfenicol. Observaron que la zona de inhibición (mm) del extracto de chaya fue 11 veces menor ( $1.5 \pm 0.5$  mm) con respecto a la del cloranfenicol ( $17.0 \pm 0.1$  mm), a partir de estos resultados los autores concluyeron que *C. aconitifolius* tiene aplicación como agente antimicrobiano.

Con respecto a la publicación anterior, es importante destacar que los resultados del presente trabajo de tesis son relevantes porque se investigó la posible aplicación del extracto de chaya con actividad anti-*Salmonella* en el fruto de fresa fresca. Además, se evidenció la inhibición total de la serovariedad *Salmonella enterica* subsp. *enterica* mediante pruebas cuantitativas (CMI y CMB). La reproducibilidad de los resultados se logró muy probablemente porque siempre se usó la misma concentración, con base al CPT, del ECH y no con respecto al volumen o al peso seco de este que, como ya se expuso, pueden variar e influir en los resultados de la inhibición de *Salmonella*. Es importante señalar que el ECH se utilizó en una concentración menor de la total calculada (349.33 µg EAG/mL), y que se obtuvo a partir de

hojas de chaya cultivada en México por agotamiento de la muestra empleando EAU, cuyas ventajas con respecto a otros métodos de extracción son que: 1) el extracto se obtiene en menor tiempo (Sridhar et al., 2021; Zhang et al., 2021; Bitwell et al., 2023), 2) las frecuencias del sonido que se utilizan incrementan la permeabilidad de la pared celular favoreciendo el contacto entre el disolvente y los componentes del material vegetal, 3) incremento en la eficiencia de la extracción y 4) las temperaturas que se utilizan se encuentran entre 20-30 °C (Sridhar et al., 2021; Fongang Fotsing et al., 2021; Bitwell et al., 2023).

Hasta el momento no hay publicaciones de la actividad del hidrolato de orégano *Lippia graveolens* contra *Salmonella*, las investigaciones de la CMI con esta especie han utilizado su aceite esencial (Rivero-Cruz et al., 2011). Sin embargo, cuando se expuso *Salmonella* Typhimurium al hidrolato de orégano *Poliomintha longiflora* no se inhibió su crecimiento (Cid-Pérez et al., 2019), lo que concuerda con lo observado en este trabajo de tesis; estos autores comentaron que pudo deberse a la baja concentración de los compuestos bioactivos presentes en el hidrolato que utilizaron sin ningún proceso de concentración previo. Para la evaluación de la CMI en este trabajo, como ya se expuso, se cuantificó el CPT del HO y la concentración máxima utilizada fue de 73.0 µg EAG/mL, valor intermedio entre las concentraciones del ECH que mostraron inhibición contra *Salmonella*, por lo tanto, probablemente los compuestos presentes en el HO no poseen la actividad antimicrobiana contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* o no se encuentran en una relación dosis-respuesta requerida para la inhibición de esta bacteria.

Por otra parte, las actividades biológicas de las hojas de chaya (*C. aconitifolius*), incluida la antimicrobiana, se han relacionado con la presencia de diferentes grupos de los polifenoles como: ácidos, taninos, flavonoides, cumarinas y flobataninos (Awoyinka et al., 2007; Oyagbemi et al., 2011; Fagbohun et al., 2012, Jiménez-Arellanes et al., 2014; Kuri-García et

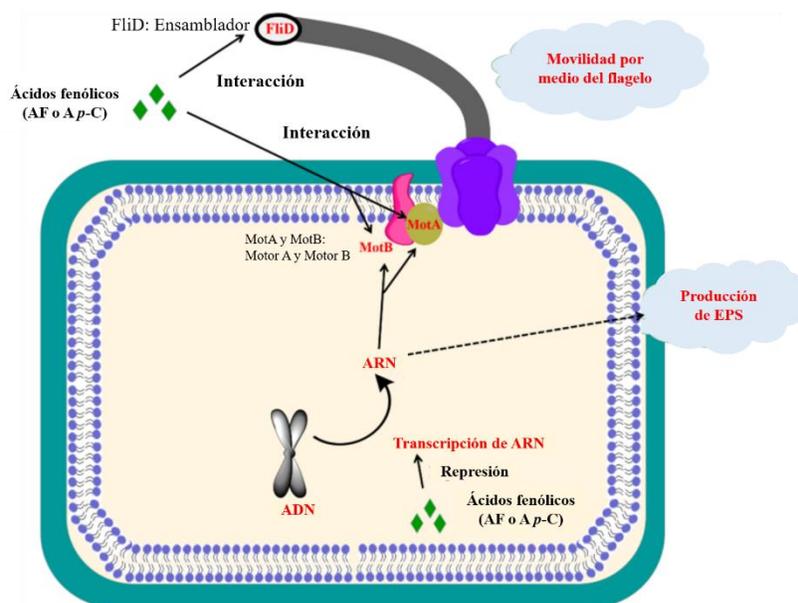
al., 2017). Los compuestos polifenólicos que han sido identificados en *C. aconitifolius* son: kaempferol-3-O-glucósido y quercetina-3-O-glucósido (Jiménez-Arellanes et al., 2014); sulfato de hispidulina, eucaliptina, epigallocatequina di-O-galato, epicatequina di-O-galato, acutifolina D (Numa et al., 2015); los ácidos: gálico, clorogénico, caféico, *p*-cumárico, ferúlico (Ortiz-Mora et al., 2017), vainílicico, rosmarínico, así como el resveratrol, luteolina y apigenina (Godínez-Santillán et al., 2019).

También en *C. aconitifolius* están presentes otros grupos de compuestos como las saponinas, xantonas, cromonas, sesquiterpenos, lignanos y alcaloides (Awoyinka et al., 2007; Oyagbemi et al., 2011; Fagbohun et al., 2012). Con respecto a estos últimos, existe evidencia de que poseen actividad contra *Salmonella* (Yan et al., 2021), motivo por el cual se decidió analizar su presencia en el ECH obtenido en el presente trabajo de tesis, mediante cromatografía en capa fina (sílica gel) con un sistema de disolventes metanol/acetato (1:1 v/v), y no se tuvo un resultado positivo al reactivo de Dragendorff, que es específico para detectar alcaloides (Figura 7.9). Sin embargo, no se puede descartar su presencia en hojas de chaya porque fueron identificados en extractos etanólicos de esta planta, aunque en menor relación con respecto a los polifenoles (Awoyinka et al., 2007). Por lo tanto, en trabajos futuros es importante analizar la composición química de *C. aconitifolius* utilizada en este trabajo.



**Figura 7.9.** Identificación de alcaloides en el ECH con el reactivo de Dragendorff. Se hizo cromatografía en placas de sílica-gel y fase móvil de metanol/acetato (1:1, v/v).

Respecto a la actividad antimicrobiana de los compuestos polifenólicos contra *Salmonella*, Xu et al. (2022), evaluaron por separado los ácidos ferúlico y *p*-cumárico comerciales. Establecieron para ambos el siguiente posible mecanismo (Figura 7.10): 1) Se introducen en la célula bacteriana a través de la membrana e interactúan con las estructuras Motor A y B, 2) Ingresan a la bacteria a través de su flagelo y una vez en el interior del microorganismo, son represores de la transcripción del ARN lo que provoca la disminución de la producción de exopolisacáridos. Derivado de los mecanismos anteriores, se afectan en la bacteria su capacidad de motilidad y quimiotaxis, así como, la disminución en la formación de la biopelícula.



**Figura 7.10.** Posible mecanismo de la actividad antimicrobiana de los ácidos ferúlico y *p*-cumárico contra *Salmonella*. Modificado de Xu et al. (2022).

Es importante resaltar que, en este trabajo de tesis, se evaluó un extracto y no compuestos puros, por lo tanto, posiblemente la inhibición de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* se debió al efecto de los componentes presentes en este. Por ejemplo, en un extracto metanol:agua (80:20, v/v) de hojas frescas de *C. aconitifolius* se cuantificaron (en orden descendente de concentración): ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, ácido clorogénico, resveratrol, ácido gálico, luteolina, ácido vainílico, ácido cafeico, vainillina, apigenina y ácido ferúlico; este último fue 38.5 veces menor con respecto al ácido *p*-cumárico (Godínez-Santillán et al., 2019). Lo anterior sustenta el hecho de que hay más de un compuesto polifenólico en el extracto de hojas de chaya dentro de los que se encuentran los ácidos *p*-cumárico y ferúlico, que fueron propuestos en el mecanismo contra *Salmonella*. En futuros trabajos es importante identificar y cuantificar la composición química del extracto de chaya utilizado en este trabajo.

#### 7.4 Inhibición de *Salmonella* en fresa fresca

A las fresas frescas seleccionadas visualmente con una madurez de consumo, también se le determinó el índice de madurez (IM) el cual fue de 6.92, calculado a partir de los valores de °Brix ( $6.3 \pm 0.1$ ) y acidez titulable ( $0.91 \pm 0.02$ ) (Figura 7.11); el cual estuvo en el intervalo de valores (5 a 14) que se ha obtenido para este fruto maduro (López-Valencia et al., 2018). Por lo tanto, se corroboró cuali y cuantitativamente que las fresas utilizadas en este trabajo fueron maduras.



**Figura 7.11.** Fresas utilizadas para los ensayos de actividad antimicrobiana contra *Salmonella*.

Es importante mencionar que para el ensayo de actividad antimicrobiana con la fresa se decidió evaluar primeramente la concentración máxima del CPT utilizada en la prueba de la CMI con el ECH ( $116.44 \mu\text{g EAG/mL}$ ); considerando que el fruto como cualquier alimento es una matriz compleja y, de este modo, asegurar la inhibición de la bacteria tomando como referencia el valor de la CMB establecida *in vitro*. Si el resultado fue positivo, a continuación, se propuso evaluar con la concentración correspondiente a la CMB.

En los ensayos con las rebanadas de fresa fresca, después de su exposición a la solución de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* y su escurrimiento, se observó que estas no presentaron

ningún cambio en su apariencia ni daño físico. Sin embargo, posterior a la inmersión en el ECH (116.44  $\mu\text{g}$  EAG/mL) y del escurrimiento, las rebanadas presentaron un color verdoso en la pulpa de la fresa y se afectó ligeramente su firmeza (Figura 7.12A).

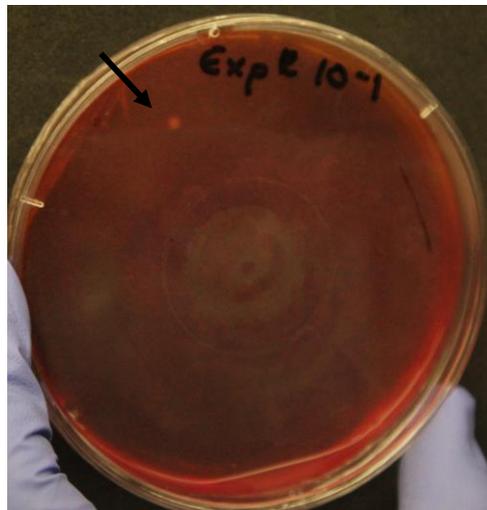


**Figura 7.12.** Fresas utilizadas en la prueba del efecto inhibitorio del ECH contra *Salmonella* (A) y su control (B). Los frutos se desinfectaron con NaClO (200 ppm) y se obtuvieron rebanadas de 5 mm de grosor. Los procedimientos aplicados a las fresas fueron: A) se sumergieron en la suspensión de la bacteria, se centrifugaron, se sumergieron en el ECH y se centrifugaron nuevamente. B) Como control se siguió el mismo procedimiento que en (A) sustituyendo la suspensión de *Salmonella* y el ECH con solución de PBS estéril.

Cuando estas rebanadas se colocaron en la solución de PBS dentro de la bolsa con filtro, se pudieron estrujar fácilmente y se obtuvo una solución homogénea de color rojo (Figura 7.13) partir de esta solución se prepararon diluciones seriadas ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) las cuales fueron inoculadas en el medio de cultivo selectivo XLD. Después de 24 h de incubación a 37 °C para la dilución  $10^{-1}$  (Figura 7.14) se observó una colonia y hubo ausencia de *Salmonella* en el resto. A las 48 h de incubación se mantuvieron sin cambio todos los cultivos.



**Figura 7.13.** Solución homogénea de fresas en PBS estéril. Se obtuvo de estrujar las rebanadas del experimento mostrado en la figura 7.12 A.

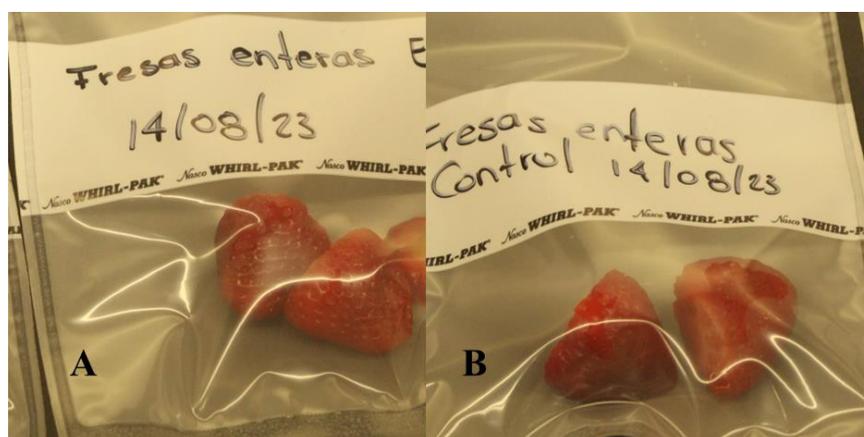


**Figura 7.14.** Crecimiento de *Salmonella* en XLD. De la solución obtenida del procedimiento de la figura 7.13 se inocularon 100  $\mu\text{L}$  de la dilución  $10^{-1}$ . Se incubó por 24 h a 37 °C.

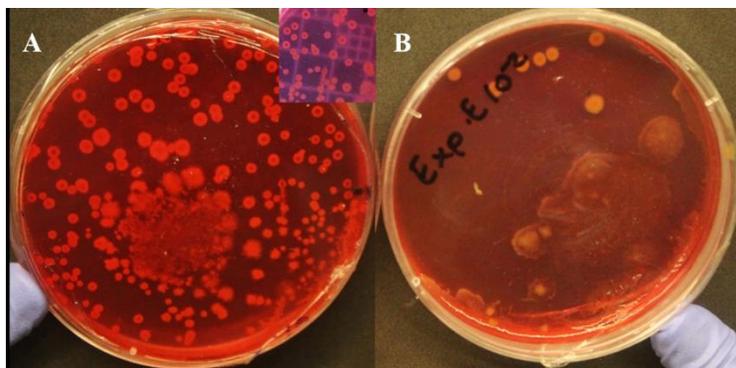
Basándose en este resultado, no se evaluó la concentración que se estableció en el ensayo de la CMB. De acuerdo con la NOM-210-SSA1-2014, *Salmonella* debe estar ausente en los alimentos, lo que no se cumplió con el ECH en comparación con las muestras de rebanadas de fresas que fueron tratadas con la solución de NaClO a 200 ppm, donde no se observó el crecimiento de este patógeno en ninguna de las diluciones evaluadas. No obstante, es un resultado novedoso debido a que se logró la inhibición casi en su totalidad de *Salmonella* usando un extracto natural a baja concentración. Además, se evaluó en un alimento y no se

limitó únicamente a determinar la CMI y CMB. Posiblemente se consiga la inhibición total de *Salmonella* aumentando el tiempo de exposición de las rebanadas en el ECH o a una mayor concentración de este.

Considerando que la desinfección de la fresa se hace normalmente en los frutos completos, a la par se realizó la misma prueba con las fresas frescas enteras (25 g aprox.) acondicionadas como se expuso en la sección de la Metodología. En recipientes aparte, se siguió el mismo procedimiento usado con las rebanadas de fresa y en las mismas condiciones. Se observó que los frutos mantuvieron su consistencia y color posterior a la inmersión en la suspensión bacteriana, el ECH y la centrifugación (Figura 7.15). Al momento de estrujar los frutos en PBS dentro de las bolsas con filtro, se tuvo que hacer un poco de más esfuerzo para deshacer la fresa, pero se logró obtener una solución homogénea igual de color rosado.



**Figura 7.15.** Fresas enteras utilizadas en la prueba del efecto inhibitorio del ECH contra *Salmonella* (A) y su control (B). Los procedimientos aplicados a las fresas fueron: A) se sumergieron en la suspensión de la bacteria, se centrifugaron, se sumergieron en el ECH y se centrifugaron nuevamente. B) Como control se siguió el mismo procedimiento que en (A) sustituyendo la suspensión de *Salmonella* y el ECH por solución de PBS estéril.



**Figura 7.16.** Crecimiento de *Salmonella* en XLD. De la solución obtenida del estrujado del procedimiento de la figura 7.15A se inocularon 100  $\mu$ L de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ . Se incubaron por 24 h a 37 °C. Inserto: colonias con centros negros por la formación de  $H_2S$ .

Se observó crecimiento en las tres primeras diluciones y se contabilizaron 161 y 14 colonias en la  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  (Figura 7.16), respectivamente. En el inserto de esta misma figura se observan colonias con centros negros debido a la formación de  $H_2S$ , un aspecto característico del crecimiento de *Salmonella* en XLD. En la dilución  $10^{-3}$  no se observaron colonias bien definidas lo que no permitió su conteo, y en las restantes ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$ ) no hubo crecimiento. Por lo tanto, las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  presentaron una reducción en la carga microbiana de  $10^5$  y  $10^4$  UFC/mL, respectivamente, con respecto a la inicial de la suspensión bacteriana ( $10^8$  UFC/mL). A pesar de que el ECH no inhibió a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* si es un resultado importante como una alternativa natural con efecto contra *Salmonella*.

El resultado para las fresas enteras no coincide con lo que se observó para las rebanadas, éstas últimas presentaron una mayor reducción en la carga de *Salmonella*, lo que posiblemente pudo deberse a: 1) Las rodajas tuvieron una mayor área de exposición con el ECH, 2) el pH ácido del fruto ( $2.5 \pm 0.03$ ) pudo brindarle protección antimicrobiana a este (Viñas et al. 202) y 3) un efecto sinérgico de los compuestos polifenólicos presentes en el ECH y/o en la pulpa de las fresas rebanadas, porque existe evidencia de la actividad

antimicrobiana de extractos de pulpa de este fruto utilizando etanol acidificado (Cárdenas-Valdovinos et al., 2018).

En cuanto a las fresas enteras, hubo una menor área de exposición de los frutos con el ECH, lo que no permitió la absorción de los componentes en la bacteria, considerando el mecanismo de acción propuesto por Xu et al. (2022). Lo cual podría explorarse mediante la medición de permeación (Matínez Navarrete et al., 1999) del extracto en el fruto.

Por otro lado, dentro de su mecanismo de supervivencia, *Salmonella* tiene la capacidad de formar una biopelícula (compuesta por exopolisacáridos) que se ha evidenciado les confiere resistencia a los agentes antimicrobianos (Viñas et al., 2020). Por lo tanto, posiblemente en la fresa entera con mayor área de superficie con respecto a la rebanada, se incrementó la cantidad de biopelícula lo que pudo haber interferido con el efecto inhibitorio del ECH contra esta bacteria. Este aspecto se recomienda investigar con más detalle en futuros trabajos.

## 8. CONCLUSIONES

1. El extracto de hojas de chaya mostró una CMI de 29.11  $\mu\text{g}$  EAG/mL y una CMB de 58.22  $\mu\text{g}$  EAG/mL contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, por lo tanto, se pudo constatar que la chaya es una fuente potencial para inhibir a este patógeno letal para el ser humano utilizando concentraciones menores a la inicial registrada para el extracto metanólico (349.33  $\mu\text{g}$  EAG/mL). Además, se logró evidenciar un uso diferente al que normalmente se la da a esta planta.
2. El hidrolato de orégano no mostró inhibición contra *Salmonella entérica* subsp. *enterica* en el intervalo de concentraciones evaluadas con base al contenido de polifenoles totales.
3. El extracto de chaya no mostró actividad antimicrobiana en su totalidad en fresas contaminadas con *Salmonella entérica* subsp. *enterica*. Cuando se evaluó este fruto en rodajas únicamente la dilución  $10^{-1}$  presentó el crecimiento de una colonia en el medio XLD. Cuando se hizo la evaluación con fresas completas hubo crecimiento en las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , a pesar de estos resultados, se demostró la capacidad del extracto de chaya en la reducción de la carga microbiana de *Salmonella*. Sobre la base de estos resultados, se presenta por primera vez el uso de un desinfectante natural en fresa para el control de *Salmonella*, y también la posible aplicación de las hojas de chaya (*C. aconitifolius*) como agente antimicrobiano natural, sin embargo, se tiene que realizar más investigación al respecto.

## 9. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis se recomienda realizar investigación en futuros trabajos contemplando los siguientes aspectos:

1. Cuantificación de flavonoides en extracto de hojas de chaya debido a que en trabajos publicados para esta planta son el grupo de compuestos mayoritarios a los que se les ha atribuido actividad antimicrobiana.
2. Obtención de extracto de hojas de chaya con disolventes polares como agua, etanol y mezcla de estos, porque basándose en la literatura se expuso que a medida que se incrementa la polaridad de los disolventes aumenta la actividad antimicrobiana de la fuente natural contra *Salmonella*.
3. Análisis de compuestos mayoritarios presentes en los extractos de hoja de chaya (*C. aconitifolius*) mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas con analizador cuádruplo de tiempo de vuelo (UPLC-QTOF), lo que permitirá identificar y cuantificar los compuestos que posiblemente le confieren actividad antimicrobiana al extracto de chaya contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.
4. Para aprovechamiento integral de la planta de chaya se propone obtener extractos de los tallos y su caracterización similar al de las hojas. Esto debido a que en los trabajos publicados no hay información al respecto.
5. Establecer condiciones experimentales de concentración y tiempo de exposición a los extractos de chaya que permitan la inhibición de *Salmonella* en fresas frescas en rebanas y frutos completos.

6. Evaluar el posible el efecto en la motilidad y formación de biopelícula de *Salmonella* por su exposición a extractos de hoja y tallo de chaya.
7. En condiciones de inhibición total de *Salmonella*, desarrollar la formulación de un desinfectante a base de esta fuente natural.

## 10. REFERENCIAS

- Abbas, M., Saeed, F., Muhammad-Anjum, Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Ishtiaq, A., Hussain, S. & Rasul-Suleria, H. A. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689-1699. 10.1080/10942912.2016.1220393
- Aguilar-Molina, S. (2018). *Evaluación del efecto del tratamiento con carbón activado en la composición de polifenoles durante la eliminación de clorofilas en extractos de plantas* [Tesis de licenciatura, Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales].
- Alfaro-Mora, R. (2018). Aspectos relevantes sobre *Salmonella* sp. en humanos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 34(3), 110-122. <http://scielo.sld.cu>
- Alvarado Cepeda, Y. A. (2020). *Respuesta agronómica y calidad de fresa San Andreas producida bajo diferentes sistemas de agricultura protegida*. [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro].
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5-16. 10.1093/jac/48.suppl\_1.5
- Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S. & González de Mejía, E. (2004). El oregano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componente. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.
- Awoyinka, O. A., Balogun, I. O., Ogunnowo, A. A. (2007). Phytochemical screening and in vitro bioactivity of *Cnidioscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(3), 63-65.
- Bae, J.-Y., Seo, Y.-H. & Oh, S.-W. (2022). Antibacterial activities of polyphenols against foodborne pathogens and their application as antibacterial agents. *Food Science Biotechnology*, 31(8), 985-997. 10.1007/s10068-022-01058-3
- Bailiak, M., Burdyliuk, N. & Lushchak, V. (2017). Growth on Alpha-Ketoglutarate Increases Oxidative Stress Resistance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Microbiology*, 2017, 5792192. 10.1155/2017/5792192
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P.A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J.F. & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus*

- sabdariffa). *Industrial Crops and Products*, 69, 385-394.  
10.1016/j.indcrop.2015.02.053
- Base de datos estadísticos corporativos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación [FAOSTAT]. (2023). Datos de la producción de fresa. Recuperado de:  
[https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries\\_by\\_commodity](https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity)
- Bitwell, C., Indra, S. S., Lukec, C. and Kakoma, M. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585.  
10.1016/j.sciaf.2023.e01585
- Boik, J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Seymour, E. M. & Spelman, K. (2009). Interactions of Bioactive Plant Metabolites: Synergism, Antagonism, and Additivity. En A. Kirakosyan & P. B Kaufman, *Recent Advances in Plant Biotechnology* (pp. 213-230). Springer. 10.1007/978-1-4419-0194-1\_10
- Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., Bordes, C. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) Models. *Frontiers in Microbiology*, 10, 829. 10.3389/fmicb.2019.00829
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2011). *Jawetz, Melnick & Adelberg: Microbiología Médica* (25a. edición). McGraw-Hill Interamericana.
- Britania Laboratorio. (2015). Caldo Verde Brillante Bilis 2 %. Recuperado de:  
[https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6054e8cd82576.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e8cd82576.pdf)
- Britania Laboratorio. (2021). Agar de la enzima desoxirribonucleasa (DNAsa). Recuperado de:  
[https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_607067e62ab29.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607067e62ab29.pdf)
- Britania Laboratorio. (2021). Agar Mueller-Hinton y Caldo Mueller-Hinton. Recuperado de:  
[https://www.britanialab.com/productos/producto/25/medios\\_de\\_cultivo\\_listos\\_para\\_us/-/-/251/mueller\\_hinton\\_agar](https://www.britanialab.com/productos/producto/25/medios_de_cultivo_listos_para_us/-/-/251/mueller_hinton_agar)
- Budiati, T., Suryaningsih and Bethiana, T. N. (2022). Antimicrobial of tropical fruit and vegetable waste extract for food-borne pathogenic bacteria. *Italian Journal of Food Safety*, 11(3), 10510. doi: 10.4081/ijfs.2022.10510

- Calva, E. (2009). *Salmonella typhi y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública*. Instituto de Biotecnología, UNAM. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>
- Cárdenas-Valdovinos, J. G., Oyoque-Salcedo, G., Loeza-Lara, P. D., Oregel-Zamudio, E., Angoa-Pérez, M. V. & Mena-Violante, H. G. (2018). Antibacterial potential of anthocyanic extracts of strawberry on *Staphylococcus aureus* associated to bovine mastitis. *Acta Universitaria*, 28(5), 52-57. 10.15174/au.2018.1630
- Carroll, K. C., Morse, S. A., Mietzner, T. & Miller, S. (2016). *Jawetz, Melnick & Adelberg: Microbiología Médica* (27a edición). McGraw-Hill Interamericana.
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2018). National outbreak reporting system (NORS). <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>.
- Cid-Pérez, T. S., Ávila-Sosa, R., Ochoa-Velasco, C. E., Rivera-Chavira, B. E. & Nevárez-Moorillón, G. V. (2019). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Mexican Oregano (*Poliomintha longiflora*) Essential Oil, Hydrosol and Extracts from Waste Solid Residues. *Plants*, 17, 8(1), 22. 10.3390/plants8010022
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S. & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035
- Chin-Chan, T., Ortiz-García, M. M., Ruiz-Gil, P. J. & Martínez-Castillo, J. (2021). Genetic diversity of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I. M. Johnst. ssp. *aconitifolius*) in Yucatan, Mexico, its putative domestication center. *Polibotánica*, 51, 185-201. 0.18387/polibotanica.51.12
- Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard (Ninth Edition)*, 32(2).
- Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C. & Castro del Campo, N. (2019). The last 50 years of Salmonella in Mexico: Sources of isolation and factors that influence its prevalence and diversity. *Revista Bio Ciencias*, 6(2), e540. 10.15741/revbio.06.nesp.e540
- Cortés-Higareda, M., Bautista-Baño, S., Ventur-Aguilar, R. I., Landa-Salgado, P. &

- Hernández-López, M. (2021). Bacterias patógenas de los alimentos agrícolas frescos y mínimamente procesados. Estado actual en el control del género *Salmonella*. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 22 (1), 13-28.
- Coppo, E. & Marchese, A. (2014). Antibacterial Activity of Polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15, 380-390. 10.2174/138920101504140825121142
- Cruz-Torres, J. A., Calderón-Oropeza, M. A. & Sánchez-Espinosa, A. C. (2019). Costo de producción de extractos de raíz de *Adenophyllum aurantium* (L.) Strother para uso antifúngico en el sector agrícola. *Revista Latinoamericana de Educación y Estudios Interculturales-RLEEI*, 3(3), 108-119. [http://cresur.edu.mx/OJS/index.php/RLEEI\\_CRESUR/article/view/456](http://cresur.edu.mx/OJS/index.php/RLEEI_CRESUR/article/view/456).
- Darwin, K. H. & Miller, V. L. (1999). Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3), 405-428. 10.1128/CMR.12.3.405.
- D'Amato, S., Serio, A., Chavez López, C. & Paparella, A. (2018). Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*, 86(2018), 126-137. 10.1016/j.foodcont.2017.10.030
- De los Santos Villamil, A. A., Hernández Anguiano, A. M., Eslava Campos, C. A., Landa Salgado, P., Mora Aguilera, G. & Luchasky, J. B. (2012). Producción de biopelículas y resistencia a desinfectantes en cepas de *Salmonella* aisladas de nopal, agua y suelo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1063-1074.
- Dewick, P. M. (2002). The Shikimate Pathway: Aromatic Amino Acids and Phenylpropanoids. En P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (pp. 137-186). John Wiley and Sons, Ltd.
- Dirección General de Normas. (2014). *Normas Oficial Mexicana. NOM-210-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Diario Oficial de la Federación.*
- Dirección General de Normas. (2002). *Normas Mexicanas NMX-FF-062-SCFI-2002, Productos alimenticios no industrializados para consumo humano. Fruta fresca. Fresa (Fragaria X Ananassa, Dutch). Especificaciones y métodos de pruebas.* (cancela a la NMX-FF-062-1987). Diario Oficial de la Federación.

- [www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=721615&fecha=09/08/2002#gsc.tab=0](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=721615&fecha=09/08/2002#gsc.tab=0)
- Dirección General de Normas. (1982). *Normas mexicanas. Secretaria de Economía. NMX-F-103-1982. Alimentos, frutas y derivados. Determinación de grados Brix.*
- Dirección General de Normas. (1978). *Normas Mexicanas. Secretaria de Economía. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. NMX-F-102-S-1978.*
- Dreamstime. (2023). Estructuras celulares de *Salmonella* y anatomía. Recuperado de: <https://es.dreamstime.com/estructuras-celulares-de-salmonela-y-anatom%C3%ADa-taway-c%C3%A9lulas-bacteria-salmonella-enteri-etiquetado-con-nucle%C3%B3sidos-abanico-image186817361>
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E. & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother Res.*, 33(9), 2221-2243. 10.1002/ptr.6419
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications -a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2512-2518. 10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab-Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G. & Lee, L. H. (2015) *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance, *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293. 10.1080/21553769.2015.1051243
- Escalante-Erosa, Ortegón-Campos, Ortegón-Campos, I., Parra-Tabla, V. & Peña-Rodríguez, L. M. (2004). Chemical composition of the Epicuticular Wax of *Cnidocolus aconitifolius*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48, 24-25.
- Fagbohun, E. D., Egbegi, A. O. & Lawal, O. U. (2012). Phytochemical screening, proximate analysis and in-vitro antimicrobial activities of methanolic extract of *Cnidocolus aconitifolius* leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 13(1), 28-33.
- FAOSTAT. (2019). *The statistics division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations*: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/S>.
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G. & Pollio, A. (2011). Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: A Review. *Molecules*, 16(2), 1486-1507. 10.3390/molecules16021486

- Fierascu, R. C., Temocico, G., Fierascu, I., Ortan, A. & Babeanu, N. E. (2020). *Fragaria* genus: chemical composition and biological activities. *Molecules*, 25(3), 498  
10.3390/molecules25030498
- Figueroa-Bastidas, V. L. (2022). *Remoción de clorofilas como interferencias analíticas de una muestra vegetal* [Tesis de licenciatura, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas].
- Fongang Fotsing, Y. S., Kezetas, B., Batiha, G., Ali, I. & Lenta, B. (2021). *Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs*. En El-Shemy H.A. *Natural Medicinal Plants*. (pp. 1-39). IntechOpen. 10.5772/intechopen.98602
- Food and Drug Administration (FDA). (2017). *Investigates Multiple Outbreaks of Salmonella Strains Linked to Papayas*. Recuperado de: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/la-fda-investiga-multiples-brotos-de-cepas-de-salmonella-vinculadas-papayas>
- Food and Drug Administration & World Health Organization [FAO/WHO]. (2009). Chapter 3: Chemical risk assessment. Benefits and Risks of the Use of Chlorine-containing Disinfectants in Food Production and Food Processing. Report of a Joint FAO/WHO Expert Meeting (pp. 136).
- García Ángeles, B., Soto Simental, S., González Tenorio, R. & Ayala Martínez, M. (2022). Efecto del hidrolato de orégano (*Oreganum vulgare*) sobre algunas características de calidad de Nuggets elaborados con carne de conejo. *Nacameh*, 16(1), 39-49.
- García-Pérez, E., Castro-Álvarez, F. F., Gutiérrez-Urbe, J. A. & García-Lara, S. (2012). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(2), 339-353.
- Gimeno-Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*, 23(6), 84-84. 161108344
- Giampieri, F., Tulipani, S., Álvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B. & Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), 9-19. doi: 10.1016/j.nut.2011.08.009
- Godínez-Santillán, R. I., Chávez-Servín, J. L., García-Gasca, T. & Guzmán-Maldonado, S. H. (2019). Phenolic characterization and antioxidant capacity of alcoholic extracts from raw and boiled leaves of *Cnidioscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Acta Botánica Mexicana*, 126, e1493. 10.21829/ abm126.2019.1493

- Góngora-Chi, G. J., Lizardi-Mendoza, J., López-Franco, Y. L., López-Mata, M. A. & Quihui-Cota, L. (2023). Métodos de extracción, funcionalidad y bioactividad de saponinas de *Yucca*: una revisión. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 25(1), 147-155.
- Gonzalez, J. R., Luo, Y., Ruíz- Cruz, S. & Mc Evoy, J. L. (2004). Efficacy of Sanitizers to Inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut carrot shreds under simulated process water conditions. *Journal of Food Protection*, 67(11), 2375-2380. 10.4315/0362-028X-67.11.2375
- González-Salas, R., Vidal del Río, M. M. & Monsalve-Guamán, A. A. (2023). Diagnóstico y transmisión de la infección alimentaria salmonelosis. *Revista Dilemas Contemporáneos: Educación Política y Valores*, 2(91), 1-20.
- Hussain, M. A. & Dawson, C. O. (2013). Economic Impacto of Food Safety Outbreaks on Food Businesses. *Foods*, 2(4), 585-589. 10.3390/foods2040585
- Hussain, S. Z., Naseer, B., Qadri, T., Fatima, T., Bhat. T. A. (2021). Strawberry (*F.×ananassa*). Morphology, taxonomy, composition and health benefits. En *Fruits grown in highland regions of the Himalayas. Nutritional and Health Benefits*, (pp. 219-228). Springer. 0.1007/978-3-030-75502-7\_17
- Iañez Pareja, E. (1998). Curso de Microbiología General de Enrique Iañez. Apéndices filamentosos bacterianos. Recuperado de: [http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/11\\_micro.htm](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/11_micro.htm)
- Instituto de Salud Pública de Chile [ISP]. (2019). *Salmonella* spp. Boletín de Vigilancia de Laboratorio, 9, 13.
- Iza-Segovia, E. E. (2013). *Comparación del coprocultivo vs la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para la detección de Salmonella Typhi en muestras fecales*. [Tesis de Licenciatura, Quito, Ecuador].
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance, *Veterinary World*, 12(4), 504-521. doi: 10.14202/vetworld.2019.504-521
- Jiménez-Arellanes, M. A., García-Martínez, I., Rojas-Tomé, S. (2014). Potencial biológico de especies medicinales del género *Cnidocolus* (Euphorbiaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45 (4), 1-6.

- Kaur, J. & Jainista, S. K. (2012). Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiological Research*, 167(4), 199-210. doi: 10.1016/j.micres.2011.08.001
- Khan, C. M. A. (2014). The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the Microbiota, within the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 846049, 23. 10.1155/2014/846049
- Kirshchbaum, D. S. (2022). *Características botánicas, fisiología y tipos de variedades de fresas*. Namesny, A., Conesa, C., Olmos, L. M., Papasseit, P. (Eds). En Cultivo, Poscosecha, Procesado y Comercio de Berries. Valencia, España. (pp. 1-601). <http://hdl.handle.net/20.500.12123/12068>
- Komaravelli, N., Tian, B., Ivanciuc, T., Mautempd, N., Brasier, A. N., Garofalo, R. P. & Casola, A. (2015). Respiratory syncytial virus infection down-regulates antioxidant enzyme expression by triggering deacetylation-proteasomal degradation of Nrf2. *Free radical biology and medicine*, 88, 391-403. 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.043
- Kowalska, B. (2023). Fresh vegetables and fruit as a source of *Salmonella* bacteria: Review. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 30(1), 9-14. 10.26444/aaem/156765
- Kowalska-Krochmal, B. & Dudek-Wicher, R. (2021). Review: The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, 10(2), 1-21. 10.3390/pathogens10020165
- Kuri-García, A., Chávez-Servín, J. L. & Guzmán-Maldonado, S. H. (2017). Phenolic profile and antioxidant capacity of *Cnidocolus chayamansa* and *Cnidocolus aconitifolius*: A review. *Journal Medicinal Plants Research*, 11(45), 713-727. 10.5897/JMPR2017.6512
- Kuti, J. O. & Konuru, H. B. (2004). Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of Tree Spinach (*Cnidocolus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 117-121. 10.1021/jf030246y
- García, L. (2010). Preparation of Routine Media and Reagents Used in Antimicrobial Susceptibility Testing. En Leber A. L., *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. (3ra edición, pp. 5.14.1.1-5.14.1.4). Wiley.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working

- mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
- Liang, X., Nielsen, N. J. & Christensen, J. H. (2020). Selective pressurized liquid extraction of plant secondary metabolites: *Convallaria majalis* L. as case. *Analytica Chimica Acta*: X, 4, 100040. 10.1016/j.acax.2020.100040
- Lock, U. O. (1987). Productos naturales: Importancia y perspectiva. *Revista de química*, 1, 49-54. Recuperado de:  
<https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/16441>
- López-Hernández, A. (2017). *Desarrollo de una bebida funcional híbrida adicionada con extracto polifenólico obtenido a partir de cáscara de granada (Punica granatum), y la evaluación de sus propiedades antioxidante y antiviral* [Tesis de maestría, Universidad Tecnológica de la Mixteca]. En confidencialidad.
- López-Valencia, D., Sánchez-Gómez, M., Acuña-Caita, J. F. & Fischer, G. (2018). Propiedades fisicoquímicas de siete variedades destacadas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duc.) cultivadas en Cundinamarca (Colombia), durante su maduración. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 19(1), 1-16.
- Mahmoud, B. S. M., Bhagat, A. R. & Linton, R. H. (2007). Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* on strawberries by chlorine dioxide gas. *Food Microbiology*, 24(7-8), 736-744. 10.1016/j.fm.2007.03.006
- Manso, T., Lores, M. & de Miguel, T. (2021). Antimicrobial Activity of Polyphenols and Natural Polyphenolic Extracts on Clinical Isolates. *Antibiotics (Basel)*, 11(1), 46. 10.3390/antibiotics11010046
- MacGowan, A. P. & Wise, R. (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 17-28. 10.1093/jac/48.suppl\_1.17
- Martinez Navarrete, N., Andrés Grau, A. M., Chiralt Boix, A. & Fito Maupoey, P. (1999). Capítulo 10. Mecanismo difusional en alimentos. Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno (1a. edición). Universidad Politécnica de Valencia (España).
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A. & Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(3), 47. 10.3390/agronomy7030047

- Mena-Linares, Y., González-Mosquera, D. M., Valido-Díaz, A., Pizarro-Espín, A., Orestes-Castillo, A. & Escobar-Román, R. (2016). Estudio fitoquímico de extractos de hojas de *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh (Chaya). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1-13.
- Mendoza-Isaza, N. A., Hoyos-Arbeláez, J. A. & Peláez-Jaramillo, C. A. (2020) Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales de extractos de tallo de *Stevia rebaudiana* en varios modelos in vitro. *Revista EIA*, 17(34), 1-9. Reia34006. 10.24050/reia.v17i34.1282
- Muñoz-Bernal, O. A., Torres-Aguirre, G. A., Nuñez-Gastélum, J. A., de la Rosa L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F. & Álvarez-Parrilla E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23-28.
- Nabor, A. (2020). Conoce qué es la chaya y cuáles son sus beneficios. El Universal. Recuperado de: <https://www.eluniversal.com.mx/menu/descubre-que-es-la-chaya-y-cuales-son-sus-beneficios/>
- Numa, S., Rodríguez, L., Rodríguez, D. & Coy-Barrera, E. (2015). Susceptibility of *Tetranychus urticae* Koch to an ethanol extract of *Cnidoscolus aconitifolius* leaves under laboratory conditions. *Springerplus*, 4(338), 1-10. 10.1186/s40064-015-1127-z
- Olszowy, M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 135-143. 10.1016/j.plaphy.2019.09.039.
- Organización Mundial de la Alimentación (FAO)/Organización Mundial de la Salud (OMS). (1983). *Codex Alimentarius Programa Conjunto sobre normas alimentarias*. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/>.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). *Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria*. Recuperado de: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1)
- Ortega-Peña, S. & Hernández-Zamora, E. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico del Hospital*

- Infantil de México*, 75, 79-88. 10.24875/BMHIM.M18000012
- Ortiz-Mora, E. F., González-Mondragón, E. G., Hernández-García, Y., Villalobos-Delgado, L. H., Santiago-Gómez, M. P. & Salazar-Govea, A. Y. (2017). *Análisis de Cnidoscopus acotinifolius (chaya) como posible fuente de ácido ferúlico*. [Presentación oral] Congreso Internacional de Investigación de Academia Journals.com, Celaya, Guanajuato, México.
- Ortiz-Solá, J., Colás-Medá, P., Nicolau-Lapeña, I., Alegre, I., Abadías, M. & Viñas, I. (2022). Pathogenic potential of the surviving *Salmonella Enteritidis* on strawberries after disinfection treatments based on ultraviolet-C light and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 364, 109536. 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109536
- Osorio-Tobón, J. F. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 57(12), 2499-4315. 10.1007/s13197-020-04433-2
- Oyagbemi, A. A., Odetola, A. A. & Azeez, O. I. (2011). Phytochemical Investigation and Proximate Analysis on the Leaves of *Cnidoscopus aconitifolius*. *Journal of Medicinal Food*, 14(3), 322-324. 10.1089/jmf.2008.0321
- Paredes, F. & Roca, J. J. (2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva a la acción antimicrobiana. *Farmacología*, 23(3), 116-124.
- Pellegrini, M., Rossi, C., Palmieri, S., Maggio, F., Chaves-López, C., Sterzo, C. L., Paparella, A., De Medici, D., Ricci, A. & Serio, A. (2020). *Salmonella enterica* Control in Stick Carrots Through Incorporation of Coriander seeds Essential Oil in Sustainable Washing Treatments. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(14), 1-9. 10.3389/fsufs.2020.00014
- Pérez-Lavalle, L., Carrasco, E., Vallesquino-Laguna, P., Cejudo-Gómez, M., Posada-Izquierdo, G. D. & Valero, A. (2021). Internalization capacity of *Salmonella enterica* sv Thompson in strawberry plants via root. *Food Control*, 126, 108080. 10.1016/j.foodcont.2021.108080
- Popa, G. L. & Popa, M. I. (2021). *Salmonella* spp. infection-a continuous threat worldwide. *Germs*, 11(1), 88-96. 10.18683/germs.2021.1244
- Portillo-Torres, L. A., Gómez-Aldapa, C. A., Villagómez-Ibarra, J. R., Román-Gutiérrez, A. D., Rangel-Vargas, E. & Castro-Rosas, J. (2016). Efecto de hipoclorito de sodio y ácido

- acético en la reducción de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri* sobre fresa (*Fragaria x ananassa*). *Boletín De Ciencias Agropecuarias Del ICAP*, 2(4). 10.29057/icap.v2i4.304
- Rasouli, Hassan, Farzei, M. H. & Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(52), 1700-1741. 10.1080/10942912.2017.1354017
- Ríos-Cortés, G., Ramírez Aguilar, D., Bobadilla Reyes, C. Q., Ríos Cortés, A. M., Ramírez Bello, M. A., Sales Chávez, R. M., & Rosas Morales, M. (2017). Remoción de clorofilas presentes en extractos de Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) por adsorción con carbón activado y precipitación con cal grado alimenticio. *Acta Universitaria*, 27(1), 67-75. 10.15174/au.2017.1209
- Rivero-Cruz, I., Duarte, G., Navarrete, A., Bye, R., Linares, E. & Mata, R. (2011). Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils. *Journal of Food Science*, 76(2), 309-317. 10.1111/j.1750-3841.2010.02022.x
- Robledo-López, A. (2015). *Investigación de Salmonella spp. en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos*. [Trabajo final de grado. Escuela Superior de Agricultura de Barcelona]. <http://hdl.handle.net/2099.1/26111>
- Rochín-Medina, J. J., Sotelo-Castro, J. A., Salazar-Salas, N. Y., López Valenzuela, J. A. & Ramírez, K. (2019). Antioxidant and anti-*Salmonella* activities of eggplant peel compounds obtained by solvent-free calcium-based extraction. *CyTA Journal of Food*, 17(1), 873-881. 10.1080/19476337.2019.1675762
- Ross-Ibarra, J. (2003). Origen y domesticación de la chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* Mill I. M. Johnst): La espinaca Maya. *Mexican Studies/Estudios Mexicanos*, 19(2), 287-302. 10.1525/msem.2003.19.2.287
- Rossi, Ch., Chaves-López, C., Možina, S. S., Di Mattia, C., Scuota, S., Luzzi, I., Jenič, T., Paparella, A. & Serio, A. (2019). *Salmonella enterica* adhesion: Effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on lettuce. *LWT-Food Science and Technology*, 111, 16-22. 10.1016/j.lwt.2019.05.026
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N.,

- Alshabrm, F. M., Palai, S., Deb, P. K. & Devi, R. (2022). Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 806470. 10.3389/fphar.2022.806470
- Salgado-Escobar, I., Hernández-Rodríguez, G., Suárez-López, Y. C., Mancera-Ugarte, M. J. & Guerra-Ramírez, D. (2020). Eficacia de los métodos de desinfección y los efectos sobre las propiedades nutraceuticas en cilantro y fresa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 11(2), 327-337.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. & Hernández-Carlos, B. (2019). Chapter 2. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. En Shalaby, E. *Antioxidants* (pp. 1-28). IntechOpen. 10.5772/intechopen.85270
- Sánchez-Leal, L. C. & Corrales-Ramírez, L. C. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Revista NOVA*, 3(4), 21-29. 10.22490/24629448.333
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA]. (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030: Fresa Mexicana*. Recuperado de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>
- Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología (DGE). (2022). *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA)*. México: Recuperado de: [https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/44\\_Manual\\_EDA2022.pdf](https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/44_Manual_EDA2022.pdf)
- Secretaria de Salud. (2009). *Norma Oficial Mexicana. Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. NOM-251-SSA1-2009*.
- Secretaria de Salud. (2009). *Norma Oficial Mexicana. Jugos de frutas preenvasados-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información. NOM-173-SCFI-2009*.
- Secretaria de Salud (1994). *Norma Oficial Mexicana para bienes y servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos NOM-114-SSA1-1994*.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA]. (2023). Monitor de inocuidad alimentaria. EUA: Seguimiento a la alerta de importación 99-19,

- sobre retención de productos alimenticios por detección de *Salmonella* spp.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA]. (2022). Monitor de inocuidad alimentaria. EUA: Brote de *Salmonella* Enteritidis en la ciudad de Manchester, estado de New Hampshire.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA]. (2022). Monitor de inocuidad alimentaria Unión Europea: Brote de *Salmonella* Enteritidis en diferentes países de la UE vinculados con el consumo de huevo.
- Sgarbossa, A., Giacomazza, D. & Di Carlo, M. (2015). Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. *Nutrients*, 7(7), 5764-5782. 10.3390/nu7075246
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H. & Gogate, P. R. (2012). Chemical Engineering and Processing: Process Intensification Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations. A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10-23. 10.1016/j.cep.2012.01.003
- Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S., Kapoor, A., Dai-Viet, N. V. & Prabhakar, S. (2021). Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 3409-3443. 10.1007/s10311-021-01217-8
- Tereschuk, M. L., Quaarengi, M. V., González, M. & Baigorí, M. D. (2007). Actividad antimicrobiana de flavonoids aislados de *Tagetes* del Noa. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 6(6), 364-366.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols: A review. *Nutrients*, 2, 1231-1246. 10.3390/nu2121231
- Us-Medina, U., Millán-Linares, M. C., Arana-Argaes, V. E. & Segura-Campos, M. R. (2020). Actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro de extractos de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I. M. Johnst). *Nutrición Hospitalaria*, 37(1), 46-55. 10.20960/nh.02752
- Villanueva, X., Zhen, L., Nunez Ares, J., Vackier, T., Lange, H., Crestini, C. & Steenackers, H. P. (2023). Effect of chemical modifications of tannins on their antimicrobial and antibiofilm effect against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13(2022), 1-15. 10.3389/fmicb.2022.987164
- Viñas, I., Valero, A., Gimeno, V., López, L., Aguiló-Aguayo, I., Abadias, M., Alegre, I., Colas-Meda, P., Bobo, G., Lafarga, T., Posada, G. D., Vallesquino, P., Cejudo, M.,

- Ortiz, J., Nicolau, Y. & Pérez-Lavalle, L. (2020). Control de patógenos de transmisión alimentaria en fresas congeladas y listas para el consumo. *Biblioteca Horticultura*, 1-20. Recuperado de: [https://issuu.com/horticultrapos cosecha/docs/control\\_de\\_pat\\_genos\\_de\\_transmisi\\_n\\_alimentaria\\_en](https://issuu.com/horticultrapos cosecha/docs/control_de_pat_genos_de_transmisi_n_alimentaria_en)
- Wang, W., Zhou, Y., Xiao, X., Yang, G., Wang, Q., Wei, W., Liu, Y. & Yang, H. (2018). Behavior of *Salmonella* Typhimurium on Fresh Strawberries Under Different Storage Temperatures and Wash Treatments. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2091. 10.3389/fmicb.2018.02091
- Xu, J. G., Hu, H. X., Chen, J. Y., Xue, Y. S., Kodririkhonov, B. & Han, B. Z. (2022). Comparative study on inhibitory effects of ferulic acid and p-coumaric acid on *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38, 136. 10.1007/s11274-022-03317-1
- Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B. & Li, M. (2021). Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics*, 10(3), 318. 10.3390/antibiotics10030318
- Yen-Con, H. & Waters, B. W. (2017). PH Effect on the Formation of THM and HAA Disinfection Byproducts and Potential Control Strategies for Food Processing. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(12), 2914-2923. 10.1016/S2095-3119(17)61798-2.
- Yuk, H. G., Bartz, J. A. & Schneider, K. R. (2006). The Effectiveness of Sanitizer Treatments in Inactivation of *Salmonella* spp. from Bell Pepper, Cucumber, and Strawberry. *Journal of Food Science*, 71(3), 95-99. 10.1111/j.1365-2621.2006.tb15638.x
- Zhang, Q. W., Lin, L. G. & Ye, W. C. (2021). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(20), 1-26. 10.1186/s13020-018-0177-x

# ANEXO 1. PRUEBA DE ANTIPLAGIO

23/9/23, 7:26

Detector de plagio - Archivo: TESIS MTV FINAL\_prueba antiplagio.docx

