



Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio

SEP TecNM

**DIVISIÓN DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**

OPCIÓN

“Tesis”

Proyecto

**“Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos
etanólicos obtenidos de la parte aérea y hojas de pipicha
(*Porophyllum tagetoides*) deshidratada”**

Que para obtener el título de:

Ingeniero en Industrias Alimentarias

Presenta

Lizbeth Emeli Zorrilla Martínez

160712039

Acatlán de Osorio, Pue., Septiembre de 2021



Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio
Organismo Público Descentralizado del Gobierno del Estado de Puebla

ASUNTO: Aprobación de Trabajo de Titulación.

Acatlán de Osorio, Pue., a 28 de septiembre de 2021.

**I.I.A. ELEODORO GABILÁN LINARES
JEFE DE DIVISIÓN DE LA CARRERA DE
INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
P R E S E N T E.**

Por este medio hago de su conocimiento que el documento bajo el esquema: **OPCIÓN: TESIS PROFESIONAL**, que lleva por nombre **“Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos obtenidos de la parte aérea y hojas de pipicha (*Porophyllum tagetoides*) deshidratada”**, que presenta la candidata a Titulación: **C. LIZBETH EMELI ZORRILLA MARTÍNEZ** con número de control **160712039** de la carrera de Ingeniería en Industrias Alimentarias, fue revisada y aprobada para su impresión por la comisión revisora conformada por: **M.C. VÍCTOR INOCENCIO PACHECO CONTRERAS, DRA. MAYRA HERRERA MARTÍNEZ e I.A. GABRIELA FORTUNATA LARA RUIZ.**

Sin más por el momento, quedo de usted.

A T E N T A M E N T E

“CONOCIMIENTO COMO GUÍA DEL DESARROLLO”

**ING. GABRIELA FORTUNATA LARA RUIZ
PRESIDENTE DE ACADEMIA DE LA CARRERA
DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Vo. Bo.

M.C. VÍCTOR INOCENCIO PACHECO CONTRERAS

Vo. Bo.

DRA. MAYRA HERRERA MARTÍNEZ

Vo. Bo.

I.A. GABRIELA FORTUNATA LARA RUIZ

c. c. p.-Archivo.



CACEI



CARRETERA ACATLÁN-SAN JUAN IXCAQUIXTLA
K.M. 5.5. UNIDAD TECNOLÓGICA
ACATLÁN DE OSORIO, PUEBLA, C.P. 74949
Tels. (953) 53.41877 y 53.41878
e-mail: direccion.general@itsao.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

A la carrera de Ingeniería en Industrias Alimentarias, del **Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio**, parte fundamental de mi formación académica.

A la **Universidad Tecnológica de la Mixteca**, por la estancia permitida para llevar a cabo parte importante de mi trabajo de investigación.

A la **Universidad de la cañada** y al **Grupo de Investigación Multidisciplinario para el Desarrollo de Productos Terapéuticos (GIM-DEPROTÉ)**, por permitirme realizar parte fundamental de mi trabajo en sus instalaciones de investigación y por el apoyo brindado.

A mi asesor de tesis, **Mtro. Víctor I. Pacheco Contreras**, por su paciencia, dedicación y apoyo como docente y asesor.

A la **I.A Gabriela F. Lara Ruiz**, por su apoyo incondicional a lo largo de mi formación académica y personal. Gracias Totales.

A la **Dra. Mayra Herrera Martínez**, por compartir sus conocimientos, experiencia y profesionalismo al llevar a cabo la parte experimental de mi tesis.

Al **Dr. Raúl Salas Coronado**, por su apoyo y orientación en la parte experimental de mi proyecto de investigación

DEDICATORIA

A mis padres, **Enedino Gregorio Zorrilla Martínez y Hortencia Oliva Martínez**, los pilares de mi vida, mi ejemplo a seguir y mi motivación de cada día.

A mis hermanos, **Doricela, Leiber y Noel**, por su apoyo incondicional y ser un ejemplo de trabajo y perseverancia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
SÍMBOLOS Y/O ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
2.3 Hipótesis	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Microbiología en la industria alimentaria	4
3.2 Microorganismos importantes en los alimentos	5
3.2.1 Bacterias	5
3.2.1.2 Bacterias Gram positivas	12
3.2.1.3 Cianobacterias	13
3.3 Epidemiología de infecciones bacterianas	14
3.4 Infecciones gastrointestinales	16
3.5 Tratamiento contra infecciones bacterianas	17
3.6 Resistencia bacteriana	18
3.7 Pipicha (<i>Porophyllum tagetoides</i>)	19
3.7.1 Descripción botánica	22
3.8 Extracción de metabolitos secundarios	24
3.9 Evaluación de la actividad antibacteriana	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 Localización del lugar experimental	28
4.2 Origen del material biológico	28
4.3 Deshidratado de la pipicha	29
4.5 Obtención de extractos etanólicos	31
4.6 Análisis del perfil fitoquímico por cromatografía en capa fina	32

4.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana	34
4.7.1 Preparación de la solución madre.....	34
4.7.2 Preparación del estándar de McFarland.	34
4.7.3 Activación del inóculo	34
4.7.4 Actividad antimicrobiana	36
4.7.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	37
4.7.6 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	38
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1 Obtención de deshidratados en polvo	39
5.2 Obtención de extractos etanólicos	42
5.3 Perfil fitoquímico de extractos etanólicos por cromatografía en capa fina	45
5.4 Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos	49
VI. CONCLUSIÓN	52
VII. PERSPECTIVAS	52
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
VIII. ANEXOS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las proteobacterias.	6
Tabla 2. Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	7
Tabla 3. Clasificación taxonómica de pipicha (<i>Porophyllum tagetoides</i>).	21
Tabla 4. Rendimiento de pipicha deshidratada a 60 °C.	42
Tabla 5. Identificación de las muestras.	43
Tabla 6. Rendimiento de extracto obtenido de hojas y parte aérea de <i>Porophyllum tagetoides</i>	45
Tabla 7. Identificación de metabolitos secundarios observables a luz visible y luz UV.	47
Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria de extractos etanólicos de <i>Porophyllum tagetoides</i> frente a bacterias patógenas.	51
Tabla 9. Diferencia de porcentaje de humedad, respecto al tiempo de deshidratado en cada una de las charolas del deshidratador. Primer lote parte aérea.	60
Tabla 10. Diferencia de porcentaje de humedad, respecto al tiempo de deshidratado en cada una de las charolas del deshidratador. Segundo lote parte aérea.	61
Tabla 11. Diferencia de porcentaje de humedad, respecto al tiempo de deshidratado en cada una de las charolas del deshidratador. Primer lote, hojas.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos generales de las cianobacterias, algas y bacterias.	14
Figura 2. Mecanismos de acción de los antibióticos.	17
Figura 3. Distribución geográfica de pipicha en México	22
Figura 4. <i>Porophyllum tagetoides</i>	23
Figura 5. Selección de muestras de pipicha fresca para el proceso de secado.	29
Figura 6. Secado de pipicha utilizando un secador de charolas giratorias.	30
Figura 7. Obtención de pipicha deshidratada en polvo.	30
Figura 8. Obtención de extractos etanólicos mediante maceración asistida por ultrasonido. ..	31
Figura 9. Estrategia metodológica para la activación del inóculo microbiano McFarland 0.5.	35
Figura 10. Estrategia metodológica para determinar la actividad antimicrobiana en placa de microdilución en caldo.	37
Figura 11. Cinética de secado de muestras de la parte aérea de pipicha.	40
Figura 12. Cinética de secado de muestras de hojas de pipicha.	41
Figura 13. Obtención de extractos mediante extracción asistida por ultrasonido	43
Figura 14. Evaporación del disolvente, para obtener extractos etanólicos.....	44
Figura 15. Extractos etanólicos:	44
Figura 16. Identificación de metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina en luz visible (I) y UV (II): I) A: C: D: Cumarinas, Flavonoides y Clorofila; B: Flavonoides; II): A: C: D: Alcaloides y Cumarinas, B: Alcaloides.	46
Figura 17. Evaluación de actividad antimicrobiana por la técnica de placas de microdilución en caldo.....	50

SÍMBOLOS Y/O ABREVIATURAS

Km	Kilómetros
m/s	Metros sobre segundo
°C	Grados Celsius
g	Gramos
min	Minutos
mm	Milímetros
mL	Mililitros
%	Porcentaje
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
KOH	Hidróxido de potasio
UV	Radiación ultravioleta
nm	Nanómetro
mg	Miligramos
v/v	Volumen a volumen
h	Horas
µL	micro litros
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro]
O₂	Oxígeno
UFC	Unidades formadoras de colonias
PtHf	parte hojas frescas
PtAf	parte aérea fresca
PtAd1	parte aérea deshidratada 1
PtAd2	parte aérea deshidratada 2
PtHd2	parte hojas deshidratada 2

RESUMEN

La pipicha (*Porophyllum tagetoides*), es una planta anual de olor intenso originaria de México, donde es utilizada para condimentar la comida y también para el tratamiento de procesos inflamatorios principalmente. A pesar de su importancia gastronómica y medicinal, existen pocos reportes científicos. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue obtener extractos etanólicos de las hojas y de la parte aérea de la pipicha deshidratada, determinar el perfil fitoquímico de los extractos por medio de cromatografía de capa fina (silica gel 60 como fase estacionaria y hexano: acetato de etilo en una relación 3.5:1.5 v/v como fase móvil) y finalmente se evaluó la actividad antimicrobiana mediante ensayos de microdilución en pozos, contra bacterias patógenas humanas. En la identificación de compuestos, ambos extractos presentaron perfiles cromatográficos similares, observándose como compuestos mayoritarios: clorofilas, antraquinonas y cumarinas. En los ensayos de actividad antimicrobiana, los resultados fueron negativos al evaluar los extractos contra cepas de bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales, las cuales fueron *Salmonella paratyphi* 9150, *Listeria monocytogenes* 15313, *Escherichia coli* 8739, *Staphylococcus aureus* 33862, todas ATCC; y en *Streptococcus mutans* y *Klebsiella pneumoniae*, aislados de casos clínicos. Existen reportes de la actividad antimicrobiana que revelan que estos extractos y la emulsión de hojas y planta completa fresca, son capaces de inhibir el crecimiento de levaduras; *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. Lo anterior nos sugiere que su actividad biológica podría ser específica contra hongos o células eucariotas. Así, se podría indagar más en esta área y ver su potencial micótico o contra células de cáncer.

Palabras clave: Secado, metabolitos secundarios, perfil fitoquímico, inhibición bacteriana

ABSTRACT

Pipicha (*Porophyllum tagetoides*), is an annual plant from Mexico, due to its intense smell it is used to flavor food and also for the treatment of inflammatory processes. Despite its gastronomic and medicinal importance, there are few scientific reports. For this reason, the aim of this study was to obtain ethanolic extract from the leaves and the aerial part of the dehydrated pipicha, to determine the phytochemical profile of the extracts by thin layer chromatography (silica gel 60 as stationary phase and hexane: ethyl acetate in a 3.5: 1.5 v / v ratio as mobile phase) and finally the antimicrobial activity against human pathogenic bacteria (*Salmonella paratyphi* 9150, *Listeria monocytogenes* 15313, *Escherichia coli* 8739, *Staphylococcus aureus* 33862, all ATCC; and *Streptococcus mutans* and *Klebsiella pneumoniae*, isolated from clinical cases) was evaluated by microdilution tests. In the identification of compounds, both extracts had similar chromatographic profiles, where chlorophylls, anthraquinones and coumarins were observed as the main compounds. In the antimicrobial activity tests, the extracts were not active against strains of bacteria that cause gastrointestinal diseases. There are reports of antimicrobial activity that reveal these extracts and the emulsion of leaves and fresh whole plants are capable of inhibiting yeast growth such as *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, it is suggested that Pipicha activity could be specific against fungi or eukaryotic cells. Thus, potential fungal or anticancer could be investigated.

Keywords: Pipicha, secondary metabolites, phytochemical profile, bacterial inhibition.

I. INTRODUCCIÓN

La demanda de productos frescos mínimamente tratados ha cobrado auge en los últimos años, por esto en la actualidad se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando la población microbiana, permitiendo con esto ofertar productos semejantes al producto fresco, pero con menos aditivos. El uso de antimicrobianos (conservadores) es una práctica común en la industria alimentaria, por años, principalmente los sintetizados químicamente, sin embargo, han sido asociados a problemas de salud, desde intoxicaciones hasta ser cancerígenos; por consiguiente, el uso de conservadores naturales es una fuerte tendencia en la actualidad, lo que ha ocasionado extraer compuestos bioactivos de hierbas, plantas y especias para determinar su capacidad antimicrobiana y su aplicabilidad en la industria alimentaria con la finalidad de aumentar la vida de anaquel del producto sin alterar su calidad sensorial y seguridad.

La actividad antimicrobiana de hierbas, plantas y especias es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos (eugenol, citral, pineno, timol, ácido cinámico y carvacrol) presentes en sus extractos o aceites esenciales, y se ha observado que la grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Rodríguez, 2011). Entre las especias más estudiadas se encuentran: ajo (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), laurel (*Laurus nobilis*), orégano (*Origanum vulgare*), vainilla (*Vainilla planifolia*), etc., las cuales han sido reportadas tener actividad contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, hongos y levaduras (Jimenez *et al.*, 2012). La adición mínima de extractos acuosos, metanólicos, etanólicos o clorofórmicos en alimentos, han mostrado la

capacidad de reducir la contaminación microbiana sin afectar las propiedades sensoriales incluso son considerados como aditivos debido a sus compuestos aromáticos y saborizantes.

México es un país con una gran diversidad ecológica, y varios estudios sobre la actividad antimicrobiana han sido realizados en varias especies vegetales, la mayoría en estado fresco. La pipicha (*Porophyllum tagetoides*), es una planta anual de olor intenso originaria de México, utilizada para condimentar la comida y para el tratamiento de procesos inflamatorios principalmente, como medicina tradicional. A pesar de su importancia gastronómica y medicinal, existen pocos reportes científicos. Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue obtener extractos etanólicos de las hojas y de la parte aérea de la pipicha deshidratada y determinar su actividad antimicrobiana mediante ensayos de microdilución en pozos, contra bacterias patógenas humanas.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos obtenidos de la parte aérea y hojas de pipicha (*Porophyllum tagetoides*) deshidratada.

2.2 Objetivos específicos

1. Obtener deshidratados en polvo de parte aérea y hojas de pipicha.
2. Obtener extractos etanólicos de los deshidratados de pipicha mediante maceración asistida por ultrasonido.
3. Analizar el perfil fitoquímico de los extractos etanólicos mediante cromatografía en capa fina.
4. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de pipicha mediante ensayos de microdilución en caldo.

2.3 Hipótesis

Extractos etanólicos obtenidos de parte aérea y hojas de pipicha (*Porophyllum tagetoides*) deshidratada poseen actividad antimicrobiana.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3. 1 Microbiología en la industria alimentaria

Microorganismo se define como, aquellos organismos microscópicos unicelulares (bacterias, hongos, levaduras) y los virus, que son microscópicos, pero sin estructura celular. En la industria alimentaria, los microorganismos tienen funciones relevantes; son utilizados en diferentes etapas del proceso para la producción de alimentos, por ejemplo, muchos productos lácteos dependen de transformaciones microbianas, como las fermentaciones que originan quesos, el yogurt o la mantequilla. De modo similar, la col ácida, los pepinillos y algunas variedades de salchichas deben también sus propiedades a fermentaciones microbianas. Además, los alimentos de panadería y las bebidas alcohólicas se originan por las actividades fermentativas de las levaduras, que forman como ingredientes importantes dióxido de carbono (CO₂) para levantar la masa y alcohol, respectivamente (Madigan *et al.*, 2009). Sin embargo, al ser asociados a enfermedades y al deterioro de alimentos, que se traduce en pérdidas económicas para la industria, ha centrado mayor interés en los investigadores, para buscar métodos que permitan aumentar la vida de anaquel.

La conservación es un recurso primordial para la industria alimentaria, de ahí que se han empleado diferentes métodos físicos y químicos para evitar la contaminación de los alimentos, entre ellos, el salado, ahumado, elaboración de conservas, pasteurización, congelación, deshidratado, etc. El uso de antimicrobianos (conservadores) es una práctica común en la industria alimentaria, sin embargo, los sintetizados químicamente, han sido asociados a problemas de salud, desde intoxicaciones hasta ser cancerígenos. En la actualidad, el consumidor demanda productos inocuos y de calidad, por lo tanto la industria alimentaria,

considera el uso de conservadores naturales como una alternativa para la conservación de los alimentos; esto ha encaminado a una gama de proyectos para extraer compuestos bioactivos de hierbas, plantas y especias; además, determinar su capacidad antimicrobiana y su aplicabilidad en la industria alimentaria con la finalidad de aumentar la vida de anaquel del producto sin alterar su calidad sensorial y seguridad.

3.2 Microorganismos importantes en los alimentos

La comparación de secuencias de los rRNA ha permitido clasificar tres líneas celulares filogenéticas denominadas como dominios; agrupados en eucariotas (*Eukarya*) y procariotas (*Bacteria* y *Archaea*), este último y particularmente el dominio conformado por bacteria, son responsables del deterioro de los alimentos y agentes causales de enfermedades.

3.2.1 Bacterias

Los procariotas forman dos dominios evolutivos, *Arqueas* y *Bacterias*, la mayor parte de los procariotas mejor conocidos y causantes de enfermedades (patógenos) pertenecen al dominio de *Bacterias*; constituido por *proteobacterias*, bacterias Gram positivas y *cianobacterias*. Las enfermedades infecciosas causan la muerte de 9 millones de personas al año, aproximadamente.

Los patógenos bacterianos son responsables de una gran proporción de estas enfermedades y los agentes bacterianos de neumonía, diarrea y tuberculosis son las principales causas de muerte y discapacidad en todo el mundo (Conner *et al.*, 2016).

3.2.1.1 Proteobacterias

La división *Proteobacterias* constituye la división más amplia dentro de las bacterias, antiguamente denominadas bacterias púrpuras; es uno de los grupos más abundantes en la microbiota intestinal humana, son bacterias Gram negativas, con una membrana externa compuesta principalmente de lipopolisacáridos, la mayoría son anaerobias facultativos u obligados (Rumbo-Prieto, 2018; Rizzatti *et al.*, 2017). El análisis filogenético con el gen 16S rRNA, clasifica al grupo de *Proteobacterias* en seis clases agrupados en dos géneros, como se describe en la tabla 1.

Tabla 1.
Clasificación de las proteobacterias.

Género	Clases
<i>Rhodobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>
	<i>Betaproteobacteria</i>
	<i>Gammaproteobacteria</i>
	<i>Zetaproteobacteria</i>
<i>Thiobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>
	<i>Epsilonproteobacteria</i>

Dentro de las *proteobacterias* se encuentran géneros que incluyen microorganismos patógenos para el ser humano, *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, entre otros.

Escherichia coli, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*; es el organismo modelo por excelencia en fisiología, bioquímica y biología molecular microbiana. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del

nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, sin embargo, hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea; lo que ha permitido clasificarlos en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC). La serotipificación de *E. coli* (Tabla 2) va desde la identificación mediante sus factores de virulencia empleando ensayos *in vitro*, ensayos de toxigenicidad en células hasta con pruebas de biología molecular (Rodríguez-Angeles, 2002).

Tabla 2.
Identificación bioquímica de Escherichia coli.

Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H ₂ S (TSI)	1
Hidrolisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Ácido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36 °C	95
Hidrolisis de gelatina a 22 °C	0
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de la sacarosa	50
Fermentación de D-manito	98
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonito	5
Fermentación de inositol	1

Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de la rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95
Fermentación de trealosa	98
Fermentación de celobiosa	2
Fermentación de α -metil-D glucósido	0
Fermentación de eritritol	0
Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de melobiosa	75
Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de glicerol	75
Nitrato a nitrito	100
Tartrato de Jordán	95
Utilización de Acetato	90
Lipasa (aceite de maíz)	0
DNasa a 25 °C	0
ONPG	95

Salmonella, está asociada principalmente con enfermedades diarreicas, una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad sobre todo en lactantes, niños y ancianos. Los microorganismos de éste género, son bacilos, Gram negativos, anaerobios facultativos, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*; son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos a excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum* (Parra *et al.*, 2002). En la actualidad el género *Salmonella* se clasifica en dos especies, *Salmonella bongori* (serotipo de esta especie se representa con el símbolo V) y *Salmonella enterica*, esta última a su vez se divide en 6 subespecies:

Subespecie I= subespecie enterica

Subespecie II= subespecie salamae

Subespecie III=subespecie arizonae

Subespecie IIIb=subespecie diarizonae

Subespecie IV= subespecie houtenae

Subespecie VI=subespecie indica

Es la bacteria patógena que causa la salmonelosis, enfermedad transmitida por alimentos; aunque puede ser causada por cualquiera de los casi 2500 serotipos que existen hasta hoy, los que han sido aislados con mayor frecuencia son *Salmonella enteritidis* y *S. typhimurium* (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000). En México, los serotipos que se aíslan con mayor frecuencia son *S. enteritidis* y *S. typhimurium*; incluso (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000) en un estudio sobre principales serotipos de *salmonella* identificados en servicios de salud en México, reporta que el principal serotipo aislado en muestras humanas fue *S. typhimurium*, en una proporción entre el 13 y 15 % del total de serotipos, en cambio, *S. enteritidis* fue menos del 10%. Algunos serotipos de *Salmonella* están muy adaptados a su huésped, tales como *S. paratyphi*, *S. sendai* y *S. Typhi*, este último, específico en humanos (Parra *et al.*, 2002).

Desde la década de los ochenta, la incidencia de salmonelosis de origen alimentario ha aumentado considerablemente en el mundo industrializado y ha alcanzado proporciones epidémicas en varios países. Este incremento es el resultado de una combinación de factores relacionados con el desarrollo en la industrialización en todas las fases de producción de alimentos, cambios en la práctica del manejo de los alimentos, así como el almacenamiento, distribución y preparación de los mismos. Los aislamientos de *Salmonella* en alimentos preparados se pueden explicar por la manipulación de los alimentos, así como por la contaminación propia de algunos de ellos, como las aves que al ser mal evisceradas contaminan la carne y en otros casos la contaminación cruzada de alimentos crudos con los preparados. Otros alimentos

importantes fueron la carne cruda, los cárnicos o embutidos y los mariscos, los cuales presentan contaminación de origen y si no son debidamente preparados o almacenados dan lugar a una multiplicación de bacterias (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000).

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae*, a su vez forma parte del orden *Vibrionales*. Los microorganismos que constituyen este género, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos; debido a la alta concentración de sal que requieren para su desarrollo, su hábitat natural son fuentes de agua salada y estuarios, adoptando formas libres de vida, como simbioses de animales acuáticos como parásitos de peces, crustáceos y moluscos. La multiplicación del microorganismo aumenta a medida que la temperatura del agua se eleva, lo que explica, en parte, el aumento de casos en los meses templados (Dabanch *et al.*, 2009).

El género *Vibrio* está compuesto por más de 35 especies, de las cuales sólo un tercio es patógeno para el ser humano; entre éstas, las más importantes son *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Dabanch *et al.*, 2009). *Vibrio cholerae* se considera un patógeno ambiental, ya que pasa gran parte de su ciclo de vida fuera del huésped humano, sin embargo, es el agente causante de la enfermedad humana del cólera (Conner *et al.*, 2016). La infección ocurre por la ingestión de agua o alimentos contaminados; después de superar la barrera ácida del estómago, la bacteria coloniza el epitelio del intestino delgado y secreta la toxina colérica al ambiente extracelular y se introduce a la célula, la toxina colérica altera el transporte de iones, ocasionando diarrea de tipo secretor que caracteriza el cuadro clínico del cólera, subsecuentemente la pérdida de agua y electrolitos (Rojas *et al.*, 2013); esta enfermedad afecta principalmente a regiones que carecen de saneamiento adecuado y agua potable limpia (Conner

et al., 2016). Se ha estimado que esta bacteria produce de tres a cinco millones de casos de cólera y más de 100 000 muertes anualmente (Conner *et al.*, 2016). En México, el cólera representó un problema de salud pública; durante el periodo 1991 a 1997 se registró un promedio de 6 556 casos anuales, que a partir del año 2001 se observó una disminución marcada en su incidencia (Rojas *et al.*, 2013).

Los microorganismos del genero *Helicobacter*, son bacterias Gram negativas que no forma esporas, su morfología celular puede ser curva, espiral o fusiforme típicamente de 0.2 a 1.2 μm de diámetro y de 1.5 a 10 μm de largo (Solnick & Vandamme, 2001). Al menos seis especies han sido descritas específicamente al hospedero, *H. pylori* en humanos y monos, *H. felis* en gatos y perros, *H. nemestrinae* a partir de un mono (*Macaca nemestrina*), *H. cinaedi* y *H. fennelliae*, a excepción de las dos últimas relacionados con enteritis, proctitis y proctocolitis en hombres homosexuales, los demás han sido reportados agentes que inducen gastritis y úlceras pépticas en sus respectivos hospederos (Hernández, 1990).

La bacteria *H. pylori* (*Helicobacter pylori*) es un patógeno Gram negativo cuyos mecanismos intrínsecos permiten su supervivencia en un medio ácido, como el gástrico, que participa en la génesis de gastritis y enfermedad ulcerosa péptica. Más del 95% de los sujetos desarrollará gastritis crónica tras infectarse con *H. pylori* sea esta una pangastritis o una gastritis de predominio, en su mayoría asintomática y en ocasiones se asocia a distintas patologías digestivas como el linfoma MALT y extra digestivas como púrpura trombocitopénico idiopático (PTI). La infección por *H. pylori*, produce una reacción inflamatoria persistente en la mucosa gástrica que lleva a cambios moleculares que favorecen el proceso de carcinogénesis, en el año

1994 fue reconocido como carcinógeno tipo I por la Organización Mundial de la Salud (OMS), asociándose su presencia al desarrollo de cáncer gástrico (CG) (Villalón *et al.*, 2020).

3.2.1.2 Bacterias Gram positivas

Una de las clasificaciones de bacterias es la que se define por la Tinción Gram, cuya reacción es diferente según el microorganismo pues las bacterias consideradas Gram positivas se tiñen de color violeta y las bacterias Gram negativas de color rosa. Los fundamentos de diferenciación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas está en la estructura de la pared celular, ya que ésta en las bacterias Gram positivas tiene una gruesa capa de peptidoglucano, dos tipos de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico (ubicado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática) y el ácido teicoico (que se halla en la superficie, anclado solamente en el peptidoglucano), a diferencia de las bacterias Gram negativas, en las que la pared celular es delgada, y está unida, mediante lipoproteínas, a otra membrana plasmática externa, dicha membrana es soluble en solventes orgánicos y la capa de peptidoglucano es muy delgada y no retiene el complejo de cristal violeta, y por lo tanto no es posible su tinción azul violácea (Madigan *et al.*, 2009)

El género *Clostridium* comprende bacilos Gram positivos, formadores de endoesporas, su principal característica es su potencial neurotoxigenico. Sus esporas sobreviven indefinidamente en alimentos congelados, incluso en desecación (García-Sánchez *et al.*, 2016).

Clostridium perfringens, un bacilo esporulado anaerobio, es de las bacterias patógenas ampliamente distribuidas, ya que se encuentra en el suelo y en el intestino del hombre y animales. Fue reconocida como causa importante de enfermedades alimentarias entre los años

40's del siglo pasado. es reconocida como causa importante de enfermedades alimentarias. Exhibe especial susceptibilidad a las bajas temperaturas, incluso cuando esporula (Morris & Fernández-Miyakawa, 2009).

Listeria monocytogenes constituye un patógeno emergente, que se implicó como agente etiológico en las ETA a partir de los años 80's por la ocurrencia de numerosos brotes de origen alimentario. Posee una sorprendente resistencia al medio, siendo capaz de sobrevivir y multiplicarse en condiciones de temperatura y pH que no resultan de ordinario habituales en otros organismos patógenos afines (Ragon *et al.*, 2008).

Campylobacter jejuni; ha sido reportado como agente etiológico en gran número de casos de diarrea aguda. Constituye un género que incluye varias especies que producen enfermedad transmitidas a través de alimentos, las dos subespecies, *Campylobacter jejuni jejuni* y *Campylobacter jejuni doylei*, son las de más interés para la salud pública y la higiene de alimentos (Snelling *et al.*, 2005).

3.2.1.3 Cianobacterias

De acuerdo a la Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación (2015), las Cianobacterias son organismos microscópicos, bacterias Gram-negativas que contienen clorofila, lo que les permite realizar fotosíntesis (Figura 1). Por ello históricamente se las ha identificado como algas verde-azules. Están presentes en aguas dulces, saladas, salobres y zonas de mezcla de estuarios. Muchas especies de cianobacterias producen toxinas, las cuales son contenidas en la célula o exudadas al medio, por lo que pueden aparecer disueltas en el agua,

constituyéndose en un problema de significancia para la salud humana y ambiental. La Organización Mundial de la Salud ha enlistado a las cianobacterias como un problema de salud emergente.

ALGAS	CIANOBACTERIAS	BACTERIAS
Eucariotas	Procariotas	
Fotosintéticas		No fotosintéticas
Unicelular y multicelular		Unicelular
No producen toxinas	Capaces de producir toxinas y exudarlas al medio circundante	Capaces de producir toxinas
Se encuentran sólo en ambientes acuáticos	Se encuentran en muchos hábitats diversos	
Pueden formar colonias visibles en el agua		Pueden causar aumento de turbidez, pero no colonias visibles

Figura 1. Aspectos generales de las cianobacterias, algas y bacterias.

Fuente: (Dirección nacional de determinantes de la salud e investigación, 2015)

3.3 Epidemiología de infecciones bacterianas

Las enfermedades infecciosas se consideran dentro de las diez causas de muerte en los seres humanos en el mundo. Aproximadamente el 10 % de las muertes son causadas por infecciones del sistema respiratorio, enfermedades diarreicas, tuberculosis y el VIH/SIDA (Suárez Larreinaga & Berdasquera Corcho, 2000). Las infecciones causadas por bacterias son un problema de salud mundial que aumentan los costos de atención y favorecen la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos. El incremento de la resistencia microbiana, ha provocado en muchas situaciones sin alternativas. La resistencia a los antimicrobianos reduce

las posibilidades de tratamiento eficaz de enfermedades, prolonga el tiempo de agonía de los enfermos y los obliga a utilizar medicamentos costosos (Valdés, 2017). La prevalencia de enfermedades originadas por bacterias se ha estudiado en países como Estados Unidos y la Unión Europea. En el primer caso se dio a conocer que las enfermedades se encontraban asociadas principalmente con la presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus*, con 12,635 aislamientos (15.6 %), seguido de *Escherichia coli* con 9,351 (11.5 %), *Staphylococcus coagulasa*-negativos con 9,261 casos (11.4 %), *Klebsiella* (*pneumoniae/oxytoca*) con 6,470 (8.0 %), *Pseudomonas aeruginosa* con 6111 (7.5 %), *Enterococcus faecalis* con 5,484 (6.8 %), *Enterococcus faecium* con 3,314 (4.1 %), *Acinetobacter baumannii* con 1,490 (1.8), entre los más frecuentes (Sievert *et al.*, 2013). Por otro lado, en la Unión Europea se encontró que *Escherichia coli*, con 177 casos (15.2%), era el microorganismo más recurrente en las enfermedades infecciosas causadas por bacterias, seguido de *Staphylococcus aureus* con 141 (12.1 %), *Pseudomonas aeruginosa* con 121 (11.2 %), *Staphylococcus coagulasanegativos* tienen una presencia de 97 casos (8.3 %), por su parte *Klebsiella* spp. presenta 94 casos (8.1 %), seguida de *Enterobacter* spp. con 49 (4.2 %) y *Acinetobacter* spp. con 49 (4.2 %) (Zarb *et al.*, 2012).

En México, la Secretaría de Salud (SSA) ha realizado estudios similares encontrando que, de 914 infecciones estudiadas, *Enterobacter* spp. (38 %) era el microorganismo más recurrente, seguido por *Staphylococcus aureus* (13 %), *Pseudomonas* spp. (13 %), *Staphylococcus coagulasa*-negativos (8 %), *Acinetobacter* spp. (7 %), *Enterococcus* spp. (6 %) y *Candida* spp. (5 %), lo que demostró una biota muy diferente a lo reportado a nivel internacional, motivo por el cual nació la necesidad de identificar los principales

microorganismos causantes de infecciones (SSA, 2011). Para el año 2016, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), realizó otro estudio epidemiológico con un total de 48,377 casos, en el cual reporta a *Escherichia coli* como el microorganismo más frecuentemente aislado con 8,192 casos (16.9 %), seguido del grupo de *Staphylococcus coagulasa*-negativos con 6,771 (14 %) y como última bacteria *Pseudomonas aeruginosa* con 5,275 casos equivalentes al 10.9 %.

3.4 Infecciones gastrointestinales

Las infecciones gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud pública en México. De acuerdo con el Anuario de Morbilidad del gobierno mexicano hasta el año del 2018, el índice de morbilidad de estas infecciones representaba el 12 % (5, 375, 702 casos) ocupando el segundo puesto de las principales enfermedades a nivel nacional (Alparó, 2013). En nuestro país, el 43.29 % de la población vive en condiciones de pobreza y 13.94 % no cuenta con los recursos económicos para alimentarse adecuadamente. Según el Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo, (2019), los estados con mayor índice de pobreza alimentaria son: Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Puebla, y Tabasco. Entre los Estados con mayor rezago social, en el que se considera la carencia: en educación, de accesos a servicios de salud, de servicios básicos, de calidad y espacio en la vivienda, y activos en el hogar, se encuentra el Estado de Puebla. El Consejo Nacional de Población, (2020), indica que Guerrero, Oaxaca y Puebla son entidades federativas con un grado de marginación muy alto, 10.6 % de la población nacional, es decir, 10.9 millones de personas. Las cifras son muy claras y nos permiten reconocer las causas de por qué en ciertas partes de la república mexicana las enfermedades gastrointestinales siguen un comportamiento endémico, y por qué no se ha podido abatir esta problemática (Hernández *et al.*, 2011).

3.5 Tratamiento contra infecciones bacterianas

Los antibióticos son el tratamiento recomendado para combatir las enfermedades de naturaleza bacteriana, y desde su aparición han permitido disminuir significativamente la tasa de mortalidad asociada a estas patologías. Tenover, (2006) indica que los antibióticos presentan diversos mecanismos de acción (Figura 2).

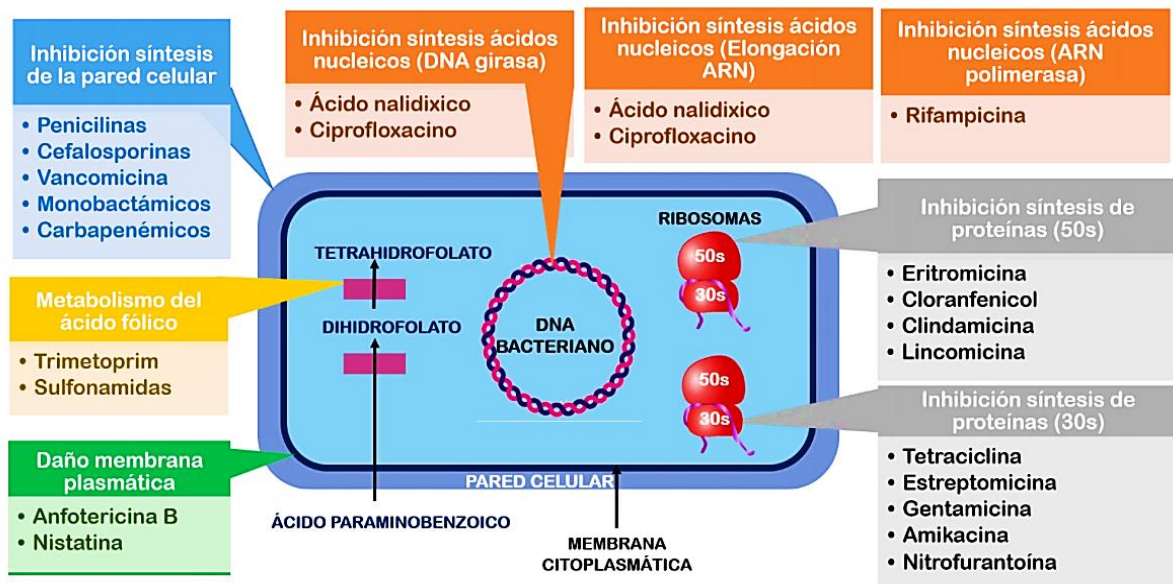


Figura 2. Mecanismos de acción de los antibióticos.

Fuente: Tenover, 2006.

De acuerdo a Calvo & Martínez-Martínez, (2009), los antimicrobianos se pueden clasificar en bactericidas, aquellos que tienen una acción letal para las bacterias y bacteriostáticos, aquellos que sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano. La actividad antimicrobiana, se puede cuantificar *in vitro* mediante la obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que es la concentración mínima de antibiótico que, en un período de tiempo determinado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de una concentración de 10⁵ UFC/ml. También, mediante la Concentración Mínima Bactericida

(CMB), que es la concentración mínima de un antibiótico que, en un período de tiempo determinado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9 % de una población bacteriana.

3.6 Resistencia bacteriana

El uso indiscriminado de los antibióticos durante las últimas décadas ha originado una presión selectiva sobre las bacterias, que ha desencadenado, de manera alarmante la aparición de cepas resistentes a numerosos fármacos. Esto ha ocasionado que algunos tratamientos terapéuticos resulten ahora ineficaces contra algunas enfermedades infecciosas. Es importante resaltar que los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias pueden dividirse en dos modos: de naturaleza intrínseca, aquella que poseen todas las bacterias de la misma especie o grupo bacteriano; o de manera adquirida, cuando sólo lo poseen ciertas bacterias de la especie (Torres, 2012; Valdés, 2017). Las bacterias poseen la capacidad de generar resistencia a los antibióticos mediante varios mecanismos, entre los más conocidos están: la variabilidad genética, disminución de la permeabilidad de la membrana interna a los antibióticos, la expulsión del antibiótico, la hidrólisis enzimática del antibiótico, inactivación enzimática del antibiótico, además de la modificación del blanco ribosomal o la alteración de la composición y el contenido de glicoproteínas de la pared bacteriana (Torres, 2012; Valdés, 2017).

La resistencia adquirida a los antibióticos es una característica de muchas bacterias patógenas para el ser humano, de modo que se ha convertido en un problema de salud mundial, ya que el número de cepas resistentes se ha incrementado en los últimos años en relación con el número de antibióticos aprobados por la FDA, ante este escenario se ha generado interés en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana a partir de diversas fuentes

naturales (Abdallah, 2011). En años recientes, se ha incrementado el número de publicaciones que evidencian la presencia de actividad antimicrobiana de compuestos derivados del reino vegetal, muchos de los cuales son flavonoides, taninos, alcaloides y otros compuestos de origen fenólico (Pandey, 2007).

3.7 Pipicha (*Porophyllum tagetoides*)

El uso de antimicrobianos, por años es una práctica común en salud y en la industria alimentaria, principalmente los sintetizados químicamente, sin embargo, particularmente en éste último, han sido asociados a problemas de salud, desde intoxicaciones hasta ser cancerígenos; por consiguiente, el uso de conservadores naturales es una fuerte tendencia en la actualidad, lo que ha ocasionado extraer metabolitos secundarios de hierbas, plantas y especias para determinar su capacidad antimicrobiana y su aplicabilidad en la industria alimentaria con la finalidad de aumentar la vida de anaquel del producto sin alterar su calidad sensorial y seguridad.

Los metabolitos secundarios no son esenciales para el desarrollo normal de la planta, pero sí para su supervivencia ante situaciones de estrés. Existe una gran diversidad química de metabolitos secundarios y pueden ser agrupados en: compuestos fenólicos (fenoles, flavonoides, cumarinas, taninos); terpenos, compuestos nitrogenados (alcaloides y glucósidos cianogénicos) y compuestos azufrados (glucosinolatos). Los metabolitos con actividad antimicrobiana se clasifican como fitoanticipinas, cuando forman parte de la barrera química constitutiva de las plantas para prevenir infecciones, o como fitoalexinas, cuando su biosíntesis se induce después del ataque de microorganismos (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Hoy en día se sabe que, hierbas y especias empleadas en la preparación de alimentos, como agentes saborizantes, contienen en sus aceites esenciales terpenoides y compuestos fenólicos (eugenol, citral, pineno, timol, ácido cinámico y carvacrol) que presentan actividad antimicrobiana. A pesar de que ya se han estudiado los efectos antioxidantes y antimicrobianos de varias especies, entre ellas, las del ajo (*Allium sativum*) canela (*Cinnamomum zeylanicum*), laurel (*Laurus nobilis*), orégano (*Origanum vulgare*), vainilla (*Vainilla planifolila*), etc., cuya actividad reportada han sido contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, hongos y levaduras; existen pocos reportes científicos sobre la pipicha, aun cuando, se sabe que la pipicha posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Jimenez *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Jimenez *et al.*, (2012) indican que extractos de pipicha son capaces de inhibir crecimiento de bacterias y levaduras; además recomiendan el consumo de pipicha en la dieta diaria para mejorar la salud y sugieren el uso de extractos y emulsión, como antimicrobianos y/o antioxidantes naturales.

La pipicha (*Porophyllum tagetoides*) es una planta originaria de México, conocida como pipicha, pipicha o chepicha, *Porophyllum tagetoides*, dependiendo de la zona de producción. Su nombre en náhuatl "pipitza" significa soplar repentinamente. *Porophyllum* deriva del griego *porus* que significa poro y *phyllon* que quiere decir hoja, debido a la presencia de glándulas en las hojas en la mayor parte de las especies que conforman este género, por las cuales desprende el aceite que le da el olor y sabor característico de estas hierbas. El género *Porophyllum* pertenece a la familia *Asteraceae* que está constituida por 1000 géneros y aproximadamente 20000 especies de distribución cosmopolita (Tabla 3), siendo sus características generales las de plantas herbáceas o arbustivas, rara vez arbóreas o trepadoras (Castro *et al.*, 2011; Cobos *et*

al., 2019; Jimenez *et al.*, 2012). La tabla 3, describe la clasificación botánica de *Porophyllum tagetoides* conocido también como *Porophyllum linaria*.

Tabla 3.
Clasificación taxonómica de pipicha (*Porophyllum tagetoides*).

reino	Plantae
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnolophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Genero	<i>Porophyllum</i>
Especie	<i>Tagetoides</i>
Nombre binomial	<i>Porophyllum tagetoides</i>

Fuente: (Guzmán, 2009)

La pipicha, por su sabor como aroma intenso; se utiliza principalmente para condimentar comida típica mexicana como caldos, sopas, guisados, quesadillas, ensaladas, salsa de 'aguacate, carne de puerco, pescado y memelitas además se consume en fresco, sus partes comestibles son sus hojas. Es muy parecida al papaloquelite, ambos pertenecen al mismo género (Castro *et al.*, 2011; Cobos *et al.*, 2019; Guzmán, 2009; Jimenez *et al.*, 2012).

La pipicha se distribuye en los Estados de Durango, México, Hidalgo, Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Puebla (Figura 3), siendo el Estado de Puebla, el único que siembra para su comercialización, con una producción promedio de 96 toneladas por año, generando un valor de producción de \$228 600.00 (Guzmán, 2009).

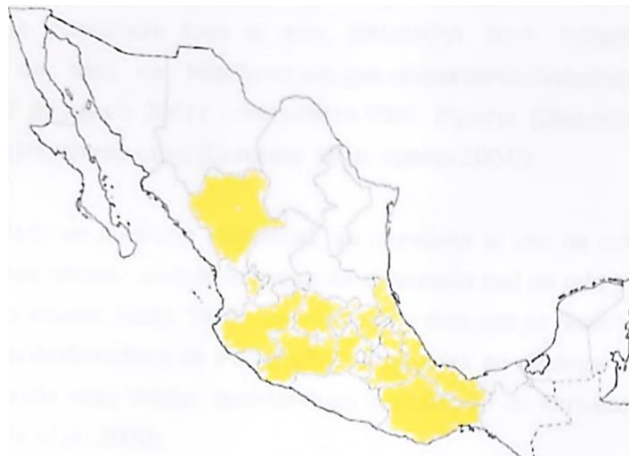


Figura 3. Distribución geográfica de pipicha en México.

Fuente: Guzmán, 2009.

3.7.1 Descripción botánica

Porophyllum tagetoides (Figura 4) es una hierba anual, aromática, que tiene las siguientes características morfológicas: tallos de 25 a 50 cm de alto, con ramificación desde la base ascendente, sus hojas son opuestas en la sección inferior de la planta, las superiores son alternas lineares, de 1.5 a 4 cm de largo y de 1 a 3 mm de ancho, el ápice largamente acuminado, algo succulentas, ligeramente aplanadas, las glándulas olorosas son diminutas, dispuestas en 2 hileras. Las cabezuelas son solitarias, raramente agrupadas en cimas terminales, los pedúnculos son de 2 a 5 cm de largo, sus involucros son campanulados, las brácteas oblongas, de 8 a 10 mm de largo y de 2 a 4 mm de ancho, de color púrpura, las glándulas son diminutas y lineares.

Las corolas van desde 5 a 6 mm de largo, rojo-purpúreas, los aquenios son fusiformes, de 5 a 6 mm de largo, casi glabros, negros y el vilano de cerdas barbadadas, de 4 a 6 mm de largo, amarillas a purpúreas (Castro *et al.*, 2011; Cobos *et al.*, 2019; Guzmán, 2009; Jimenez *et al.*, 2012).

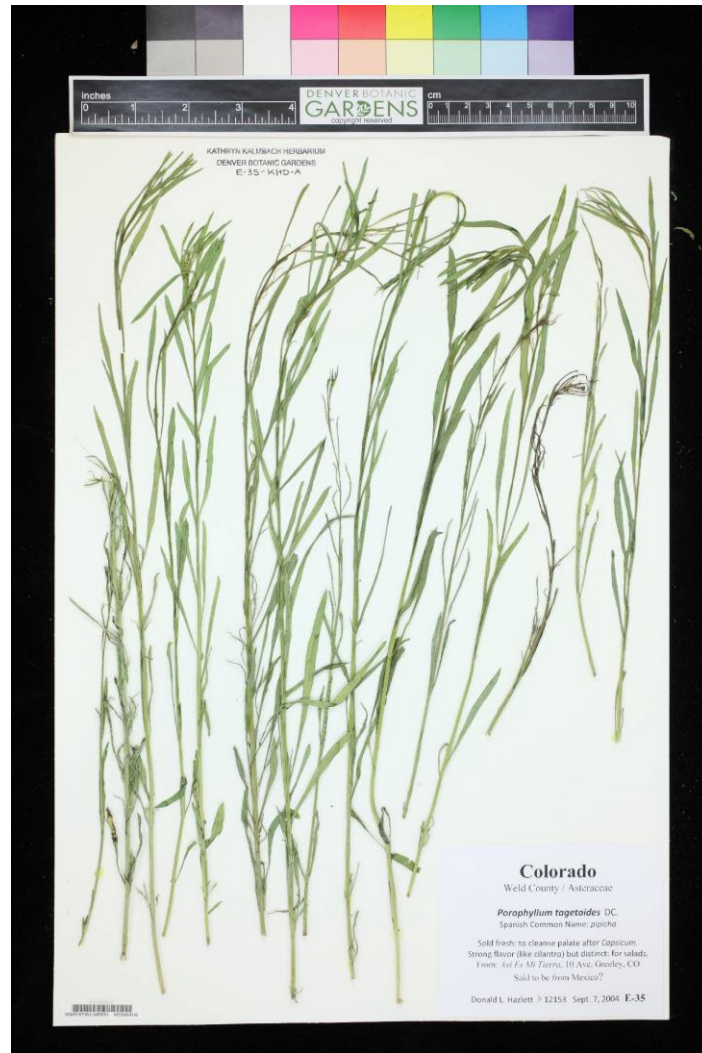


Figura 4. Porophyllum tagetoides.

Fuente: <https://herbanwmex.net/portal/collections/individual/index.php?occid=4174052>

3.8 Extracción de metabolitos secundarios

En la búsqueda de compuestos de plantas con actividad antimicrobiana, se utilizan extractos de alguna parte de la planta (hojas, corteza, raíz, fruto, flores etc.) o de la planta completa, este material vegetal debe secarse y se debe de reducir el tamaño de partícula (Muro *et al.*, 2018). El secado extrae la humedad (exceso de agua) que contiene la planta, mediante calor natural o artificial para evitar que se pudra o pierda las sustancias activas, además permite almacenar por un tiempo prolongado antes de su utilización, mientras que la disminución del tamaño de las partículas aumenta el contacto superficial entre las muestras y los solventes de extracción.

La extracción consiste en la separación de metabolitos secundarios de plantas medicinales, generalmente utilizando diversos disolventes. El propósito de toda extracción es separar los metabolitos secundarios con actividad biológica de la planta. El método habitual de extracción involucra la infusión/decocción con agua fría o caliente, sin embargo, no todos los metabolitos secundarios son solubles en agua y al realizar una extracción en agua se corre el riesgo de perder compuestos con actividades antimicrobianas, razón por la cual se desarrollaron métodos basados en la polaridad (relativo a solubilidad) de los metabolitos de interés, así se obtienen los metabolitos secundarios que no son solubles en agua con disolventes orgánicos como el hexano, cloroformo, acetona, alcoholes, etc., (Muro *et al.*, 2018).

De las técnicas utilizadas para recuperar extractos se pueden mencionar métodos tradicionales como la maceración y la extracción de Soxhlet, sin embargo hoy en día se han logrado avances significativos en la obtención de extractos a partir de plantas medicinales,

utilizando métodos modernos de extracción entre los que destacan; Extracción Asistida por Microondas (EAM), Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) y Extracción de Fluido Supercrítico (EFS), avances que apuntan a aumentar el rendimiento, en algunos casos a un bajo costo (Arzola & Vargas, 2007).

La maceración simple, consiste en remojar material vegetal con el disolvente elegido, en un recipiente tapado, el cual se deja reposar a temperatura ambiente durante un período mínimo de 3 días, muchas veces con agitación frecuente. Este método tiene como objetivo suavizar y romper la pared celular de la planta para liberar los metabolitos secundarios solubles en el solvente. Es uno de los métodos más fáciles y simples, no obstante, los desechos orgánicos generados se convierten en un problema ya que se utiliza un gran volumen de solventes, además de requerir un mayor tiempo para la extracción (Swami *et al.*, 2008).

Por otro lado, la EAU involucra parte del proceso de la maceración simple, donde, además, se utilizan ultrasonidos con frecuencias desde 20 kHz a 2000 kHz. El efecto mecánico de la cavitación acústica del ultrasonido aumenta el contacto entre el disolvente y la muestra vegetal, además de incrementar la permeabilidad de las paredes celulares, facilitando la liberación de compuestos y mejorando el transporte de los solventes hacia el interior de las células vegetales (Dhanani *et al.*, 2017). Estudios recientes han demostrado que la extracción de productos naturales por EAU es una alternativa ecológica y económicamente viable a las técnicas convencionales; los principales beneficios son la disminución del tiempo de extracción, procesamiento, cantidad de energía, disolventes utilizados, las operaciones unitarias y las emisiones de CO₂, además de aumento en el rendimiento obtenido (Chemat *et al.*, 2017).

3.9 Evaluación de la actividad antibacteriana

Para determinar si un compuesto tiene actividad contra bacterias, se utilizan diferentes métodos (Balouiri *et al.*, 2016). Los antibiogramas son métodos *in vitro* que evalúan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo determinadas condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas. Uno de los métodos más utilizados para antibiogramas es el de Kirby Bauer, el cual consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Müller-Hinton (MH) previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado con antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 h de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano, la lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS, por sus siglas en inglés). Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI (Balouiri *et al.*, 2016; Bernal R. & Guzmán, 1984; Rojas *et al.*, 2005).

Otro método que se usa para antibiogramas, es el método modificado de pozos en agar. Se basa en un frotis del inóculo sobre cada una de las superficies de los agares estipulados para éste método. Posteriormente, se hacen los pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro, se vierten 25 μ L de cada uno de los extractos, estándares y blancos por triplicado. Se deja reposar por 30 min. Posteriormente, se incuban y se leen las placas de igual forma que el método Kirby-Bauer (Rojas *et al.*, 2005) La desventaja de

los métodos de difusión mencionados es que no se puede determinar la CMI, debido a que no hay forma de determinar la cantidad de agente antimicrobiano difundido en el agar, además de que no son capaces de distinguir entre actividad bactericida y bacteriostática dado que la inhibición del crecimiento bacteriano no significa la muerte bacteriana (Balouiri *et al.*, 2016).

Por último, otra técnica es la de microdilución en caldo, que consiste en exponer a las cepas bacterianas de estudio a diferentes concentraciones de antimicrobianos y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CMI expresada en $\mu\text{g/mL}$. La CMI corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). Las ventajas de este método son la reducción de costos y reactivos, además de permitir determinar la CMI y la CMB de manera individual (Ibíd.) (Ramirez & Marin Castaño, 2009).

Con frecuencia se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar la viabilidad y proliferación de las células presentes después de un tratamiento (Escobar *et al.*, 2010). Para medir la viabilidad celular, el método más empleado es la reducción metabólica del [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] (MTT) a sal de formazán por deshidrogenasas celulares. Este colorante inicialmente es de color amarillo pálido, es soluble en agua y al ser reducido a formazán, presenta cristales con coloración azul-violeta, insoluble en agua; así, en el ensayo con MTT, si no existe un cambio de coloración de amarillo a azul, permite confirmar la inhibición de crecimiento bacteriano. Aunque este método es uno de los más utilizados para medir viabilidad celular, la principal desventaja que puede presentar es que el producto que se evalúa al contacto con el MTT puede precipitar en el medio de cultivo y los resultados deberán ser descartados (Ramirez & Marin Castaño, 2009).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del lugar experimental

El presente proyecto se realizó en colaboración académica con la Universidad Tecnológica de la Mixteca, el Grupo de Investigación Multidisciplinario para el Desarrollo de Productos Terapéuticos (GIM-DEPROTÉ) de la Universidad de la Cañada y el Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio a través de la División de Carrera de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

El proceso de deshidratado en polvo de las hojas y parte aérea de la pipicha se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales y Alimentos (Laboratorio de Principios Bioactivos) del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca ubicada en Carretera a Acatlima Km. 2.5 Huajuapán de León, Oaxaca, México; mientras que, la obtención de extractos etanólicos de los deshidratados, el análisis del perfil fitoquímico y la evaluación antimicrobiana de los extractos se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de la Cañada ubicada en carretera Teotitlán - San Antonio Nanahuatipán Km 1.7 s/n., Paraje Titlacuatitla. Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México, C.P. 68540, 68540 Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca.

4.2 Origen del material biológico

Para los trabajos experimentales del presente proyecto, se utilizó pipicha producida en el mes de marzo bajo sistema intensivo, en la comunidad de Amatitlán de Azueta, municipio de Acatlán de Osorio, Puebla. Las muestras de pipicha en estado fresco y maduro, fueron almacenados en bolsas de polietileno y conservados en refrigeración hasta su procesamiento,

previamente etiquetados con lugar y fecha. La figura 5, representa el proceso de selección que se realizó después de que fue lavado y desinfectado, para ser deshidratado.



Figura 5. Selección de muestras de pipicha fresca para el proceso de secado.

4.3 Deshidratado de la pipicha

Para el proceso de secado de la parte aérea y hojas de la pipicha, se retiró la materia extraña del material biológico (otras plantas, basura), así como la raíz, y en el caso de la muestra de hojas, se retiró el tallo; posteriormente se pesaron 500 g de pipicha y se distribuyeron en cuatro charolas giratorias dentro de un secador acondicionado a una temperatura de 60 °C y una velocidad de aire de 1.2 m/s. (Figura 6), se monitoreó la pérdida de humedad de la muestra

colocada en cada charola en periodos de 15 y/o 30 min, hasta alcanzar un porcentaje de humedad entre 10 a 15 %.



Figura 6. Secado de pipicha utilizando un secador de charolas giratorias.

4.4 Obtención de polvo de pipicha

Las muestras deshidratadas de ambas partes (hojas y parte aérea) fueron reducidas a polvo por separado en un molino ciclónico, utilizando un tamiz de 0.5 mm (Figura 7). Posteriormente las muestras fueron pesadas, rotuladas y almacenadas en refrigeración hasta su posterior uso.



Figura 7. Obtención de pipicha deshidratada en polvo.

4.5 Obtención de extractos etanólicos

La obtención de extractos etanólicos a partir de pipicha deshidratada, se realizó utilizando la técnica de maceración asistida por ultrasonido, para esto se pesaron 50 g de cada una de las muestras de polvo de la parte aérea y de las hojas de la pipicha, y se colocaron en frascos de vidrio de 200 ml con tapa, a cada muestra se le agregó 150 ml de etanol absoluto grado reactivo (MEYER, 0390-18P).

Los frascos se sumergieron en un sonicador (modelo BRANSON, 5510R-MT) en un total de 12 ciclos, cada ciclo consistió de 4 sub-ciclos de 15 min a 25 kHz y a 25 °C, al término de la extracción; el sobrenadante se separó por decantación y filtración simple, recuperando el extracto en cristalizadores de tamaño 150 x 75 (PIREX®). El extracto obtenido fue concentrado hasta obtener una pasta semisólida, eliminando el disolvente con agitación constante a 45°C en campana de flujo laminar (Figura 8). Al término de la evaporación se pesaron las muestras de extracto recuperado y se almacenaron en frascos perfectamente sellados y rotulados.



Figura 8. Obtención de extractos etanólicos mediante maceración asistida por ultrasonido.

4.6 Análisis del perfil fitoquímico por cromatografía en capa fina

Para determinar el perfil fitoquímico de los extractos, se prepararon 4 reactivos reveladores para evidenciar la presencia de compuestos en las muestras de extractos, los cuales fueron:

1.- Reactivo de anhídrido acético-ácido sulfúrico. Detección de terpenos, esteroides (saponinas, principios amargos). Para la preparación del reactivo se utilizaron 5 ml de ácido acético anhídrido concentrado y 5 ml de ácido sulfúrico mismos que se añadieron cuidadosamente en 50 ml de etanol absoluto previamente sumergido en hielo, posteriormente se etiquetó y se almacenó en un frasco de vidrio perfectamente cerrado, hasta su posterior uso.

2.- Dragendorff reagents (DRG). Detección de alcaloides, compuestos heterocíclicos de nitrógeno, aminas cuaternarias. Su preparación consistió en disolver 0.85 g de nitrato de bismuto básico en 40 ml de agua y 10 ml de ácido acético glacial, seguido de la adición de 8 g de yoduro de potasio disuelto en 20 ml de agua, se mezcló, etiquetó y se almacenó.

3.- Ácido sulfúrico. 50% etanólico (H_2SO_4). Detección de glucósidos cardiotónicos. Se preparó utilizando 5 ml de ácido sulfúrico etanólico y 5 ml de agua para el 50% restante de la solución. La solución fue etiquetado y almacenado hasta su aplicación.

4.- Hidróxido de potasio (KOH). Detección 0 / antraquinonas (rojo), anthrones (amarillo, UV-365 nm); cumarinas (azul, UV-365 nm). Para la preparación del reactivo, se mezclaron cuidadosamente 9.5 ml de etanol absoluto y 0.5 ml de hidróxido de potasio, el reactivo fue etiquetado y almacenado hasta su aplicación.

De los extractos de pipicha, parte hojas fresca (ptHf), parte aérea fresca (ptAf), parte aérea deshidratada 1 (ptAd1), parte aérea deshidratada 2 (ptAd2), parte hojas deshidratada 2 (ptHd2), se colocaron en tubos Eppendorf 50.2 mg, 45.5 mg, 33.9 mg, 42.5 mg y 47 mg, respectivamente, y a cada uno se agregó etanol en una relación 100 mL/mg, respecto al peso de la muestra. Se aplicó agitación en el vortex por un periodo de 5 min a cada muestra hasta homogeneizar cada una de ellas.

Una vez homogeneizada la muestra, se preparó un tubo capilar de manera paralela, se preparó una placa de silica gel 60 y se dibujó una línea base a 0.5 mm del borde inferior y se rotula con el nombre de la muestra que se va a colocar. Con el tubo capilar, y usando la línea de base, se aplicó una gota de cada muestra en la placa de silica gel, procurando que se extienda lo menos posible, y se deja secar. La muestra se introduce en un frasco con hexano: acetato de etilo en una relación 3.5:1.5 v/v como fase móvil. Se esperó a que el reactivo ascienda por capilaridad hasta unos milímetros antes del borde superior. Este arrastra la muestra a su paso, separando los componentes presentes en cada una de las muestras. Las distintas moléculas tienen distintas masas, por lo tanto, se mueven a velocidades diferentes y alcanzan alturas diferentes sobre la placa de celulosa, creando un patrón de bandeo. Las placas se dejan secar y finalmente, con un hisopo se extiende sobre la placa cada uno de los reactivos reveladores y se observan en un cuarto oscuro bajo luz UV. Este procedimiento se repite para cada reactivo revelador, en 4 diferentes fases móviles.

4.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana

4.7.1 Preparación de la solución madre

Para cada extracto, se pesó 0.1 g de cada extracto en tubos Eppendorf previamente etiquetados, a cada tubo se adicionó 500 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO) marca (Sigma-Aldrich, W387509) y se agitó hasta disolver por completo y así tener la solución madre de cada extracto con una concentración inicial de 200,000 $\mu\text{g/mL}$. De cada solución madre, se tomó 4 μL que se colocaron en tubos Eppendorf al que posteriormente se adicionaron 356 μL de caldo Mueller-Hinton (MH) estéril, para tener una dilución a una concentración de 2,222.22 $\mu\text{g/mL}$. Esta dilución se utilizó como solución madre estándar en los ensayos de microdilución en placas de 96 pozos.

4.7.2 Preparación del estándar de McFarland.

Se preparó un estándar de turbidez de 0.5 unidades en la escala de McFarland, mezclando 0.5 mL de BaCl_2 0.048 M y 99.5 mL de H_2SO_4 0.18 M, para ajustar la concentración del inóculo entre 1 a 2×10^8 UFC/mL. La densidad correcta del estándar de turbidez fue determinada mediante la lectura de la absorbancia de la solución a 625 nm, empleando un espectrofotómetro marca VELAB (VE-5600UV) con una celda de cuarzo; la lectura obtenida fue entre 0.08 a 0.13.

4.7.3 Activación del inóculo

La activación del inóculo se realizó con cepas de bacterias TCC, *Salmonella typhi* 9150, *Escherichia coli* 8739, *Staphylococcus aureus* 33862 y *Listeria monocytogenes* 15313, así como *Streptococcus mutans* y *Klebsiella pneumonia*, aisladas de casos clínicos.

El inóculo se activó utilizando medio líquido caldo Müller-Hinton (MH) (SIGMA ALDRICH, 70192), preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Figura 9). En tubos con 5 mL de caldo estéril se agregó un inóculo de una colonia de cultivo microbiano puro. Posteriormente, el caldo inoculado se incubó a 37 °C para el crecimiento de las bacterias. Se esperó el tiempo necesario para lograr que la turbidez de la suspensión microbiana se igualara con el estándar 0.5 de McFarland, aproximadamente 4 h, la turbidez fue comparada colocando los tubos en contra luz, si la turbidez era mayor que el estándar, se redujo adicionando caldo estéril. Para asegurar la concentración de microorganismos requeridos, se complementó el estudio con lecturas a 625 nm, empleando un espectrofotómetro (VELAB, VE5600UV) con celdas de plástico; la lectura obtenida fue entre 0.08 a 0.13. Posteriormente, para tener una concentración de 5×10^6 UFC/mL, el inóculo se llevó a una dilución 1:20.

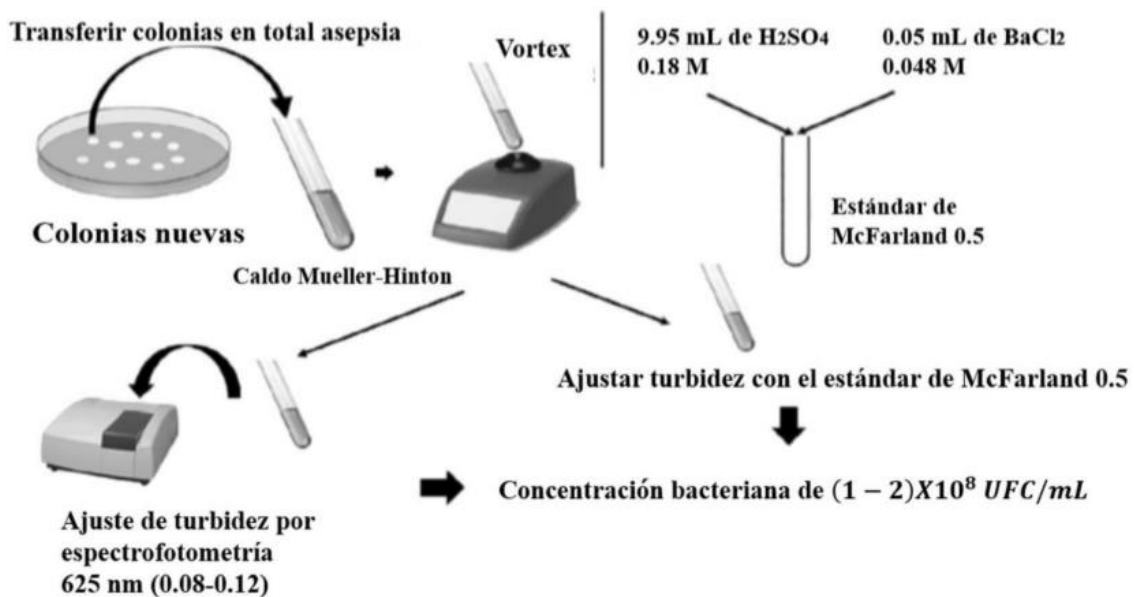


Figura 9. Estrategia metodológica para la activación del inóculo microbiano McFarland 0.5.

Fuente: Baulori *et al.*, 2016.

4.7.4 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó utilizando placas de microdilución en caldo (Figura 10). A partir de la fila B hasta la fila H de la placa, se añadieron a todos los pozos 135 μL de caldo MH estéril; mientras que en la fila A se colocaron 270 μL de la dilución de la solución madre de cada extracto previamente preparado, y a partir de estos pozos, se realizaron diluciones seriadas, teniendo las concentraciones finales de la siguiente manera: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, a cada pozo con 135 μL de muestra diluida se le agregaron 15 μL del inóculo (5×10^6 UFC/mL), quedando un volumen final de 150 μL en cada pozo (Figura 10). La placa fue ingresada a una incubadora (Thermo Scientific HERATHERMTM, 51028132) y se incubó a 37 °C durante 20 h. Como controles se utilizaron: DMSO o vehículo como control negativo, en el mismo volumen que se añadieron los extractos; y cloranfenicol (SIGMA-ALDRICH, C1919) como control positivo en diluciones seriadas con la concentración más alta de 1.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

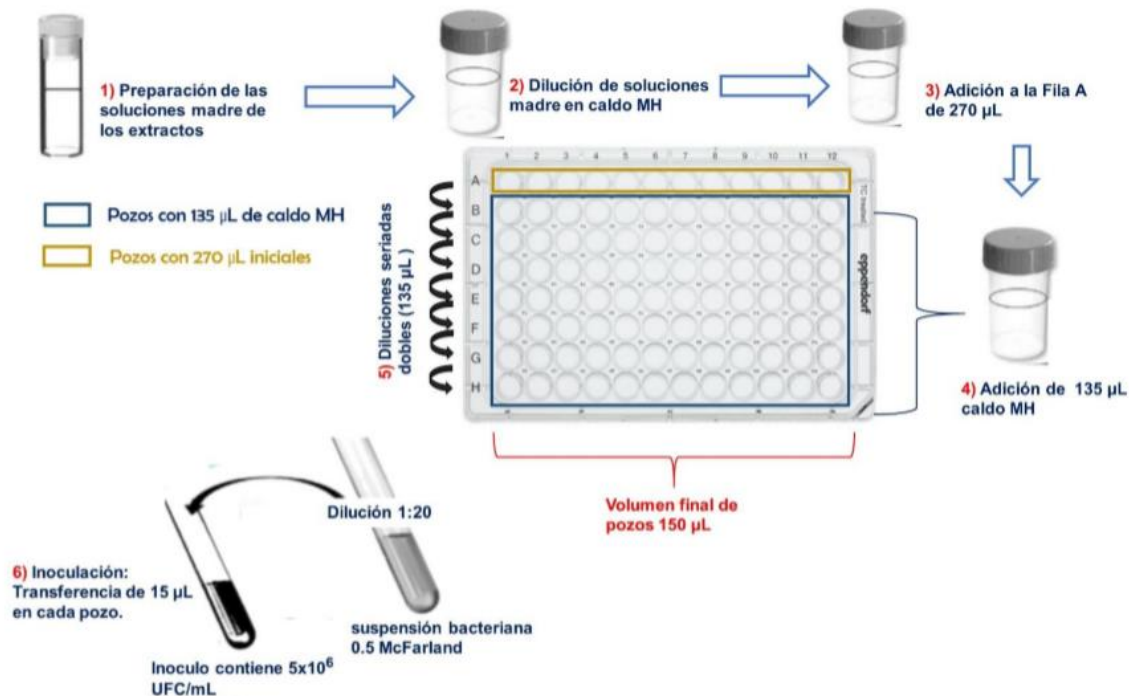


Figura 10. Estrategia metodológica para determinar la actividad antimicrobiana en placa de microdilución en caldo.

Fuente: Balouiri *et al.*, 2016

4.7.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Pasado el tiempo de incubación, los pozos fueron observados con la finalidad de evaluar el crecimiento visible de los microorganismos (turbidez en los pozos). La concentración mínima a la cual se observó esto, se denominó Concentración Mínima Inhibitoria. Para confirmar la inhibición del crecimiento bacteriano, se valoró la viabilidad de las bacterias por el ensayo con la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT); el cual consistió en añadir 50 µL (0.5 mg/mL) del reactivo en cada pozo, seguido de incubación durante 60 min a 37 °C, y finalmente los resultados fueron leídos de acuerdo a cambio de coloración de cada tratamiento (Naranjo *et al.*, 2007). Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

4.7.6 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La Concentración Mínima Bactericida fue determinada por inoculación de 10 μ L de muestra de los pozos que no mostraron crecimiento visible y se colocaron en placas de agar Mueller-Hinton (SIGMA-ALDRICH, 70191), para una posterior dispersión en placa, con asas triangulares bacteriológicas. Se incubaron por 48 h a 37°C. La CMB es definida como la concentración más baja a la que los extractos eliminan al menos al 99.9% del inóculo inicial. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de deshidratados en polvo

El secado se realizó a 60 °C sin tratamiento previo de alguna solución de antioxidante como la que reporta Gómez, (2019), quien aplicó ácido ascórbico al 0.10 % antes de someter la muestra a secado, al igual que Gómez, (2019) para el deshidratado se utilizó un secador de charolas giratorias a una velocidad de aire de 1.2 m/s, evaluando en el presente estudio, el factor posición de las charolas. El secado de hojas y parte aérea de la pipicha se realizó de manera separada, previamente lavada y desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, para cada muestra, el secado se realizó en dos lotes de 500 g distribuidos en las cuatro charolas.

El porcentaje de humedad se determinó mediante la siguiente ecuación, considerando la diferencia de masa, para obtener la pérdida de humedad en cada charola. Valores resultantes fueron utilizados para determinar la curva de secado.

$$\%humedad = \left[1 - \left(\frac{(m_{t=0} - m_{t=t})}{(m_{t=0})(\%humedad)} \right) \right] \times 100$$

Donde:

$m_{t=0}$ = muestra en el tiempo 0

$m_{t=t}$ = muestra en el tiempo t

% humedad= humedad inicial de la muestra expresada como fracción (%/100)

En la figura 11 se muestra el comportamiento de pérdida de humedad de la parte aérea de pipicha con respecto al tiempo de secado a una temperatura de 60 °C. A pesar de que se observó una diferencia de 2 h de secado aproximadamente entre muestras en charolas 2 del lote

1 y 3 del lote 2 con muestras colocadas en charolas 4 del lote 1 y 2, las muestras no presentaron daños motivo por la cual, las muestras deshidratadas de las cuatro charolas fueron utilizadas en el siguiente proceso de la investigación.

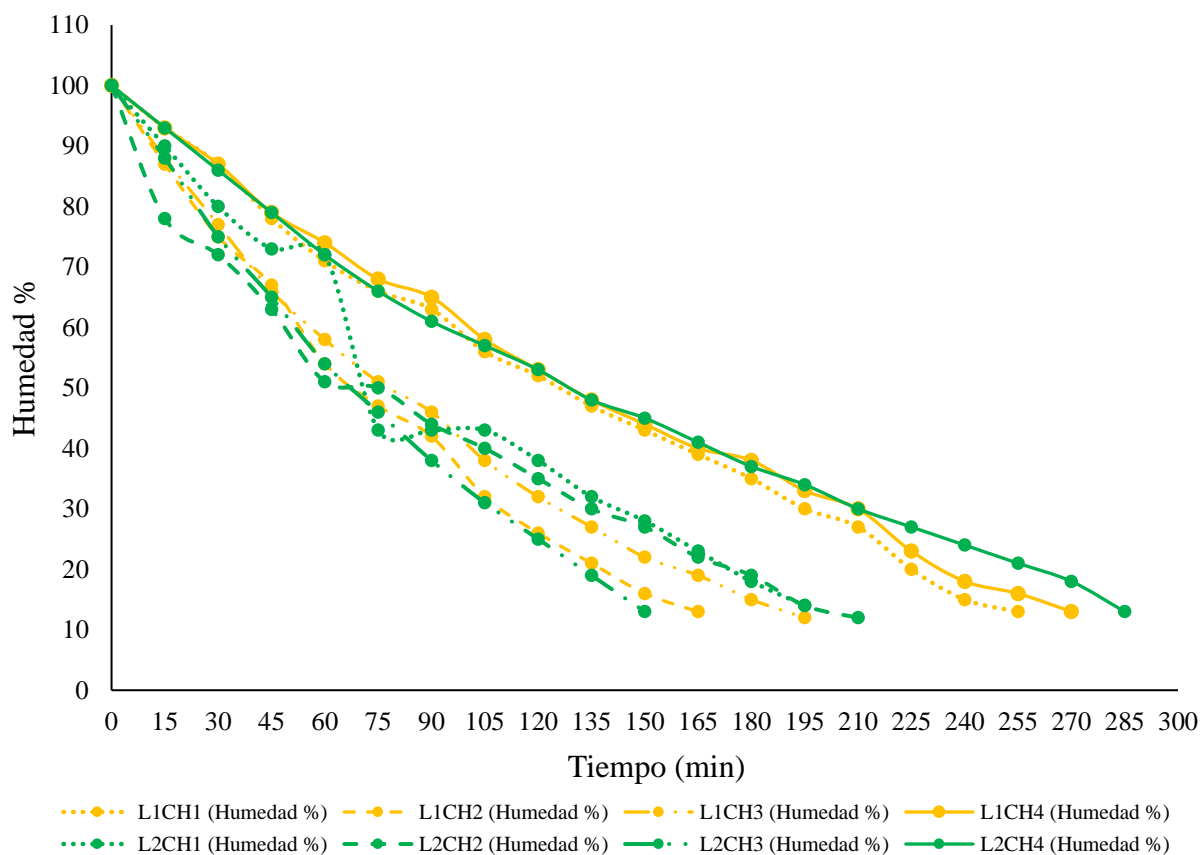


Figura 11. Cinética de secado de muestras de la parte aérea de pipicha.

Una cinética de secado similar fue observada en muestras de hojas de pipicha deshidratadas a 60 °C, a pesar de una diferencia de 2 h de secado aproximadamente entre muestras colocadas en la charola 3 de ambos lotes con muestras de la charola 4, no se observaron daños significativos (Figura 12), por tal motivo, el deshidratado en un secador de charolas

giratorias a una temperatura de 60 °C y una velocidad de aire de 1.2 m/s es factible para deshidratar pipicha sin alterar su composición física.

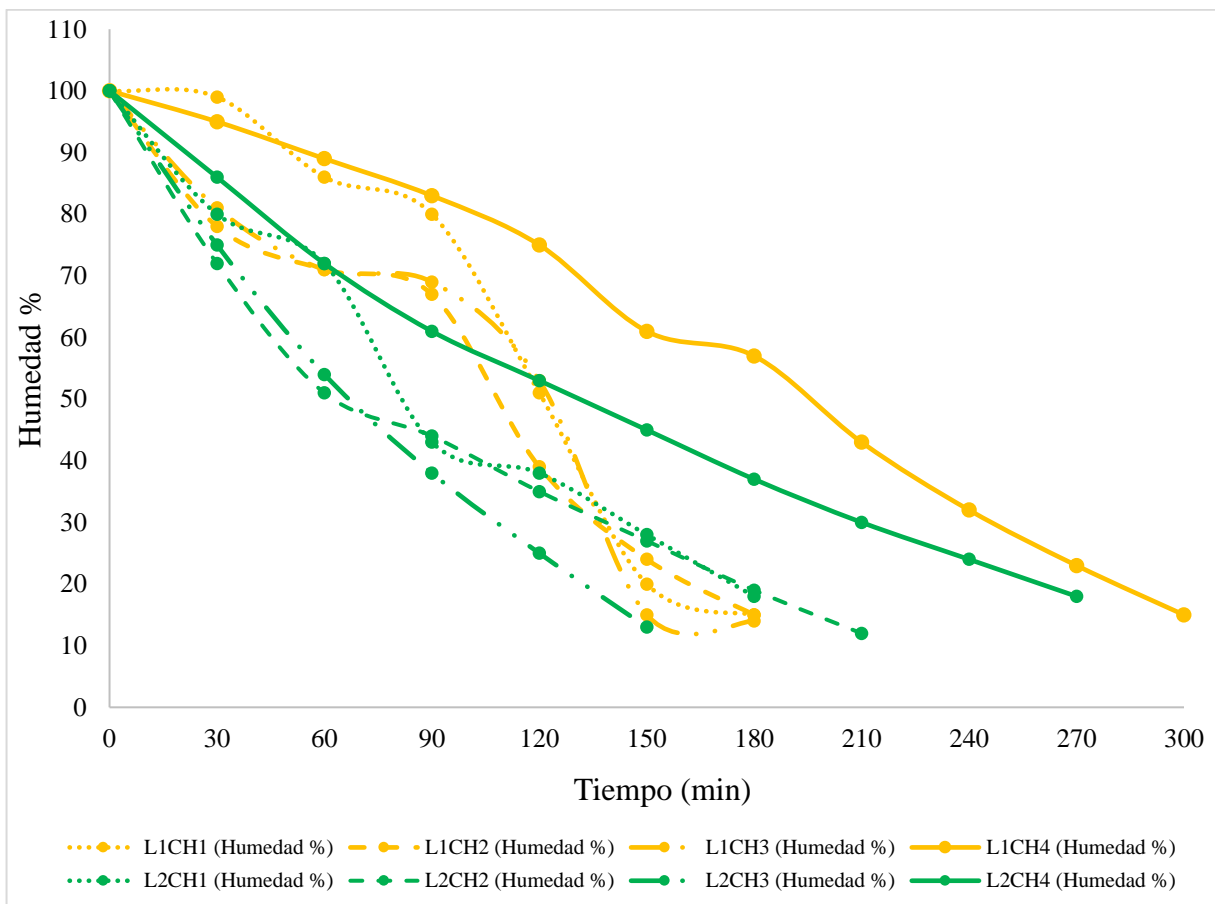


Figura 12. Cinética de secado de muestras de hojas de pipicha.

Las muestras deshidratadas fueron sometidas a molienda en un molino ciclónico utilizando un tamiz de 0.5 mm. En la tabla 4, se muestra que se obtuvo un rendimiento de 18 y 16 %, en parte aérea y hojas; respectivamente.

Tabla 4.
Rendimiento de pipicha deshidratada a 60 °C.

Muestra	Muestra fresca	Muestra seca	Rendimiento
Parte aérea	500 g	93.815 g	18 %
Hojas	500 g	81.357 g	16 %

El proceso de secado aplicado en el presente trabajo, difiere a lo reportado por Gómez, (2019), quien, utilizando el mismo deshidratador a las mismas condiciones, reportó que la muestra deshidratada a 60 °C durante 2 h; pretratada con 0.10 % de ácido ascórbico, tiene una coloración amarillo verdosa significativamente más intensa que el resto de los tratamientos (0.0, 0.05, 0.15 % de ácido ascórbico).

5.2 Obtención de extractos etanólicos

Las muestras fueron codificadas utilizando las tres primeras letras de la materia vegetal haciendo referencia a la parte de la planta, y la cuarta letra al estado fenológico de la planta en el que se obtuvieron los extractos, de igual manera se asignaron números para identificar la fecha en que fueron deshidratadas, asignando el número 1 a la muestra que lleva un año de deshidratado (almacenado) y con el número 2, las muestras deshidratadas recientemente (Tabla 5).

Tabla 5.

Identificación de las muestras.

Especie vegetal	Parte de la planta	Código de Identificación
<i>Porophyllum tagetoides</i>	Hojas frescas	PtHf
	Aérea fresca	PtAf
	Aérea deshidratada 1	PtAd1
	Aérea deshidratada 2	PtAd2
	Hojas deshidratada 2	PtHd2

De cuatro ciclos que fue sometida la muestra en el sonicador, la mayor concentración de extractos se obtuvo en el primer ciclo, al relacionarlo con la intensidad del color del extracto, como se aprecia en la figura 13.

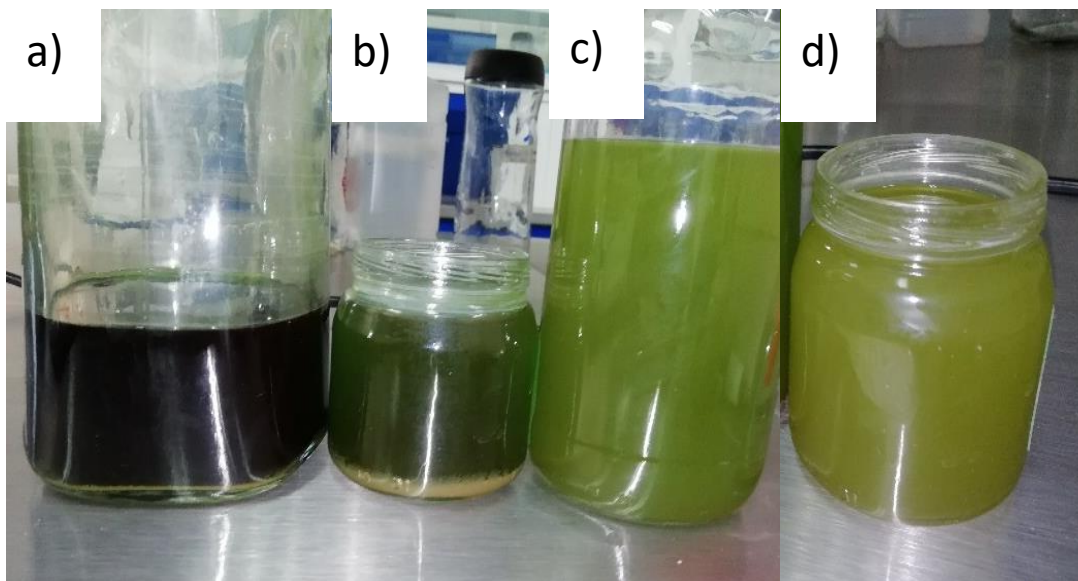


Figura 13. Obtención de extractos mediante extracción asistida por ultrasonido.

a) Un ciclo (1 h); b) 2 ciclos (2 h), c) 3 ciclos (3 h) y d) 4 ciclos (4 h) de extracción.

El extracto obtenido después de la evaporación del disolvente (Figura 14), presentó una forma de pasta semisólida, olor y color intenso; característico de la pipicha, a diferencia del extracto de hojas, el cual presentó de manera uniforme un tono verde intenso; el extracto de la

parte aérea de la pipicha, presentó tonalidades a café particularmente en la pared del cristalizador (Figura 15).

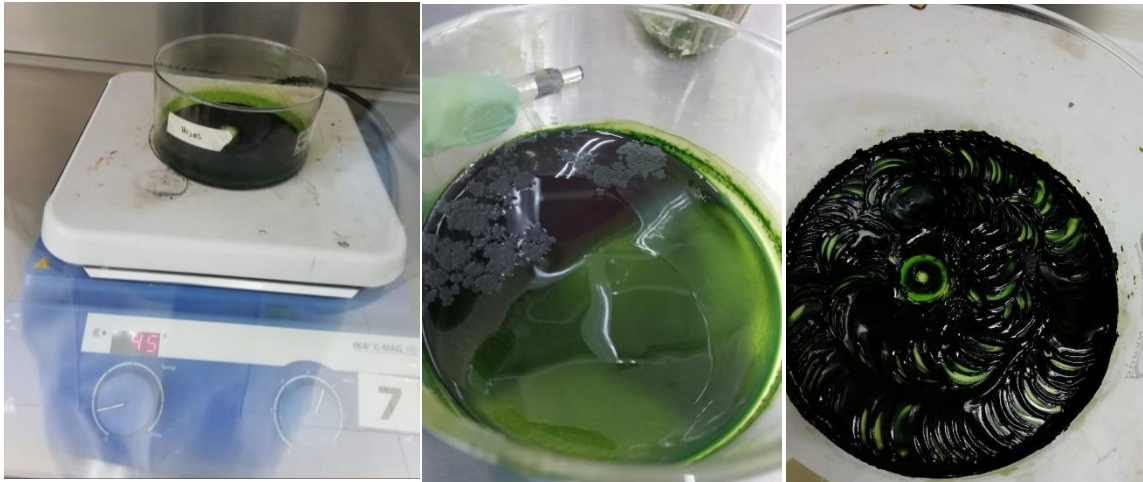


Figura 14. Evaporación del disolvente, para obtener extractos etanólicos.

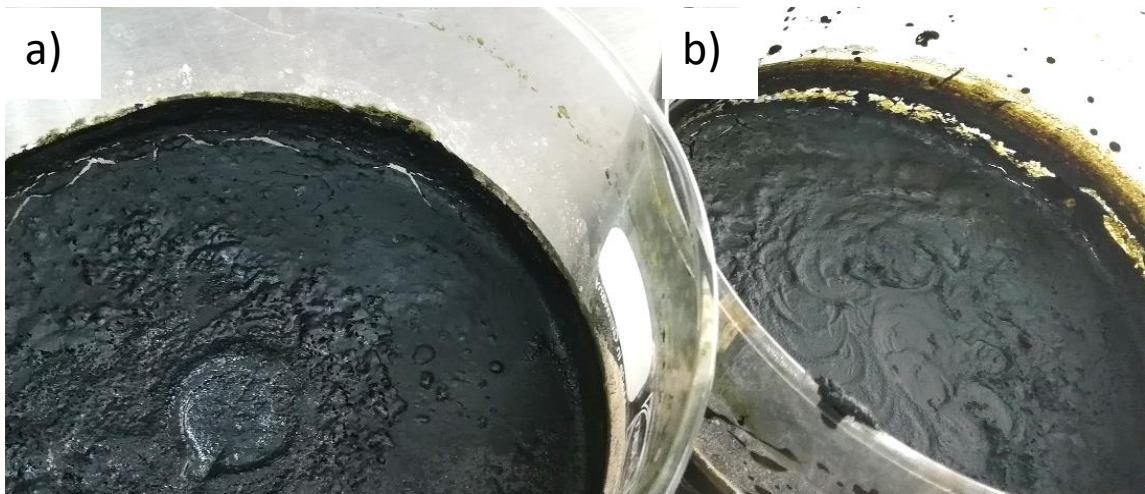


Figura 15. Extractos etanólicos: a) Extracto a partir de hojas y b) Extracto recuperado de la parte aérea.

El rendimiento de los extractos etanólicos se atribuye a la cantidad y parte biológica de la muestra procesada. En un estudio realizado por Vázquez (2021), reporta que el rendimiento de extractos por extracción asistida por ultrasonido, está relacionado con la parte y estado

biológico de la maestra, solvente y del número de ciclos de extracción; mismo autor reporta mayor rendimiento en muestra de pipicha deshidratada, 7.04 %, la cual fue sometida a 8 ciclos de 1 h con intervalos de 15 min respecto a la muestra de pipicha fresca de 2.008 %, sometida únicamente a 1 ciclo (1 h) con intervalos de 15 min, la diferencia encontrada se atribuye principalmente al número de ciclos. El rendimiento estimado en el presente estudio difiere a lo reportado Guzmán, (2009) quien indica un rendimiento del 7.04 % en base seca, en cambio, en el presente estudio, se obtuvo un rendimiento en promedio de 11.10 %, con 12 ciclos de extracción de 1 h (Tabla 6).

Tabla 6.

Rendimiento de extracto obtenido de hojas y parte aérea de Porophyllum tagetoides.

Parte de la planta	Peso (g) de materia	Peso (g) de extracto	Rendimiento %
	vegetal	total	
Aérea deshidratada	93.815	10.9	14.3
Hojas deshidratada	81.357	6.8	7.9

5.3 Perfil fitoquímico de extractos etanólicos por cromatografía en capa fina

Una de las etapas más representativas en el estudio preliminar de una especie vegetal, es la determinación cualitativa de grupos químicos que ayudan a comprender su fisiología y bioquímica. En el análisis fitoquímico consiste en la identificación de constituyentes químicos que de acuerdo al tipo de luz en los que se observa adquieren una tonalidad específica. A luz visible las clorofilas, flavonoides y cumarinas, adquieren una tonalidad verde, amarilla y azul, respectivamente; en cambio a luz UV, alcaloides y cumarinas, presentan una coloración roja y violeta, respectivamente.

La aplicación del reactivo de anhídrido acético-ácido sulfúrico como el ácido sulfúrico 50 % etanólico observado a luz visible, revelaron la presencia de clorofila, flavonoides y cumarinas, con ambos reactivos, pero observado a luz UV, se identificaron cumarinas y alcaloides; estos mismos compuestos fueron identificados también al usar hidróxido de potasio, vistos en luz UV. En cambio, al aplicar el reactivo Dragendorff Reagents (DRG), a luz visible se observaron Flavonoides, pero al ser observado a luz UV, se identificó la presencia de alcaloides (Figura 16).

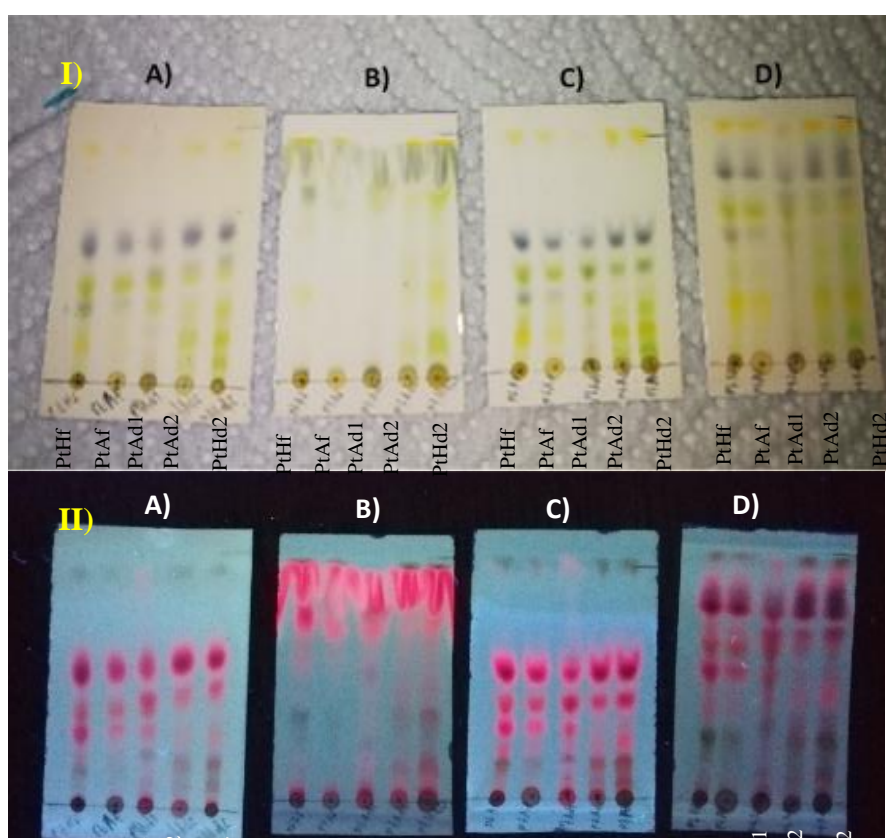


Figura 16. Identificación de metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina en luz visible (I) y UV (II): I) A: C: D: Cumarinas, Flavonoides y Clorofila; B: Flavonoides; II): A: C: D: Alcaloides y Cumarinas, B: Alcaloides.

A pesar de que los compuestos, flavonoides, alcaloides, cumarinas y clorofila fueron observados en muestras fresca; alta incidencia fue detectada en muestras de parte aérea y hojas deshidratadas (Tabla 7).

Tabla 7.
Identificación de metabolitos secundarios observables a luz visible y luz UV.

Método de ensayo/Reactivo de ensayo	Constituyentes químicos	Luz Visible					Luz UV				
		ptHf	ptAf	ptAd1	ptAd2	ptHd2	ptHf	ptAf	ptAd1	ptAd2	ptHd2
Reactivo de anhídrido acético-ácido sulfúrico	Alcaloides	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
	Flavonoides	++	+	+	+	++	-	-	-	+	+
	Cumarinas	+++	++	++	+++	+++	+	-	+	-	+
Dragendorff reagents (DRG).	Alcaloides	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
	Flavonoides	+	+	-	+	++	-	-	+	-	-
	Cumarinas	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Ácido sulfúrico. 50% etanólico (H ₂ SO ₄).	Alcaloides	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
	Flavonoides	++	+	-	++	+++	-	-	-	-	-
	Cumarinas	++	+	+	+++	+++	+	+	+	+	+
Hidróxido de potasio (KOH).	Alcaloides	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
	Flavonoides	+++	+++	+	++	++	-	-	-	-	+
	Cumarinas	++	++	+	+++	+++	+	+	+	++	++

Interpretación: (-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia

Compuestos encontrados en muestras de pipicha deshidratada en el presente estudio, difiere de lo encontrado por (Jimenez *et al.*, 2012), quienes reportan compuestos con actividad antioxidante, entre ellos fenoles, carotenos y vitamina C además de terpenos compuestos con actividad antimicrobiana, como el nonanal y decanal en una relación del 50.87 % y 19.52 %, respectivamente; los cuales han sido reportados tener actividad antimicrobiana contra *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *C. albicans*.

Aunque existen pocos estudios, sobre metabolitos secundarios presentes en la pipicha (Villa, 2018); en un estudio que consistió en determinar la composición química, actividad antioxidante y antigenotóxica de aceites esenciales de *Porophyllum ruderale* y *Porophyllum tagetoides*, reporta el hallazgo de 11 metabolitos secundarios en hojas fresca de *Porophyllum tagetoides*, de los cuales el 36.36 % pertenecen al grupo de alcoholes, 27.27 % a aldehídos y 36.36 % a mono- y sesquiterpenos, en la misma especie pero en hojas deshidratadas encontró 13 compuestos, de los cuales el 46.15 % corresponde a hidrocarburos y aldehídos cíclicos, el 38.46 % a aldehídos, alcoholes, sesquiterpenos y cetonas, y un 15.38 % a monoterpenos; entre los compuestos identificados en muestra deshidratada fueron; 2-ciclohexano-1-one, β -phellandrene, D-limonene, octyl-cyclopropane, decanal y 2.6-dodecadien-1-al, siendo D-limonene en mayor concentración. Mayor contenido de extractos se obtiene en muestras deshidratadas, sin embargo, Gómez (2019) reporta que la pipicha deshidratada pierde alrededor de 16.24 % de sus compuestos fenólicos y 53.88 % de sus flavonoides, por lo que propone un tratamiento previo a la materia fresca con antioxidante, por ello, evaluó 3 concentraciones de ácido ascórbico (0.05, 0.1 y 0.15 %) y encontró que pipicha pretratada con 0.1 % de ácido ascórbico y deshidratado a 60 °C, ayuda a retener compuestos fenólicos.

5.4 Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos

Para determinar si los extractos evaluados presentan o no actividad antimicrobiana, se utilizó la técnica de placas de microdilución en caldo. Durante el análisis se utilizó Cloranfenicol como control positivo y Dimetilsulfóxido (DMSO), como control negativo.

Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se observaron a contraluz y se observó turbidez en todos los pozos inoculados y en todas las disoluciones realizadas, esto indica que hubo crecimiento microbiano de las cepas con la que se inoculó. Al confirmar la inhibición del crecimiento bacteriano a través de la técnica colorimétrica confirmatoria con la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), se presentó una coloración morada en los pozos la cual indica y confirma crecimiento bacteriano (Figura 17).

Aparición del formazano de MTT. Las muestras con actividad metabólica por presencia de colonias de bacterias indican la aparición de la coloración violeta en los pozos.

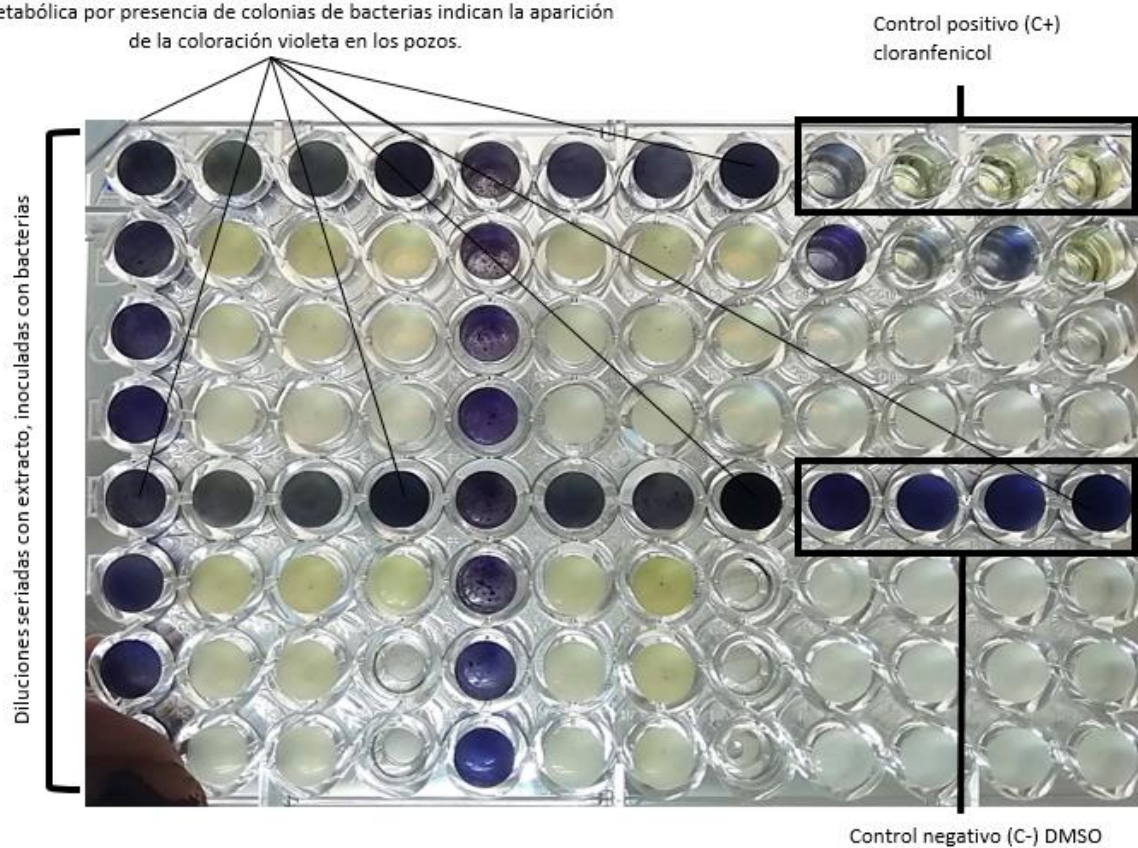


Figura 17. Evaluación de actividad antimicrobiana por la técnica de placas de microdilución en caldo.

Los resultados de microdilución en caldo se concentra en la tabla 8, en la cual se observa que los extractos etanólicos de pipicha deshidratada, no inhiben el crecimiento de bacterias bajo estudio.

Tabla 8.

Concentración mínima inhibitoria de extractos etanólicos de Porophyllum tagetoides frente a bacterias patógenas.

Microorganismos	Extractos etanólicos de:	
	Hojas	Parte aérea
bacterianos		
<i>Staphylococcus aureus</i>	NE	NE
<i>Salmonella monocytogenes</i>	NE	NE
<i>Klebsiella</i>	NE	NE
<i>Salmonella</i>	NE	NE

NE: No Encontrada

La actividad antimicrobiana de extractos etanólicos no encontrado en el presente estudio, difiere de los resultados obtenidos por Guzmán, (2009), quien al evaluar la actividad antimicrobiana extractos (crudo, acuoso y etanólico) de pipicha (*Porophyllum tagetoides*) a través de la prueba de sensibilidad por el método de difusión en disco, encontró actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de pipicha fresca contra *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Streptococcus gpo C*, al observar halos más grandes respecto a los demás extractos, de 16.20, 15.77 y 15.70 mm de diámetro, indicando que extractos etanólicos de pipicha fresca poseen actividad antimicrobiana contra bacterias y levaduras.

VI. CONCLUSIÓN

El secado de pipicha en un deshidratador de charolas giratorias a una temperatura de 60 °C a una velocidad de aire de 1.2 m/s por 2 h es factible para deshidrata hojas y parte aérea de pipicha sin alterar significativamente su composición fisicoquímica.

Los metabolitos secundarios identificados mediante cromatografía de capa fina, tres de ellos, flavonoides, clorofila y cumarinas corresponden a compuestos fenólicos y solamente un compuesto identificado, alcaloide; que ha sido utilizado como analgésico.

Aunque existen reportes que extractos etanólicos de pipicha fresca poseen actividad antimicrobiana contra bacterias y levaduras, principalmente; en el presente estudio, no se encontró actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de hojas y parte aérea de pipicha fresca y seca.

VII. PERSPECTIVAS

- Determinación de la actividad citotóxica de extractos de pipicha (*Porophyllum tagetoides*) contra células de cáncer y células no cancerosas humanas.
- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos de pipicha (*Porophyllum tagetoides*).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallaah, E. M. (2011). Plants: An alternative source for antimicrobials. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(06), 16–20.
- Alparo Herrera, I. (2013). Manifestaciones gastrointestinales de niños con espectro autista. *Revista de La Sociedad Boliviana de Pediatría*, 52(3), 165–167.
- Arzola, R., & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido. *Tecnología En Marcha*, 20(4), 30–40.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71–79.
- Bernal R., M., & Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 4(3–4), 112. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Castro Lara, D., Bye Boettler, R. A., & Mera Ovando, L. M. (2011). *Diagnóstico del pápaloquelite en México Porophyllum ruderale (Jacq.) Cass. var. macrocephalum (DC.) Cronq.* (Primera). Universidad Autónoma de Chapingo.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Cobos, D. S., Elena, M., Juárez, M., Casas, G., Cortés, G. M., Guzmán, E. A., & Cruz, B. V. (2019). *Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the extracts from the leaves*

of Porophyllum tagetoides and Annona reticulata. 7(1), 50–54.

Concejo Nacional de Población. (2020). índice de marginación por entidad federativa y municipio 2020: Nota técnica-metodológica. In CONAPO (Ed.), *Secretaría de Gobernación*.

Conner, J. G., Teschler, J. K., Jones, C. J., & Yildiz, F. H. (2016). Staying Alive: *Vibrio cholerae*'s Cycle of Environmental Survival, Transmission, and Dissemination. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 1–48. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015>

Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo. (2019). *Medición y análisis de la pobreza en México: Memorias del CONEVAL 2006-2018* (Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo (ed.); Segunda).

Dabanch P., J., Herrero C., D., Pavéz A., C., Veas P., N., Braun J., S., & Porte T., L. (2009). Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura. *Revista Chilena de Infectología*, 26(4), 360–362.

Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., & Kumar, S. (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(March), S1193–S1199. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.015>

García-Sánchez, J. E., García-Sánchez, E., & García-Moro, M. (2016). El microbiólogo clínico ante los cambios taxonómicos en el género *Clostridium*. *Revista Española de Quimioterapia*, 29(5), 239–243.

Gómez Mejía, J. (2019a). *Secado y evaluación de la actividad antioxidante de pepicha (Porophyllum tagetoides)*. Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio.

Gómez Mejía, J. (2019b). *Secado y evaluación de la actividad antioxidante de pepicha*

- (*Porophyllum tagetoides*). Instituto Tecnológico Superior de Avcatlán de Osorio.
- Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., & González-Andrade, M. C. (2000). [Salmonella serotypes identified in Mexican health services]. *Salud Publica de Mexico*, 42(6), 490–495. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201576>
- Guzmán Morales, A. P. (2009). *Actividad antioxidante y antimicrobiano del aceite esencial y extractos (crudo, acuoso y etanólico) de Pipicha (Porophyllum tagetoides)*. Universidad Veracruzana.
- Hernández, F. (1990). Caracterización de Campylobacter, Helicobacter y Bacterias curvadas asociadas con gastritis y úlceras pépticas. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 11(3,4), 49–56. <http://hdl.handle.net/20.500.11764/3565>
- Hernández Cortez, C., Aguilera Arreola, M. G., & Castro Escarpulli, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4), 137–151.
- Jimenez, M., Guzman, A. P., Azuara, E., Garcia, O., Mendoza, M. R., & Beristain, C. I. (2012). Volatile Compounds and Antioxidative Activity of *Porophyllum tagetoides* Extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(1), 57–63. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0270-0>
- José María Rumbo-Prieto, L. A.-A. J. S. C.-R. (2018). Mapa microbiano de la piel humana: conociendo a nuestros huéspedes. *Enfermería Dermatológica*, null(4), 18–22. <https://doi.org/10.5281/zenodo.2526255>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Biología de los microorganismos* (12th ed.). Pearson Educación.
- Morris, W. E., & Fernández-Miyakawa, M. E. (2009). Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(4), 251–260.

- Muro Medina, C. V., García Morales, S., & León Morales, J. M. (2018). ¿Como obtener compuestos antimicrobianos de las plantas? *Biotechnología En Movimiento*, 27–29.
- Naranjo, L., Chaviano, G., Vaquer, P., & Castro, R. (2007). Validación del ensayo de proliferación celular colorimétrico por MTT para la determinación de potencia del rHu-met-G-CSF. *Revista Cubana de Química*, XIX(1), 18–21.
- Pandey, A. K. (2007). Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Parthenium hysterophorus*: an in vitro study. *National Academy of Sciences*, 3011(12), 383–386.
- Parra, M., Durango, J., & Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por salmonella. *Revista MVZ Córdoba*, 7(2), 187–200.
- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Monnier, A. Le, & Brisse, S. (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogens*, 4(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000146>
- Ramirez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 42, 263–268.
- Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed Research International*, 2017, 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2017/9351507>
- Rodríguez-Angeles, M. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico*, 44(5), 464–475.
<https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>
- Rodríguez Saucedo, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación

- de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 153–170. <https://doi.org/10.35197/rx.07.01.2011.14.er>
- Rojas, J. J., García, A. M., & López, A. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(2), 28–32.
- Rojas Ruiz, N. E., Muñoz Zurita, G., González Montesinos, D. V., & Del Pozo González, M. F. (2013). Aislamiento microbiológico de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de camarón coctelero en la ciudad de Puebla. *Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas*, 33(4), 147–151.
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355–363.
- Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., Kallen, A., & Limbago, B. (2013). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(1), 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/668770>
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., & Dooley, J. S. G. (2005). Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41(4), 297–302. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01788.x>
- Solnick, J. V., & Vandamme, P. (2001). Taxonomy of the *Helicobacter* Genus. In H. L. Mobley, G. L. Mendz, & S. L. Hazell (Eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press.
- Suárez Larreinaga, C. L., & Berdasquera Corcho, D. (2000). Enfermedades emergentes y

- reemergentes: Factores causales y vigilancia. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 16(6), 593–597.
- Swami Handa, S., Singh Khanuja, S. P., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. International Centre for Science and High Technology.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6), S3–S10. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
- Torres Manrique, C. (2012). *La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming* (Colegio Oficial de Farmaceúticos de Zaragoza (ed.)). Cometa, S.A.
- Valdés, M. Á. S. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 16(3), 402–419.
- Vázquez Aguilar, D. E. (2021). *Evaluación de extractos etanólicos en polvo de pipicha (Porophyllum tagetoides) fresca como conservadores del queso artesanal de cabra*. Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio.
- Villa Merlán, A. K. (2018). *Composició n química, actividad antioxidante y antígenotóxica de aceites esenciales de Porophyllum ruderale y Porophyllum tagetoides*. Universidad Autónoma de Guerrero.
- Villalón F, A., Reyes P, D., Ortiz O, J., Gándara F, V., Díaz P, L. A., Chahuán A, J., Pizarro R, M., & Riquelme P, A. (2020). Tratamiento y manejo de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Gastroenterología Latinoamericana*, 31(3), 136–146. <https://doi.org/10.46613/gastrolat2020003-03>
- Zarb, P., Coignard, B., Griskeviciene, J., Muller, A., Vankerckhoven, V., Weist, K., Goossens,

M. M., Vaerenberg, S., Hopkins, S., Catry, B., Monnet, D. L., Goossens, H., & Suetens, C. (2012). The european centre for disease prevention and control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Eurosurveillance*, 17(46), 1–16. <https://doi.org/10.2807/ese.17.46.20316-en>

VIII. ANEXOS

Tabla 9.

Diferencia de porcentaje de humedad, respecto al tiempo de deshidratado en cada una de las charolas del deshidratador. Primer lote parte aérea.

Tiempo (min)	Charola 1 Humedad (%)	Charola 2 Humedad (%)	Charola 3 Humedad (%)	Charola 4 Humedad (%)
0	100	100	100	100
15	93	87	88	93
30	87	75	77	87
45	78	67	66	79
60	71	54	58	74
75	66	47	51	68
90	63	42	46	65
105	56	32	38	58
120	52	26	32	53
135	47	21	27	48
150	43	16	22	44
165	39	13	19	40
180	35		15	38
195	30		12	33
210	27			30
225	20			23
240	15			18
255	13			16
270				13

Tabla 10.

Diferencia de porcentaje de humedad, respecto al tiempo de deshidratado en cada una de las charolas del deshidratador. Segundo lote parte aérea.

Tiempo	Charola 1 Humedad (%)	Charola 2 Humedad (%)	Charola 3 Humedad (%)	Charola 4 Humedad (%)
0	100	100	100	100
15	90	78	88	93
30	80	72	75	86
45	73	63	65	79
60	72	51	54	72
75	43	50	46	66
90	43	44	38	61
105	43	40	31	57
120	38	35	25	53
135	32	30	19	48
150	28	27	13	45
165	23	22		41
180	18	19		37
195	14	14		34
210		12		30
225				27
240				24
255				21
270				18
285				13

Tabla 11.

Diferencia de porcentaje de humedad, respecto al tiempo de deshidratado en cada una de las charolas del deshidratador. Primer lote, hojas.

Tiempo (min)	Charola 1	Charola 2	Charola 3	Charola 4
	Humedad (%)	Humedad (%)	Humedad (%)	Humedad (%)
0	100	100	100	100
30	99	78	81	95
60	86	71	71	89
90	80	67	69	83
120	51	39	53	75
150	20	24	15	61
180	15	15	14	57
210				43
240				32
270				23
300				15