



Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio

SEP TecNM

DIVISIÓN DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

OPCIÓN

“Tesis”

Proyecto

**“Evaluación de extractos etanólicos en polvo de pipicha
(*Porophyllum tagetoides*) fresca como conservadores del
queso artesanal de cabra”**

Que para obtener el título de:

Ingeniero en Industrias Alimentarias

Presenta

David Everardo Vázquez Aguilar

150612013

Acatlán de Osorio, Pue., Julio de 2021

DEDICTORIAS

El presente trabajo de grado, va dedicado en primer lugar, a **Dios**, por haberme dado la vida y guiarme a lo largo de ella, permitiéndome llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres, **María y Bulmaro**, quienes, con su amor incondicional, paciencia y esfuerzo me ayudaron a culminar hoy mi carrera universitaria y me han permitido llegar a cumplir un sueño más.

A mis hermanos, **Anayeli, Yavelit y Juan Carlos** por todos los consejos brindados y ser mi ejemplo de superación.

Al **tío Filadelfo**, quien es y será por siempre un ejemplo de generosidad para toda la familia.

A mis amigos, **Areli y Miguel**, con quienes compartí fuera y dentro de las aulas, convirtiéndose en amigos de vida y colegas, gracias por su apoyo y diversión.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por ser mi guía y por todas las bendiciones brindadas a lo largo de este camino.

Agradezco a mis **padres, hermano y hermanas** por ser el pilar fundamental y haberme apoyado incondicionalmente, pese a las adversidades e inconvenientes que se presentaron.

Agradezco a mi director de tesis, al **M.C. Víctor I. Pacheco Contreras**, por el conocimiento y la paciencia brindada durante mi formación, y en especial durante la realización de esta investigación.

A la **I.A. Gabriela F. Lara Ruiz** por su apoyo en el desarrollo del proyecto y ser guía como tutor a lo largo de mi preparación profesional en el ITSAO.

A la **Dra. Ana María Sifuentes Rincón**, por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo incondicional durante y después de mi estancia en el Centro de Biotecnología Genómica.

Al **M.C. Williams Arellano Vera**, por todo su apoyo y paciencia durante la realización de la parte experimental.

A la **Dra. Mayra Herrera Martínez** por permitirme realizar estancia académica en el laboratorio de Farmacología de la Universidad de la Cañada y por la asesoría brindada en la parte experimental del proyecto.

Agradezco al **Dr. Raúl Salas Coronado** por permitirme desarrollar parte experimental de mi proyecto, durante mi estancia académica en el laboratorio de Bromatología del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

Quiero agradecer también, al **Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio**, en especial, al equipo de docentes que conforman la **Carrera de Ingeniería en Industrias Alimentarias**, por todo el conocimiento y apoyo brindado durante estos años de formación.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que de una u otra manera me brindaron su apoyo incondicional a lo largo de este trayecto. A todos ellos, ¡**Gracias!**

ÍNDICE

RESUMEN	X
ABSTRACT	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO E HIPÓTESIS	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
2.3. Hipótesis	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Alimento	4
3.1.1. Clasificación de los alimentos según su origen.....	4
3.1.2. Clasificación de los alimentos según su caducidad.....	5
3.1.2.1. Alimentos perecederos	5
3.1.2.2. Alimentos semi-perecederos.....	6
3.1.2.3. Alimentos no perecederos	6
3.1.3. Conservación de los alimentos.....	7
3.1.4. Técnicas de conservación.....	8
3.1.5. Conservadores químicos	10
3.1.6. Agentes antimicrobianos naturales.....	10
3.1.6.1. Situación actual de los agentes antimicrobianos naturales	12
3.2. Pepicha (<i>Porophillum tagetoides</i>).....	13
3.3. Leche de cabra	14
3.3.1. Valor nutritivo	15
3.3.2. Queso de cabra	16
3.3.2.1. Proceso de elaboración del queso.....	16
3.3.2.2. Microbiología de los quesos	19
3.3.2.3. Patógenos en el queso.....	20
3.4. Técnicas moleculares para la detección de patógenos en alimentos.....	21
3.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
3.4.2. Identificación microbiológica usando el gen 16s ribosomal	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. Obtención del extracto etanólico.	25
4.2. Diseño experimental	26

4.3. Elaboración de quesos de cabra artesanal.....	26
4.3.1. Recolección de la leche de cabra.....	26
4.3.2. Elaboración del queso de cabra artesanal.....	27
4.4. Evaluación sensorial	30
4.5. Caracterización molecular	31
4.5.1. Extracción de ADN en muestras de queso	31
4.5.2.1. Cuantificación de ADN	32
4.5.2.2. Dilución del ADN.....	33
4.5.2.3. Amplificación de ADN con el Gen 16s.....	33
4.5.2.4. Clonación molecular (ligación y transformación)	35
4.5.2.5. Caracterización de recombinante: PCR	36
4.5.2.6. Secuenciación	38
4.5.2.7. Purificación -Xterminator.....	39
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
5.1. Extractos etanólicos en polvo	40
5.2. Elaboración del queso de cabra.....	41
5.3. Evaluación sensorial	42
5.4. Caracterización molecular	48
5.4.1 Extracción de ADN	48
5.4.2. Amplificación del Gen 16s.....	49
5.4.3. Clonación molecular	49
5.4.4. Tamizado.....	50
VI. CONCLUSIONES.....	55
VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	56
VIII. ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes antimicrobianos de origen vegetal.....	12
Tabla 2 Composición de la leche de cabra en comparación con la leche de vaca y materna...15	15
Tabla 3 Características de los microorganismos presentes en la leche y queso.	20
Tabla 4 Esquema del diseño experimental.	26
Tabla 5 Condiciones de reacción para la PCR de la región 16S.	34
Tabla 6 Condiciones para la clonación.....	35
Tabla 7 Condiciones de amplificación.	37
Tabla 8 Condiciones de la reacción de purificación para las muestras de PCR.....	38
Tabla 9 Condiciones para secuenciación de las muestras.	38
Tabla 10 Condiciones de la reacción de purificación.....	39
Tabla 11 Rendimiento de extractos etanólicos.	40
Tabla 12 Rendimiento de extractos etanólicos después de la liofilización.	41
Tabla 13 Rendimiento de los quesos de cabra.....	42
Tabla 14 Datos obtenidos de la prueba triangular aplicado a panelistas no entrenados (queso día 1).....	45
Tabla 15 Muestras seleccionadas y descartadas para su secuenciación.	51
Tabla 16 Diversidad e identidad microbiana en los diferentes tratamientos de los quesos.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los alimentos según su origen.....	5
Figura 2. Clasificación universal de los métodos de conservación de los alimentos.	9
Figura 3. Diagrama de flujo de proceso para la elaboración del queso fresco	17
Figura 4. Representación esquemática del gen de RNA ribosomal 16S.	24
Figura 5. Diagrama de flujo de proceso de la elaboración del queso artesanal de cabra.	29
Figura 6. Extracto etanólico después del liofilizado. Pepicha fresca (A) y pepicha deshidratada (B).	41
Figura 7. Medias de cuadrados mínimos de la prueba de ordenamiento para determinar el tratamiento de mayor preferencia.	44
Figura 8. Extracción de ADN de quesos con 30 días de almacenado.	48
Figura 9. Amplificación del gen 16s en muestras de leche y queso día 1 y 15.	49
Figura 10. Colonias portadoras y en ausencia del inserto (gen de interés).	50
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (tamizaje de los diferentes tratamientos).51	

RESUMEN

La pepicha es una planta utilizada como condimento en algunos platillos tradicionales de la cocina mexicana. Hoy en día, existen estudios, que demuestran que esta planta posee propiedades antioxidantes y antimicrobianas, lo que la hace ser una alternativa para su aplicación como un conservador natural dentro de la industria alimentaria. Por tal motivo, el objetivo de la presente investigación fue evaluar mediante una prueba sensorial la potencial aplicabilidad de extractos etanólicos de pepicha fresca aplicados en queso de cabra artesanal, con el fin de aumentar su vida de anaquel. Para estimar la concentración de extracto que inhibe mejor el crecimiento microbiano sin alterar las propiedades organolépticas del queso, se utilizó un diseño experimental unifactorial con cinco niveles (0.2g, 0.4g, 0.6g, 0.8g de extracto y un control negativo sin extracto). Para cada tratamiento, se elaboraron tres quesos que permitieron la evaluación sensorial y el monitoreo microbiológico mediante pruebas moleculares del queso al día 1 (quesos recién elaborados), y a los 15 y 30 días de refrigeración. La aceptabilidad del queso tratado con extractos etanólicos de pepicha fresca, se determinó mediante la prueba de ordenamiento y triangular, con 14 panelistas no entrenados. Diferencia no significativa fue encontrada entre concentraciones de extractos durante la evaluación sensorial, sin embargo, quesos tratados con 0.4 g y 0.8 g de extracto, presentaron mayor aceptabilidad, siendo la muestra con 0.8 g de extracto con mayor promedio de aceptabilidad, que, al ser evaluada en la prueba triangular, los panelistas identificaron diferencia significativa con el queso control (sin extracto). El análisis molecular solo permitió hacer inferencias sobre el tipo de microorganismos presentes en el queso de cabra. Se encontró que el género *Streptococcus* fue común en las tres muestras de quesos analizados al día de elaboración, en la que se identificaron tres especies, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus vestibularis*, de las cuales

Streptococcus thermophilus fue superior en muestras de quesos tratados con 0.2 g de extracto, mientras que, en quesos con 15 días de refrigeración en los tres tratamientos, el género que predominó fue *Psychrobacter*, siendo *Psychrobacter alimentarius*, la bacteria que predominó en las tres muestras analizadas. Finalmente, aunque mayor número de microorganismos fueron encontrados en quesos adicionados con 0.2 g de extracto con 15 días de almacenado. Es necesario realizar más estudios para definir el efecto de los extractos sobre la diversidad bacteriana.

ABSTRACT

Pepicha is a plant used as condiment in some traditional dishes of the Mexican food. Actually, there are studies that show that this plant has antioxidant and antimicrobial properties, which make it an alternative for its application as an antimicrobial and/or natural antioxidant in the food industry. For this reason, the objective of this research was assess through a sensorial test the potential applicability of ethanolic extracts of the fresh pepicha applied in artisanal goat cheese, with the purpose to increase its shelf life. For estimate the concentration of the extract that better inhibits microbial growth without altering the organoleptic properties of the cheese, an unifactorial experimental design with five levels was used (0.2 g, 0.4 g, 0.6 g, 0.8 g of extract and a negative control without extract). For each treatment, three cheeses were made to carry out the sensory test and the microbiological monitoring by means of molecular tests on the cheeses at the day 1 (recently made cheeses), at the 15 and 30 days of refrigeration. Acceptability of cheese treated with ethanolic extracts of fresh pipicha, was determinate by means of the ordering and triangular tests, with 14 untrained panelists. Difference non-significant, was found between concentrations of extracts during sensory tests, however, cheeses treated with 0.4 and 0.8 g of extracts, presented higher acceptability, being the sample with 0.8 g of extract with higher acceptability average, this one at be assessed by the triangular tests, the panelists identified significant difference with negative control (cheese without extract). The molecular analysis only allowed to do inferences about the type of microorganisms present in the goat cheese. We found that the *Streptococcus* genus, was the common bacteria in the three cheese samples analyzed at day of production, in which three species were identified, *Streptococcus thermophyllus*, *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus vestibularis*, of which *Streptococcus thermophyllus* was higher in cheese samples treated with 0.2 g of extract, while, in cheese with

15 days of refrigeration in the three treatments, the predominant genus was *Psychrobacter*, being *Psychrobacter alimentarius*, the predominant bacteria in the three samples analyzed. Finally, although a greater number of microorganisms were found in cheeses treated with 0.2 g of extract with 15 days of refrigeration. It is necessary to carry out more studies to define the effect of the extracts on bacterial diversity.

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos, son una de las principales causas de deterioro en los alimentos, por ende, representa uno de los grandes desafíos que hoy en día afronta la industria alimentaria, ya que, a pesar de las diversas técnicas y/o métodos empleados, no ha sido controlado del todo (Aguilar, 2012). El uso de conservadores químicos, es uno de los métodos más antiguos para la preservación de los alimentos, sin embargo, en la actualidad este tipo de sustancias han sido asociadas a enfermedades degenerativas como el cáncer (Aguilar, 2012). Es por ello, que la industria alimentaria se ha encaminado en la búsqueda de nuevas alternativas que no solo prolonguen la vida de anaquel de los alimentos, sino que, además, sean seguros para la creciente demanda de los consumidores (Guzmán, 2009).

Además del secado, deshidratado, salado, etc.; el uso de agentes antimicrobianos naturales, extraídos principalmente de hierbas o plantas, se presenta como una de las alternativas más eficientes y seguras para contrarrestar el deterioro de los alimentos sin alterar sus propiedades (Beuchat *et al.*, 1989) citado por (Zambrano, 2015). Diversos estudios, han demostrado que la presencia de grupos funcionales como: fenoles, flavonoides, flavonas, taninos en algunas plantas como el laurel, oregano, vainilla, ajo, tomillo, roble, eucalipto, manzanilla, ejercen un efecto antimicrobiano (Rodríguez, 2011).

La pepicha (*Phorophyllum tagetoides*) es una planta anual de olor intenso originaria de México ha sido utilizada principalmente como condimento (Gúzman, 2009). Algunos estudios han demostrado que la pepicha, posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Jiménez *et al.*, 2012). Hoy día se sabe, que dichas propiedades alteran el potencial redox óptimo de los

microorganismos, las cuales provocan daños en la pared celular y en la membrana alterando la síntesis de proteínas, ADN y ARN, por ende, la proliferación de los microorganismos (Guzmán, 2009). Por tal razón, el objetivo del presente trabajo fue determinar la aplicabilidad de extractos etanólicos de pepicha fresca como conservador de queso de cabra artesanal, para lo cual se realizaron evaluaciones sensoriales y exploró por métodos moleculares la identidad de los microorganismos presentes en los quesos preparados.

II. OBJETIVO E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

Determinar la aplicabilidad de extractos etanólicos en polvo de pepicha fresca (*Porophyllum tagetoides*) como potencial agente antimicrobiano en queso de cabra artesanal.

2.2. Objetivos específicos

1. Obtener extractos etanólicos en polvo de pepicha fresca por maceración asistida por ultrasonido y liofilización.
2. Elaborar quesos de cabra adicionadas con diferentes concentraciones de extracto en polvo de pepicha fresca.
3. Determinar el efecto de extractos etanólicos en polvo sobre la calidad sensorial de los quesos mediante una prueba de ordenamiento y triangular con panelistas no entrenados.
4. Identificar molecularmente microorganismos nativos en quesos de cabra adicionados con extractos etanólicos de pepicha fresca

2.3. Hipótesis

Extractos antimicrobianos en polvo de pipicha deshidratada (*Porophyllum tagetoides*) fresca adicionados al queso de cabra reducen el crecimiento microbiano y aumenta su vida de anaquel.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Alimento

Los alimentos son aquellas sustancias o productos de cualquier naturaleza que, por sus características, composición, aplicación, preparación y estado de conservación son susceptibles de ser habitual e idóneamente utilizados para la correcta nutrición humana, como fruitivos o como productos dietéticos en casos especiales de nutrición humana (Codex Alimentarius, 2007).

3.1.1. Clasificación de los alimentos según su origen

Existe una diversidad de criterios que permiten clasificar a los alimentos, alguna de ellas es con base a sus nutrientes más significativos, así como también al país, e incluso a los autores (Cervera *et al.*, 2004). El clasificarlos, facilita conocer de manera más detallada el contenido nutricional que aportan a nuestro organismo y es de esta manera que nos permite llevar una dieta más equilibrada. Una de las más comunes, es de acuerdo a su origen (Figura 1), ésta a su vez se clasifica en tres grupos: origen animal (todos aquellos procedentes de los animales), origen vegetal (aquellos obtenidos de los vegetales o plantas) y de origen mineral (aquellos que se encuentran en la naturaleza).

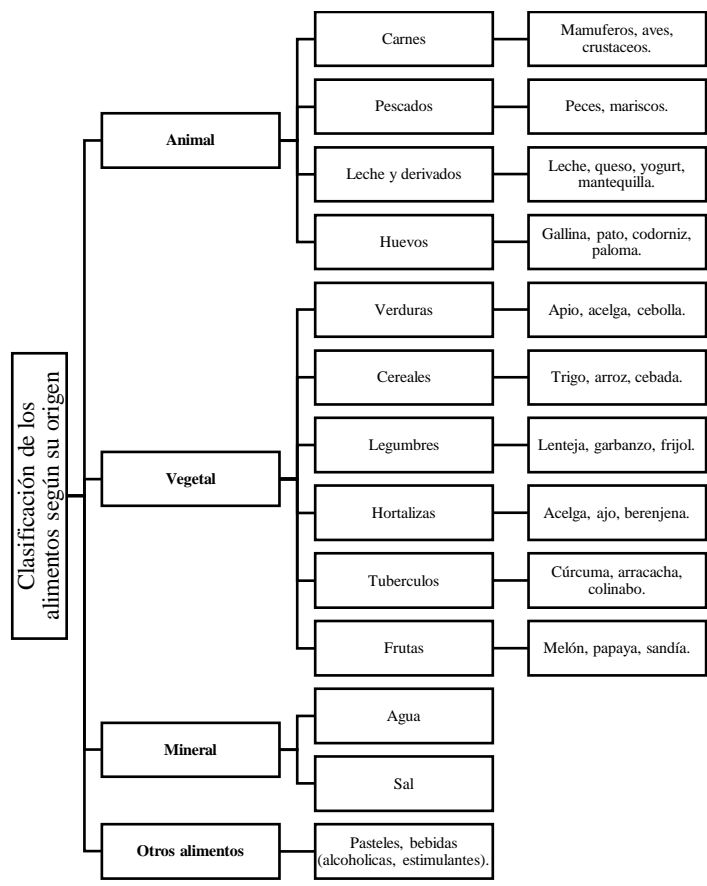


Figura 1. Clasificación de los alimentos según su origen.

Fuente: Cervera *et al.*, 2004.

3.1.2. Clasificación de los alimentos según su caducidad

Según Aguilar (2012), uno de los criterios importantes para la clasificación de los alimentos es con base a su vida útil (perecibilidad o caducidad) de los mismos, dentro de los cuales, de acuerdo a Zambrano (2015), encontramos la siguiente clasificación:

3.1.2.1. Alimentos perecederos

Alimentos que experimentan alteraciones en su composición y/o características fisicoquímicas y biológicas, que disminuyen o anulan su aceptabilidad en lapsos variables debido a factores como la temperatura, la humedad, la presión atmosférica, etc. Este tipo de alimentos, exigen

condiciones especiales de conservación, almacenamiento y transporte; algunos alimentos que entran en esta lista son: derivados de animales y vegetales; siendo las frutas, la leche y sus derivados, alimentos con alta perecebilidad, los cuales solo pueden ser conservados a mayor tiempo mediante refrigeración (a 5 °C o menos) y, en el caso de algunas frutas por congelación a -18°C, y así evitar su deterioro por microorganismos (Rodríguez, 2011).

3.1.2.2. Alimentos semi-perecederos

Son aquellos en los cuales depende de la humedad del aire y de la calidad microbiana del mismo. Algunos ejemplos de estos son los frutos secos, los tubérculos y de más vegetales como las gramíneas.

3.1.2.3. Alimentos no perecederos

Estos alimentos pueden almacenarse con seguridad durante largos periodos de más de 6 meses; solo son deteriorados por factores como la contaminación repentina, el mal manejo del mismo, accidentes y demás condiciones, los cuales no están definidos por el mismo. Algunos de estos alimentos son las pastas, las harinas y el azúcar, los cuales solo comienzan a deteriorarse cuando tienen contacto con algún contaminante o después de su uso al ser cocinados (Rodríguez, 2011).

Tomando en cuenta esta última clasificación, es necesario recalcar la importancia de la conservación de los alimentos, específicamente, los de origen vegetal; frutas y verduras (Rodríguez, 2011) y de origen animal (como son las carnes, la leche y sus derivados). Estos últimos, considerados como altamente susceptibles a su deterioro, en donde uno de los principales factores es la proliferación de los microorganismos (Gómez, 2013). Es por ello, que

es necesario la implementación de nuevas técnicas y/o métodos para prolongar la vida útil de estos alimentos.

3.1.3. Conservación de los alimentos

El concepto “conservación de los alimentos” se le atribuye al conjunto de tratamientos que prolongan la vida útil de un producto, con la intención de mantener, en el mayor grado posible, sus atributos de calidad (color, sabor, textura y valor nutricional) (Zambrano, 2015). Mientras que, la vida útil de un alimento, hace referencia al tiempo finito, que el alimento, después de su producción en condiciones controladas, conserva sus propiedades sensoriales y físico-químicas, pasando enseguida a un cambio en su perfil microbiológico (Carrillo, 2013).

Actualmente, la búsqueda de alternativas para la conservación de alimentos, representa uno de los más grandes retos dentro de la industria alimentaria, puesto que ahora, ya no solo basta con controlar indicadores de deterioro (proliferación de microorganismos, oxidación de grasas y aceites, pérdida de humedad, cambio en la textura y viscosidad, pérdida del color y sabor, etc.) (Rodríguez, 2011), sino, brindar productos nutricionalmente adecuados y seguros, puesto que, enfermedades como el cáncer y otras enfermedades degenerativas, han sido asociadas al consumo de conservadores químicos contenidos en los alimentos procesados industrialmente (Pastrana *et al.*, 2017) Esto, ha provocado un alza en la demanda de alimentos y/o productos frescos mínimamente tratados, además, de provocar el interés del uso de antimicrobianos de origen vegetal (derivados vegetales) (Rodríguez, 2011).

Es por ello, que es necesario conocer profundamente las características y propiedades de los alimentos, para emplear adecuadamente el tratamiento o método de conservación (Aguilar, 2012).

3.1.4. Técnicas de conservación

Para la aplicación de un método de conservación es importante considerar que este garantice la máxima capacidad de prolongar la vida útil del alimento. Esto es, que el alimento sufra en la menor medida posible cambios en su características organolépticas y nutricionales, pudiendo así, ofrecer un alimento de calidad (Aguilar, 2012).

De acuerdo a Zambrano (2015), la composición de los alimentos y los cambios que estos ejercen sobre estos, los métodos de conservación pueden clasificarse de diferentes formas:

- a) Sistemas que destruyen o inactivan los gérmenes, estos son conocidos como bactericidas, entre las técnicas que aquí encontramos son: la pasteurización, la esterilización, la radiación, las altas presiones, etc.
- b) Sistemas que impiden la proliferación y/o crecimiento de gérmenes en el alimento, estos son conocidos como bacteriostáticos, entre los que encontramos: la congelación, la deshidratación, el ahumado, la adición de sustancias químicas o naturales, etc.
- c) Sistemas que impide la recontaminación del alimento: el empacado, el procesado aséptico, el almacenamiento higiénico, para ello resulta necesario implementar los sistemas de calidad y las buenas prácticas de manufactura.

A continuación, se presenta una clasificación universal de los métodos y técnicas en la conservación de los alimentos.

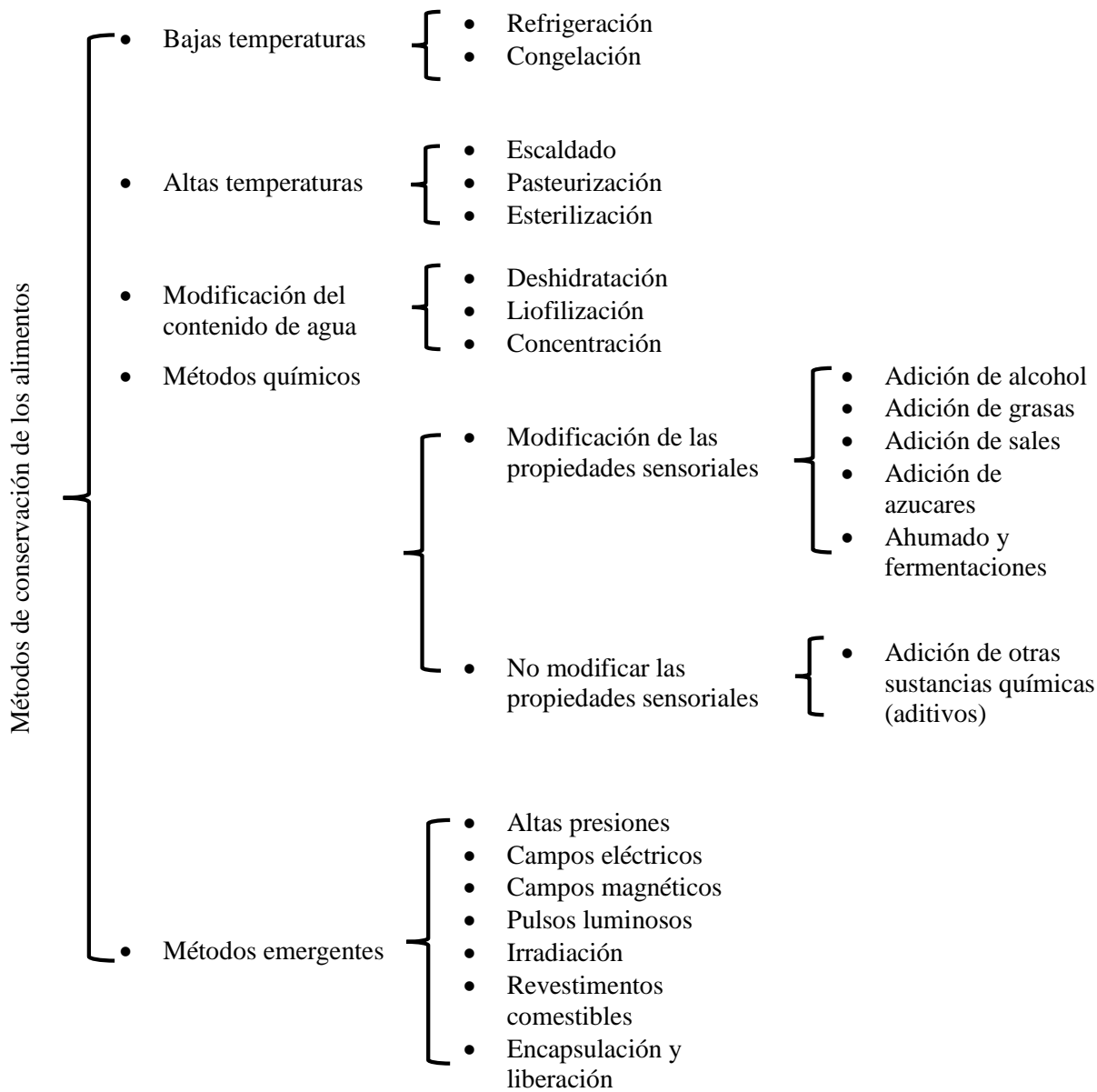


Figura 2. Clasificación universal de los métodos de conservación de los alimentos.

Fuente: Aguilar, 2012.

La aplicación de temperaturas en la conservación de los alimentos permite prolongar la vida útil de los alimentos, pero en el caso de las bajas temperaturas, no elimina la posibilidad de que se desarrollen después de que estos sean descongelados, mientras que, para el caso de altas

temperaturas, estas permiten la eliminación de los gérmenes, pero también termina con los nutrientes de los alimentos (Aguilar, 2012).

Por otro lado, dentro de los métodos químicos, la adición de sustancias químicas es una de las técnicas que, además de prologar la vida útil del alimento, preserva sus características organolépticas y/o sensoriales (Guzmán, 2009). Pero cabe señalar, que las condiciones de uso están estrictamente reglamentadas en todos los países del mundo (Codex Alimentarius).

3.1.5. Conservadores químicos

Uno de los métodos de conservación más utilizados actualmente dentro de la industria alimentaria, es el uso de sustancias químicas o conservadores químicos, los cuales a lo largo de la historia han tenido gran relevancia en la conservación de los alimentos, ya que estos no generan cambios en sus propiedades organolépticas (Guzmán, 2009). Sin embargo, a pesar de los beneficios que estas sustancias ofrecen, en la actualidad, existe controversia entre los consumidores sobre la seguridad que estas sustancias representan para la salud. Por esta razón, gran parte de la población ha clasificado a los alimentos como buenos (aquellos que se consideran naturales) y malos o artificiales (alimentos procesados que contienen aditivos) (Baena et al., 2001). Es así que, esta creencia ha provocado una mayor demanda en el consumo de alimentos naturales o mínimamente tratados, quienes presentan buen aspecto y se conservan durante más tiempo (Aguilar, 2012).

3.1.6. Agentes antimicrobianos naturales

Cada día, se introducen en el mercado nuevos productos que responden a la necesidad de prolongar la vida útil y que aseguran que los alimentos estén libres de microorganismos y de

agentes patógenos (Holdsworth, 1988). Hoy día, los conservadores de mayor empleo son los sorbatos, nitritos, nitratos y sulfatos. Pero es importante señalar que el uso de estas sustancias ha sido criticado, ya que al ser sometidas a temperaturas de cocción liberan sustancias que son consideradas como cancerígenas (Pérez, 2018). Es así, que en la actualidad se han enfocado investigaciones para afirmar el peligro en el empleo de estas sustancias. Pero, además, los investigadores se han encaminado en la búsqueda de nuevas alternativas que cumplan con la demanda de los consumidores y que, además, sustituyan el uso de los conservadores sintéticos. Tomando en cuenta lo anterior, gracias a estas investigaciones, los antimicrobianos naturales se presentan como una nueva generación de aditivos, los cuales son ya considerados por la Food and Drug Administration (FDA) como Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAs). Por esta razón, ha generado un interés a nivel mundial por estudiar las diversas propiedades de diferentes especies vegetales (Rodríguez, 2010).

Los principales compuestos antimicrobianos encontrados en plantas, hierbas y especias son compuestos fenólicos, alifáticos, acetonas, aldehídos, ácidos e isoflavonoides, denominados metabolitos secundarios (UNIGRARIA, 2018). La acción antimicrobiana de estos ácidos orgánicos parece estar relacionado con el mantenimiento del equilibrio ácido-base, la donación de protones y la producción de energía de la célula. Por otra parte, los aceites esenciales en su composición poseen componentes como eugenol, oleorresinas y aldehído cinámico con poder antimicrobiano. Hoy en día se han reportado un gran número de hierbas con poder antimicrobiano, sin embargo, es necesario una alta concentración para su función, lo cual en su mayoría ha repercutido como un efecto negativo en cuanto al cambio de sabor del alimento y en algunas ocasiones el color (Rodríguez, 2010).

3.1.6.1. Situación actual de los agentes antimicrobianos naturales

Los agentes antimicrobianos de origen natural, obtenidos a partir de microorganismos (Compuestos producidos por microorganismos), animales (proteínas, enzimas líticas tales como lizosima, hidrolasas; proteasas y lipasas), plantas (compuestos fenólicos, provenientes de tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas), han tenido un gran impacto en la industria de los alimentos, pues estos, responden a la necesidad de prolongar su vida útil de forma segura y natural, acorde a la ascendente demanda de los consumidores (Guzmán, 2009). En la actualidad, existen diversos reportes sobre la actividad antimicrobiana de estas sustancias en los alimentos, aisladas principalmente de hierbas y plantas. En la tabla 1, se muestran algunos de los componentes antimicrobianos identificados de origen vegetal.

Tabla 1.
Componentes antimicrobianos de origen vegetal.

Nombre común de la planta	Nombre científico de la planta	Componente
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalool E-2-decanal
Canela	<i>Cinnamomun zaylandicum</i>	Trans-cinnalmadehído
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol Timol Terpineno
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Cymeno Pimeno Acetato de bornil Canfor 1, 8 cineolo
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Acetato de eugenil Timol Carvacrol Terpineno Cimeno

Fuente: García, 2008.

El empleo de los antimicrobianos naturales, depende en gran medida, en la actitud que los consumidores muestren frente a los conservadores químicos y de las investigaciones realizadas para determinar su capacidad antimicrobiana y sobre todo que sean inocuos, por ello, es necesario estudios toxicológicos rigurosos (Rodríguez, 2011), hasta ahora, han sido pocos los casos de aplicación.

3.2. Pepicha (*Porophillum tagetoides*)

Es una planta originaria de México, conocida con diferentes nombres dependiendo de la zona y región de producción. En los Estados de Guerrero y Oaxaca se conoce como chepicha o chepiche, escobeta, pápalo, pápalo chepicha o pápalo peipicha, pipicha y tepicha, mientras que en Puebla y Tlaxcala como pipitza pipizca o pipitzca. Esta planta se encuentra distribuida en los estados de Durango, México, Hidalgo, Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Puebla. Este último, según datos de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2005), es el único estado en el que se siembra para su comercialización, con una producción estimada de 96 toneladas anuales, generando un valor de producción de \$228,600.00.

La pepicha es una planta comestible, por su sabor y aroma intenso, es utilizada principalmente para condimentar comida típica mexicana como caldos, sopas, guisados, quesadillas, ensaladas, salsa de aguacate, carne de puerco, pescado y memelitas. Aunque, en algunos lugares de México, es considerada como maleza para diferentes cultivos y en algunos otros, es utilizada para combatir la erosión del suelo, su uso en la alimentación del ganado es casi nulo (SIAP, 2019). Esta planta se utiliza en medicina tradicional en forma de infusión administrada por vía

oral, para la desinflamación de los riñones cuando se presentan síntomas del mal de orín, (Guzmán, 2009), la actividad antiinflamatoria de la pepicha fue demostrado por Casas-García et al. (2000); a través de modelos de inflamación aguda en ratas Wistar, en las que no observaron formación de edemas.

Dos tipos de actividad biológica en plantas, la antioxidante y la antimicrobiana han cobrado gran interés de estudio, debido a la relación que existe entre ellas, los compuestos antioxidantes pueden afectar reacciones del metabolismo de los microorganismos, provocando su inestabilidad y muerte. Una característica de hierbas y especias empleadas en la preparación de alimentos, como agentes saborizantes, es que contienen en sus aceites esenciales terpenoides y compuestos fenólicos (eugenol, citral, pineno, timol, ácido cinámico y carvacrol) que presentan actividad antimicrobiana (Jiménez *et al.*, 2012).

Porophyllum tagetoides, ha sido reportado tener potencial uso en la industria alimentaria como un agente antimicrobiano y/o antioxidante. En un estudio realizado por Jiménez *et al.*, (2012) indican que extractos de pepicha son capaces de inhibir crecimiento de bacterias y levaduras; además recomiendan el consumo de pepicha en la dieta diaria para mejorar la salud y sugieren el uso de extractos y emulsión, como antimicrobianos y/o antioxidantes naturales.

3.3. Leche de cabra

La aceptación creciente de quesos de cabra artesanal ha incrementado la actividad caprina, dirigiendo no solo a la producción de carne, sino a la producción de leche. La cabra es un animal originario de Asia, sin embargo, en la actualidad se puede encontrar en casi todo el mundo, ya

que es un animal capaz de vivir en zonas que resultaría difícil para otras especies (López, 1996). La leche de cabra es color blanco mate, debido a que contiene a-caroteno y presenta un olor neutro reciente a la ordeña junto con un sabor dulce característico de la misma, mientras que su viscosidad es más baja en comparación con la leche de vaca (Flores *et al.*, 2009).

3.3.1. Valor nutritivo

La leche de cabra y sus derivados son alimentos que han llamado la atención a nivel mundial, puesto que ofrecen alimentos con un alto valor nutricional. En comparación con la leche de vaca presenta un menor contenido de caseínas y un mayor contenido de ácidos grasos de cadena corta como el butírico, caproico, cáprico y caprílico lo cual le confiere un sabor diferente, la hacen más digerible al ser humano y sobre todo para la dieta de los bebés (Chacón, 2007). Cabe señalar, que después de la leche materna, la leche de cabra posee los más altos valores nutricionales y terapéuticos: los beneficios terapéuticos se reconocen desde los inicios de la civilización al aliviar los malestares gastrointestinales (Flores *et al.*, 2009). Los minerales, son otra de las propiedades relevantes que caracterizan esta leche, entre las que destaca: el sodio, magnesio, potasio, calcio, fósforo y cloro. Estos últimos cuatro se encuentran en mayor proporción que en la leche de vaca.

Tabla 2
Composición de la leche de cabra en comparación con la leche de vaca y materna.

Elemento	Materna	Vaca	Cabra
Proteína g	1.1	3.4	4.3
Grasa g	4.2	3.3	5.4
Lactosa g	7.1	4.6	4.2
Minerales g	0.21	0.72	0.77
Vit A I.U.	190	158	191
Vit D I.U.	1.4	2.0	2.3
Tiamina	0.02	0.04	0.05
Riboflavin mg	0.04	0.18	0.12
Biotina mcg	0.4	2.0	1.5

Fuente: Flores *et al.*, 2009.

3.3.2. Queso de cabra

Uno de los primeros alimentos que se elaboró a partir de que el hombre se convirtiera en sedentario (sus años datan del año 7000 a.C.). El queso de cabra es considerado como el ancestro de todos los quesos, siendo de gran importancia en la edad media, dónde se convirtió en moneda de pago de otros alimentos (Galán, 2015). En los últimos años, la elaboración de quesos, a partir de la leche de cabra ha ido en aumento, proceso que ha adquirido a escala artesanal gran importancia regional (Flores *et al.*, 2009). Cabe mencionar que el consumo de queso de cabra en México es marginal, pues es apenas de 1kg per cápita. Sin considerar que al igual que la producción, el consumo solo se concentra en el norte del país, como Sonora, Durango, Coahuila y Nuevo León.

3.3.2.1. Proceso de elaboración del queso

De acuerdo a las Naciones Unidas de la alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) (2011), el queso se obtiene a partir de la coagulación de la leche y la deshidratación de la cuajada, la cual puede conservarse durante varios días. Es una fuente rica en grasas, proteínas, sales minerales y vitaminas. En la figura 3, se describe el proceso general de elaboración de queso, sabiendo que la variación va de acuerdo a la región y estilos de consumo, particularmente.

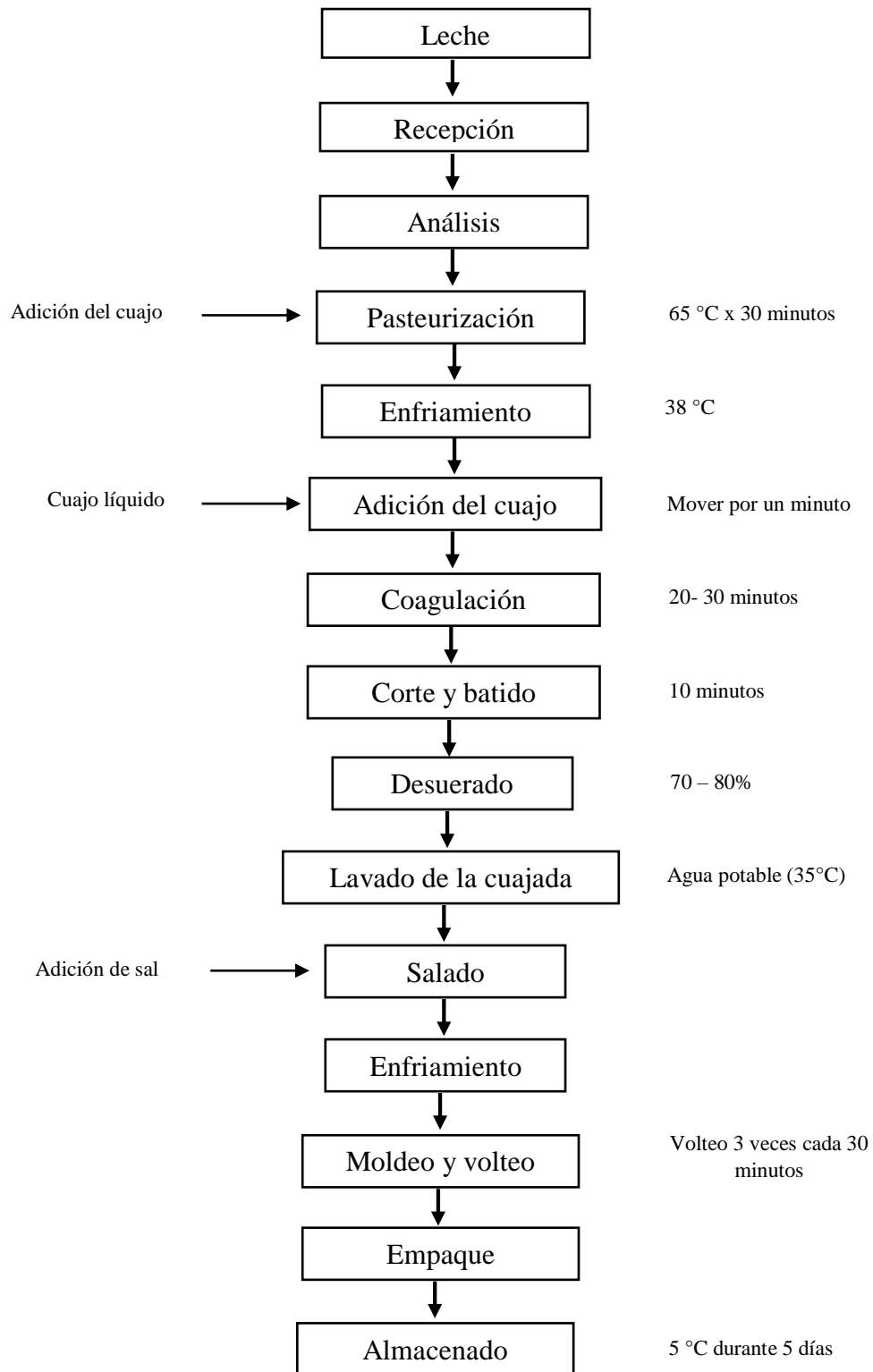


Figura 3. Diagrama de flujo de proceso para la elaboración del queso fresco

Fuente: FAO, 2011.

Tratamiento térmico: Se aplica con el objetivo de reducir o eliminar microorganismos productores de enfermedades alimentarias. Las temperaturas comprendidas en este proceso son de 65 a 68 °C durante 30 minutos, a este proceso se le conoce también como pasteurización.

Ajuste de temperatura: se desciende entre los 40 – 43 °C, siendo esta la óptima para la acidificación de las bacterias ácido lácticas.

Adición de bacterias ácido lácticas: se añaden con el objetivo de ayudar a la formación del coagulo en la adición del cuajo, permitiendo un mayor desuerado y así, obtener una masa más compacta. Además, de impedir e inhibir la proliferación de microorganismos patógenos causantes de alteraciones. estas son las responsables del sabor y la textura del queso.

Reposo: Es necesario para que las bacterias formen el ácido láctico, a partir de la lactosa, azúcar de la leche. El reposo es alrededor de unos 45 minutos.

Adición de materias complementarias: Esta etapa es ideal para añadir cloruro de calcio, sal, etc. y agregar algunas hierbas (ají, pimienta, orégano, etc.).

Adición del cuajo: La temperatura ideal para la adición de cuajo es de 36°C, la cantidad por lo general es de 2g en 10 litros de leche.

Reposo: Tiempo en que necesario (aproximadamente 45 minutos) en el que la leche se deja en reposo, cuidando de no mover el recipiente ni mezclar, esto, debido, al inicio de la formación de la cuajada.

Corte de la cuajada: Esta operación se realiza con el objetivo de producir el desuerado; esto se logra cortando la cuajada con liras queseras o con un cuchillo (los cortes deben ser iguales, de aproximadamente 2.5 x 2.5 cm) haciendo movimiento verticales, horizontales y transversales. En seguida se deja reposar durante 5 minutos (para permitir la salida del suero). Posteriormente,

se aplican ligeros movimientos y presión sobre la cuajada (trabajo de grano) con el fin de permitir una mayor separación del suero con la cuajada.

Desuerado: Se retira el suero del recipiente, cuidando no desechar la cuajada. Esto se puede lograr con ayuda de un colador o manta de cielo.

Moldeo: consiste en colocar la cuajada en los moldes queseros, a los cuales, posteriormente, son sometidos a presión (estos son invertidos cada 30 a 40 minutos para lograr uniformidad).

Almacenado: los quesos son desmoldados, después de cumplir 24 horas y, enseguida son almacenados a 15 °C.

3.3.2.2. Microbiología de los quesos

La producción de queso fresco en México, con respecto a las pequeñas y medianas empresas, es variable y se encuentra en un punto crítico en cuestiones de higiene, considerando la poca o nula verificación de la materia prima (leche), los procesos de producción no tecnificados, transporte inadecuado, así como deficiencias al momento de su expendio (Palacios, 2006). Derivado esto, se puede decir que los quesos elaborados artesanalmente, poseen gran variedad de microorganismos que afectan la vida de anaquel del producto, así como a la del consumidor (González *et al.*, 2015).

El queso elaborado artesanalmente, es uno de los productos lácteos que resulta altamente favorable para la proliferación de microorganismos, ya que en muchas ocasiones es elaborado a partir de leche cruda sin pasteurizar, añadiendo a eso, una falta de control de calidad dentro de los procesos, teniendo como resultado, un vehículo potencial en la transmisión de enfermedades para los consumidores (Lanchipa, 2003).

La vida útil de los quesos se ve afectada por factores ambientales como fisicoquímicos, atmosferas modificadas, los métodos y tecnologías empleadas en su elaboración, además de los compuestos que se le añaden con el propósito de prolongar su vida útil, pero siendo la causa principal la materia prima de la que procede (Aguirre, 2015). La microbiología de los quesos resulta ser una parte importante en su caracterización y puede servir como un parámetro para indicar la calidad higiénico-sanitaria (Palacios, 2006).

3.3.2.3. Patógenos en el queso

La leche puede ser contaminada por un gran número de microorganismos patógenos, provenientes de las ubres de vacas enfermas; por mastitis, así como por estiércol, utillaje, personal, aire o polvo, etc. Entre los principales patógenos se encuentra *Staphylococcus aureus*, *Strptococcus spp*, *Salmonella spp*, *Echerichia Coli*, *Campylobacter spp*, *Yersinia Enterocolitica*, *Bacillus Cereus*, *Clostridium Perfringes* y en algunos países *Brucella spp* y *Mycobacterium tuberculosis*. Todos ellos, a excepción de los *esporulados* y *entrococcus*, son destruidos por medio de la pasteurización (Palacios, 2006).

Tabla 3
Características de los microorganismos presentes en la leche y queso.

Microorganismo	Características
Coliformes fecales	Bacterias gram-negativas que tiene forma de bacilo. No sobreviven a la pasteurización, es por ello, que son utilizados como indicadores. Fermentadoras de lactosa, lo que produce en el queso hinchazón y desencadena malos olores.
Bacterias esporuladas	Asociadas a la producción de gas, relacionada al número de bacterias, el pH del queso y la actividad de agua. El control de este defecto se logra adicionando algunas sustancias conservadoras, como nitritos, prohibido en algunos países.

Mohos y levaduras	Su presencia en el queso es muy común debido a su crecimiento a muy bajos valores de pH. A estos microorganismos se le asocia la maduración del queso, teniendo como resultado un mejoramiento en el flavor y textura. Aunque también son asociadas a la generación de olores y sabores no deseados.
Psicrótofos bacilos gram-negativos	Están presentes en la leche cruda y no resisten al proceso de pasteurización. Son aerobias estrictas y son causantes de alteraciones en los quesos frescos como el cottage y otros quesos frescos en su superficie.
Bacterias ácido lácticas	Responsables de la producción del ácido láctico en el proceso de elaboración del queso. Asociados a la producción de compuestos sápidos y aromáticos, los cuales participan en las reacciones de lipólisis y proteólisis durante la maduración.

Fuente: Palacios, 2006.

Tanto la leche como sus derivados, son productos altamente susceptibles a la proliferación de microorganismos patógenos causantes de enfermedades al organismo. Por ello, resulta necesario implementar las medidas de higiene necesarias para contrarrestar el riesgo de contaminación de la materia prima (leche) y, por ende, obtener un producto de calidad, que no dañe la salud del consumidor.

3.4. Técnicas moleculares para la detección de patógenos en alimentos.

Actualmente, los métodos microbiológicos clásicos, para la detección de patógenos en los alimentos, implican ser muy laboriosos y los resultados pueden llegar a demorar semanas, sumado a eso, presentan baja fidelidad (Huertas *et al.*, 2018). A partir de 1980 se produjeron las primeras técnicas para la detección de patógenos en alimentos basadas en ácidos nucleicos, siendo la hibridación de ADN-ADN, análisis de secuencias del ADNr 16s, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o ribotipificación (Palomillo *et al.*, 2014).

El descubrimiento de la PCR, la clonación molecular, la secuenciación y la tecnología de detección por fluorescencia, así como la accesibilidad de información en base de datos ha ayudado al desarrollo de nuevas herramientas moleculares. Tales herramientas ofrecen una alta sensibilidad y especificidad en períodos cortos de procesamiento. Por otro lado, la ejecución de estos métodos representa un alto costo y resulta difícil el acceso de todos los laboratorios de análisis de alimentos (Huerta *et al.*, 2018).

Entre las técnicas utilizadas con mayor frecuencia para la detección de patógenos encontramos: PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real), microarrays, biosensores, secuenciación de ácidos nucleicos de alto rendimiento (pirosecuenciación) y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Palomino *et al.*, 2016).

3.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para la detección de ácidos nucleicos. Es una técnica que presenta una alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, lo que permite obtener resultados en poco tiempo y fáciles de analizar (Tamay *et al.*, 2013). Esta reacción enzimática, da lugar a la amplificación de millones de veces a una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos (Pedrosa, 1999). Los ciclos de la PCR constan de tres pasos:

- 1) Desnaturalización: las cadenas de ADN son separan en dos hebras debido al aumento de la temperatura durante la reacción (92-98°C) durante un tiempo de 30 a 90 segundos.
- 2) Alineamiento: consiste en el apareamiento de los oligonucleótidos los cuales reconocen sus respectivas zonas para formar enlaces de hidrogeno con la muestra de ADN, esto se lleva acabo a una temperatura de 50-60°C durante 30 a 60 segundos.

3) Extensión: la taq polimerasa origina nuevas cadenas complementarias, agregando dNTP's, a las dos cadenas sencillas de ADN desnaturalizadas al inicio de la reacción.

Esta función se realiza a una temperatura de 70-74°C durante 30-90 segundos.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, ha revolucionado el avance del conocimiento científico, ofreciendo una alternativa para el estudio de los ácidos nucleicos y su aplicación en áreas de la biología, la medicina, la criminalística, la paleontología, etc (Palomino *et al.*, 2016).

3.4.2. Identificación microbiológica usando el gen 16s ribosomal

Las bacterias se pueden clasificar utilizando métodos de microbiología convencionales, como la microscopía, el crecimiento en medios específicos, las pruebas bioquímicas y serológicas y los ensayos de sensibilidad a los antibióticos. En las últimas décadas, los métodos de microbiología molecular han revolucionado la identificación bacteriana.

Un método popular es la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S (ARNr). Este método no sólo es más rápido y preciso que los métodos convencionales, sino que también permite la identificación de cepas que son difíciles de cultivar en condiciones de laboratorio. Además, la diferenciación de las cepas a nivel molecular permite la discriminación entre bacterias fenotípicamente idénticas (Arena & Chappa, 2017).

El ARNr 16S se une a un complejo de 19 proteínas para formar una subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Arena & Chappa, 2017). Está codificado por el gen 16S rRNA, que está presente y altamente conservado en todas las bacterias debido a su función; sin embargo, también contiene regiones variables que pueden servir para la identificación de determinadas especies (Figura 4).

La secuenciación del gen rRNA 16S se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de la secuenciación del ADN ya sea de manera directa o bien haciendo bibliotecas de clonas recombinantes. Existen diez regiones conservadas que flanquean las nueve regiones variables (VI – V9). Las posiciones corresponden a la secuencia del rRNA16S de *E. coli*. Número de acceso J01859.

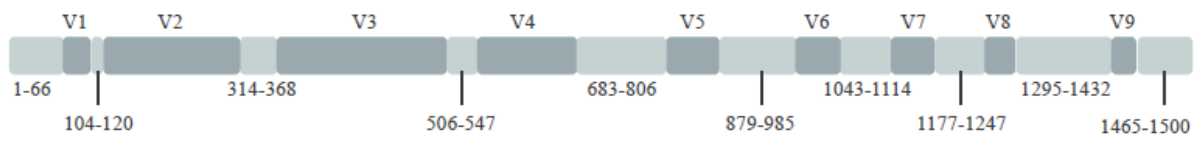


Figura 4. Representación esquemática del gen de RNA ribosomal 16S.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención del extracto etanólico.

El extracto etanólico se obtuvo a partir de muestras de pepicha fresca procedente de cultivos familiares de la comunidad de Amatitlán de Azueta, del municipio de Acatlán de Osorio. La extracción se realizó en el laboratorio de Farmacobiología de la Universidad de la Cañada (UNCA), ubicada en Carretera Teotitlán - San Antonio Nanahuatipán Km 1.7 s/n de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, utilizando la técnica de maceración asistida por ultrasonido.

La técnica consistió en pesar y troceado de la muestra vegetal previamente lavado y enjuagado, después fue colocada en frascos de vidrio con etanol, a una relación de 1:4 (120 g de muestra / 480 ml de etanol). En seguida, se colocó dentro del sonicador (Marca BRANSON 5510) durante 1 hora. Posteriormente, la solución resultante de la maceración fue filtrado y depositado en un cristizador, para luego ser colocado en una parrilla eléctrica (Marca ICA C-MAG HS 10) a 45°C dentro de una campana de extracción (Marca SEFA) hasta la completa evaporación del etanol. Finalmente, con una espátula, el extracto fue depositado en frascos cubiertos con aluminio y almacenados en ausencia de luz a 25°C para su posterior uso.

Para la obtención de extractos en polvo, se utilizó el método de liofilización, para ello, se colocaron 5 gr de extracto etanólico de pepicha fresca dentro de pequeños frascos de 10 ml, sellados con papel parafilm. Después, fueron colocados dentro del liofilizador (marca: LABCONCO), a -64°C durante 24 horas. Finalmente, las muestras fueron molidas en un mortero y almacenadas en tubos Corning™ Falcon™ de 50 ml, previamente cubiertos con aluminio para evitar el contacto con la luz.

4.2. Diseño experimental

Para estimar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de pipicha fresca deshidratada sobre la calidad sensorial y microbiológica de quesos de cabra artesanal, se utilizó un diseño experimental unifactorial con cinco niveles, que consistió en evaluar 4 concentraciones de extracto en polvo de pipicha fresca deshidratada y sin extracto (Tabla 4). Para cada tratamiento, se elaboraron tres quesos que fueron utilizados para la caracterización molecular al día 1 (día de elaboración), 15 y 30 después de su elaboración. A cada uno de los tratamientos se le aplicó un ligero masaje para homogenizar correctamente la cuajada con el extracto.

Tabla 4
Esquema del diseño experimental.

Tratamiento	Descripción
Tratamiento 1	Sin extracto
Tratamiento 2	0.2g/kg de cuajada
Tratamiento 3	0.4g/kg de cuajada
Tratamiento 4	0.6g/kg de cuajada
Tratamiento 5	0.8g/kg de cuajada

4.3. Elaboración de quesos de cabra artesanal

4.3.1. Recolección de la leche de cabra

Leche de cabra para la elaboración de queso artesanal, se obtuvo de la ordeña de 130 cabras entre razas Alpinas y Nubians; del Ejido Las Trancas, ubicado en el municipio de Cadereyta, del Estado de Nuevo León, siendo el propósito principal de éste hato, la producción de cabrito bajo

un sistema extensivo, quedando como una actividad secundaria la producción de quesos que deriva del aprovechamiento del periodo de lactancia de las cabras.

La ordeña se realizó en un horario de 4 a 6 de la mañana, hora en que las cabras presentan un mayor rendimiento de leche. Para la ordeña, la cabra fue sujeta de los cuernos y atada de las patas delanteras para evitar que esta se mueva. Enseguida, con un trapo limpio y húmedo se limpian las ubres y pezones, se aplicó un ligero masajeo para estimular al animal y así obtener mayor producción de leche. Un promedio de 65 litros fue recolectado y depositado en recipiente de plástico de 20 L previamente desinfectado, hasta su procesamiento. Inmediatamente después de la ordeña, se elaboraron quesos de cabra artesanal, siguiendo el procedimiento tradicional de los productores.

4.3.2. Elaboración del queso de cabra artesanal.

Inmediatamente después de la ordeña, se elaboraron quesos de cabra artesanal, siguiendo el procedimiento tradicional de los productores. La leche fue colocada en una olla de acero inoxidable y sometida a pasteurización lenta, por 30 min a 65 °C (el tiempo se tomó una vez que se alcanzó la temperatura). Posteriormente, se añadió 6.5 gr de Cloruro de Calcio, considerando la relación de 10 g CaCl_2 /100 L de leche. Enseguida, se colocó la tapa a la olla y se dejó reposar hasta alcanzar una temperatura de 40 ± 2 °C, justo en esta temperatura, se agregó 6.5 ml de cuajo comercial marca Qualac bajo la relación de 1ml/10L y se dejó reposar por 1 hora. Transcurrido el tiempo, con ayuda de un cuchillo se cortó la cuajada en dimensiones de 2cm x 2cm aproximadamente, y enseguida, con una pala quesera se procedió a realizar trabajo de grano durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó el desuerado (retirando aproximadamente el 90% del suero, dejando el resto como vehículo para una buena homogenización de la cuajada con la sal). Se agregaron 580g de sal de acuerdo a la relación de 77.33 g de sal/Kg de cuajada, y

enseguida, se aplicó un masajeo para homogenizarla con la cuajada y se determinó el peso total de la cuajada utilizando una báscula comercial.

Enseguida, se llevó a cabo la formación de los quesos, para ello, se tomaron porciones de la pasta resultante de la cuajada, se colocaron en moldes queseros de acero inoxidable, sobre los cuales se ejerció presión 4kg/cm para darle la forma al queso. Luego, fueron llevados a refrigeración (4°C) durante 24h. Finalmente, fueron desmoldados, embolsados (rotulados con la fecha de elaboración y concentración del extracto) y almacenados a 8°C hasta su evaluación microbiológica. En la figura 5, se muestra el diagrama de flujo de proceso de la elaboración del queso de cabra, que representa la forma original en que se elabora el queso de cabra en la región de Cadereyta, Nuevo León.

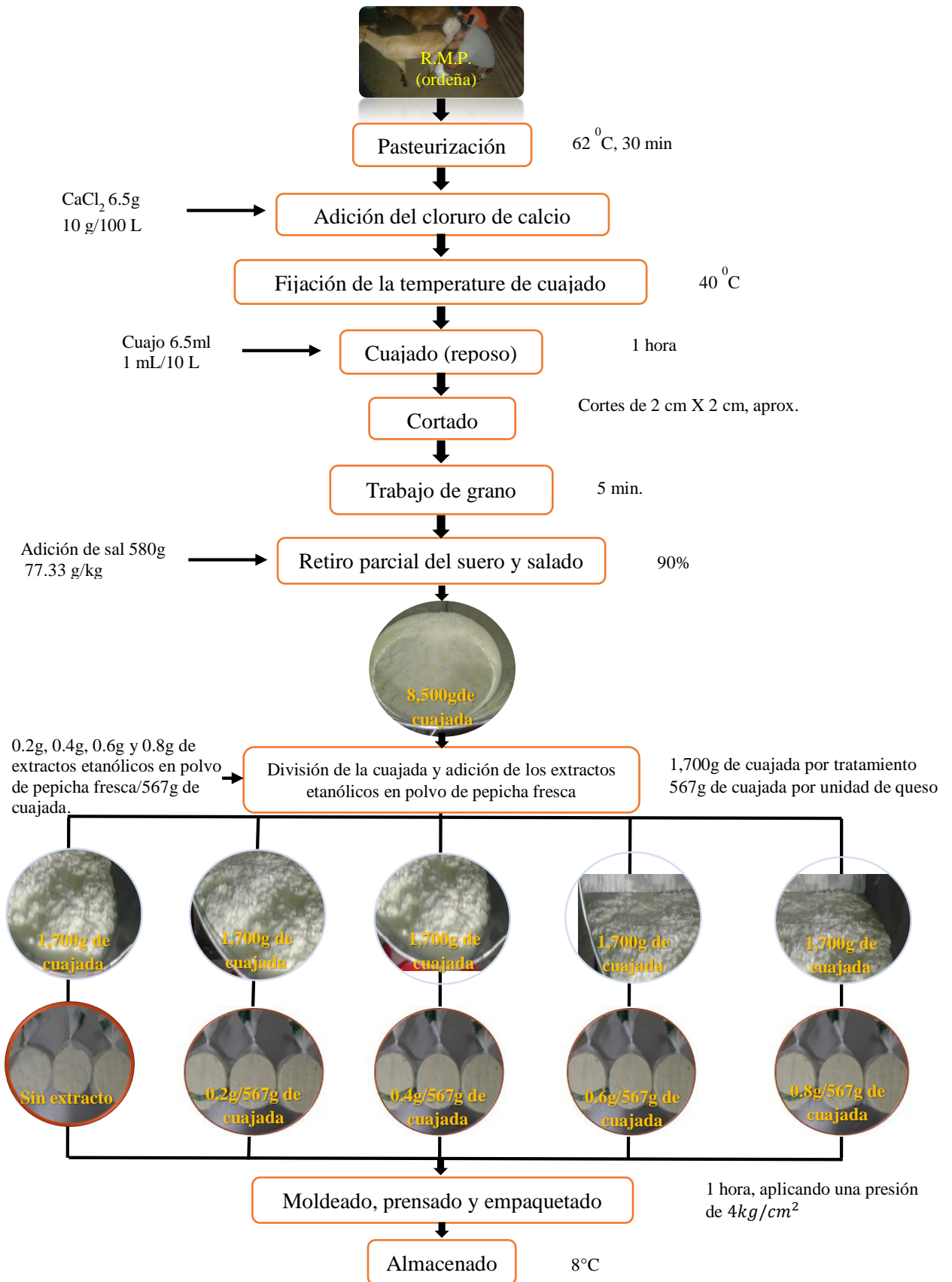


Figura 5. Diagrama de flujo de proceso de la elaboración del queso artesanal de cabra.

4.4. Evaluación sensorial

Para estimar el efecto de la concentración de extracto etanólico de pipicha fresca deshidratada sobre la calidad sensorial del queso día 1 (día de elaboración del queso), se realizó una evaluación sensorial mediante una prueba de ordenamiento y triangular. La evaluación se realizó con panelistas no entrenados del Centro de Biotecnología Genómica-IPN (CBG-IPN). La prueba sensorial para los quesos del día 15 no fue posible, debido a que no se cumplió con el número de panelistas. Mientras que, los quesos del día 30 presentaron características organolépticas no aptas para su consumo.

Prueba de ordenamiento

A 20 panelistas no entrenados del personal del CBG-IPN, se les proporcionó porciones de quesos de 1 día (día de elaboración), codificados previamente con las letras A=0.2, B=0.4, C=0.6 y D=0.8 g de extracto etanólico de pipicha fresca deshidratada. Posteriormente, se les pidió que degustaran cada una de las muestras y registraran en las papeletas (Anexo 1) de acuerdo a su preferencia, colocando en la posición número 1, la muestra que más le gustó, así sucesivamente hasta la muestra que le gustó menos, colocándolo en la posición número 4.

Prueba triangular

Para esta prueba, se tomó la muestra de queso que presentó mayor preferencia en la prueba de ordenamiento. A los 14 panelistas no entrenados del personal del CBG-IPN, se les proporcionó dos porciones de queso de mayor preferencia y una porción del queso control, codificadas como, 123 y 635 para las de mayor preferencia y 088 para la muestra control. Se les pidió degustar y que registraran en la papeleta (Anexo 2), con una X la muestra que para ellos presentara un sabor diferente. En ambas pruebas, se aplicó como borrador porciones de manzana Golden Delicious.

4.5. Caracterización molecular

La caracterización molecular se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Animal, del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN). Ubicado en Boulevard del Maestro s/n esq. con Elías Piña, colonia Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas.

4.5.1. Extracción de ADN en muestras de queso

La extracción de ADN se realizó con muestras de queso de los tres periodos de almacenamiento (1, 15 y 30 días), siguiendo el procedimiento modificado por el laboratorio de Biotecnología Animal basándose en la metodología propuesta por *Monett et al.* 2006, como se describe a continuación:

Una fracción de la corteza de cada queso por tratamiento fue tomada y molida con pistilo en un vaso de precipitado de 100 ml, de la fracción molida se tomó 2.5 g y se colocó en tubos falcon de 15 ml y se adicionó 2.5 ml de tiocinato de guanidina ($C_2H_6N_4S$) y 300ul de N-lauril sarcosina ($C_{15}H_{28}NNaO_3$) y se prosiguió a homogenizar con ayuda de un pistilo.

Posteriormente, se tomó una alícuota de 175 μ l (incluyendo partículas de queso) y se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml que contenía 10 perlas de vidrio (de diámetro 0,1 mm), 20 μ l de proteinasa K y 50 μ l de SDS ($NaC_{12}H_{25}SO_4$) y se dejó incubar en un termomixer (Eppendorf thermoMixer) a 55°C por 2 h. Al término, a cada muestra se le agregó 250 μ l de Buffer de fosfatos (PBS), 150 μ l de Buffer TE y 250 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Enseguida, se colocaron en hielo por 5 minutos y transcurrido el tiempo, se agitaron en Vortex durante 45 a 50 s (este paso se repitió dos veces más). La mezcla resultante se transfirió a un nuevo tubo falcon de 15 ml al que se le adicionó 500 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y enseguida se sometió a centrifugación a 3,000 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, se le añadió 750 μ l de

fenol-cloroformo-álcool isoamílico y nuevamente se llevó a centrifugar a 3,000rpm por 3 minutos (este paso se repitió una vez más). Al término, se le agregó 750 µl de cloroformo (CHCl₃) y se sometió a centrifugar a las mismas condiciones anteriores. A continuación, en un tubo de 2ml se recuperó la fase acuosa y enseguida se le añadió 2.5 µl de RNasa mezclando suavemente, posteriormente se llevó a incubar a 37°C durante media hora. Transcurrido el tiempo, se le añadió 50 µl de acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) y 1 ml de etanol al 100%, y se dejó incubar a -20°C durante toda la noche.

Para recuperar el ADN las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 14,000 rpm y se descartó el sobrenadante por decantación. Posteriormente, la pastilla se lavó añadiendo 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos, se descartó el sobrenadante por pipeteo. Este paso se repitió dos veces más. La pastilla resultante se secó en el equipo Concentrador Centrivac a una temperatura de 45 °C por 35 minutos. Finalmente, el ADN fue rehidratada con 25 y 50 µl de H₂O Mili Q dependiendo de la cantidad de la pastilla, con la finalidad de lograr una mayor concentración de ADN. Las muestras de ADN fueron almacenadas en refrigeración a 4° C, hasta su procesamiento.

4.5.2.1. Cuantificación de ADN

Las muestras obtenidas de ADN fueron observadas en gel de agarosa al 1.5 % (p/v) en solución Buffer TBE 0.5X, utilizando como estándar de referencia, concentración conocida del bacteriófago lambda 50 ng/µl. Se tomaron 2 µl de ADN de cada una de las muestras y mezclando con 3 µl de Sybr gold (SYBR®GOLD Nucleic Acid Gel Stain, Augene, OR, USA). El volumen total de la mezcla fue depositado en los carriles del gel respectivamente. Las muestras se separaron por electroforesis aplicando un voltaje entre 80 a 110 durante 30 minutos. El ADN fue visualizado en el fotodocumentador (Kodak Digital Science) mediante el programa Gel-Imagen

de Kodak Digital Science. La cuantificación del ADN se realizó en el NanoDrop, para ello se calibró, colocando 1 µl de Agua estéril Mili Q. y se ejecutó el programa, posteriormente; se colocó 1 µl de cada muestra, se ejecutó el programa y se registraron directamente los valores como concentración de ADN en unidades de ng.

4.5.2.2. Dilución del ADN

El ADN obtenido se llevó a una concentración de 10 ng/ µl, tomando como referencia los valores arrojados por el Software NanoDrop, para ello se aplicó la siguiente formula:

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i}$$

Donde:

C_i= Concentración inicial

C_f= Concentración final

V_i= Volumen inicial

V_f= Volumen final

4.5.2.3. Amplificación de ADN con el Gen 16s

La amplificación por PCR de las secuencias ribosomales de los aislados se realizó con la región 16S ribosomal. Las condiciones de PCR para la amplificación fueron las especificadas en el programa Touch Down, TD55 (95°C/5 minutos, 62°C/45s y 72°C/1.30 min; 30 ciclos), estandarizada por el laboratorio de Biotecnología Animal.

Tabla 5
Condiciones de reacción para la PCR de la región 16S.

Reactivo	µl por muestra
ADN	2.5 µl
Buffer 10X	3 µl
MgCl₂ 25mM	1.2 µl
dNTPs 10 mM	0.3 µl
F27 5µM	0.15 µl
R1494 5µM	0.15 µl
GoTaq 5U/5µl	0.3 µl
H₂O	7.4 µl
Total	15 µl

La amplificación se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) en solución Buffer TBE 0.5X (Tris-Borato EDTA), utilizando como marcador de peso molecular ladder DNA PROMEGA de 100pb. Se tomaron 2 µl de producto de PCR de cada una de las muestras y mezclando con 3 µl de Sybr gold (SYBR®GOLD Nucleic Acid Gel Stain, Augene, OR, USA). El volumen total de la mezcla fue depositado en los carriles del gel respectivamente. Las muestras se separaron por electroforesis aplicando un voltaje entre 80 a 110 durante 30 minutos. Finalmente, el ADN fue visualizado en el fotodocumentador (Kodak Digital Science) mediante el programa Gel-Imagen de Kodak Digital Science.

4.5.2.4. Clonación molecular (ligación y transformación)

Ligación

Para la obtención de clonas recombinantes portadoras del Gen 16s ribosomal, se mezcló los reactivos (Tabla 6) por pipeteo, posteriormente se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos y en seguida, se colocó en hielo para la reacción de transformación.

Tabla 6
Condiciones para la clonación.

Reactivo	µl por muestra
StrataClone Cloning Buffer	3 µl
StrataClone Vector Mix	1 µl
Producto de PCR	2 µl

Transformación

El tubo de reacción de ligación se centrifugó a 2000 rpm por 20 s, y por pipeteo se colocó 2 µl en tubos que contenían células competentes de *E. coli* previamente descongelados en hielo, se mezcló suavemente y en seguida se dejó incubar la reacción en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se sometió a un choque térmico a 42 °C en el termomixer (sin mezclar ni agitar), después del choque se dejó en hielo durante 2 minutos. En seguida, se le añadió 250 µl de medio LB (Luria-Bertani) a temperatura ambiente y se dejaron incubar a 37°C a 225 rpm por 1h.

Posteriormente, a cada tubo de reacción de transformación, se le añadieron 50 µl de X-Gal (80mg/ml) y 20 µl de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) al 0.1 M y se mezcló suavemente. Acto seguido, se tomaron 80 µl de las células de transformación y fueron sembradas por barrido en placas que contenían Agar LB (100 mg/ml de ampicilina). Las placas fueron

invertidas y se llevaron a incubar a 37°C durante 18 h. Colonias que presentan tonalidad blanca indican que portan el inserto de interés.

4.5.2.5. Caracterización de recombinante: PCR

A) Extracción de ADN a partir de células

Para la extracción de ADN, se seleccionaron colonias que presentaron tonalidad blanca, y por pipeteo se tomaron estas colonias y se resuspendieron en 20 µl de H₂O mili Q estéril en tubos de PCR. Posteriormente, se transfirieron 10 µl de la suspensión anterior a nuevos tubos de PCR, rotulados previamente. A continuación, las muestras fueron colocadas dentro del termociclador bajo el PROGRAMA LISIS (96°C/5 minutos, 50°C/1.5 minutos, 96°C/1.5 minutos, 45°C/1.5 minutos, 96°C/1 minuto y 40°C/1 minuto).

B) Amplificación de colonias seleccionadas

Para la amplificación de fragmentos de ADN, las muestras se prepararon conforme a la tabla 7 en tubos eppendorf de 0.6 ml. Al finalizar la amplificación, a cada muestra se añadió 10 µl de la mezcla de PCR y nuevamente se llevaron al termociclador para su amplificación, utilizando el programa (TAM) de 30 ciclos con los siguientes parámetros: 94°C/1 minuto, 60°C/1 minuto y 72°C/1 minuto.

Tabla 7
Condiciones de amplificación.

Reactivo	µl por muestra
ADN	10 µl
Buffer 5X	4 µl
MgCl₂ Mm	1.2 µl
Iniciador 5' 5 µl	1.2 µl
Iniciador 3' 5 µl	1.2 µl
dNTPs 10 µl	0.4 µl
Taq 5U/ µl	0.125 µl
H₂O	1.875 µl
Vol. Final	20 l

C) Electroforesis de ADN amplificados.

La amplificación se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) en solución Buffer TBE 0.5X (Tris-Borato EDTA), utilizando como marcador de peso molecular ladder DNA PROMEGA de 100pb. Se tomaron 2 µl de producto de PCR de cada una de las muestras y mezclando con 3 µl de Sybr gold (SYBR®GOLD Nucleic Acid Gel Stain, Augene, OR, USA). El volumen total de la mezcla fue depositado en los carriles del gel respectivamente. Las muestras se separaron por electroforesis aplicando un voltaje entre 80 a 110 durante 30 minutos. Finalmente, el ADN fue visualizado en el fotodocumentador (Kodak Digital Science) mediante el programa Gel-Imagen de Kodak Digital Science.

4.5.2.6. Secuenciación

Purificación.

La tabla 8 muestra la reacción y condiciones de purificación a la que fueron sometidas las muestras de PCR amplificadas:

Tabla 8
Condiciones de la reacción de purificación para las muestras de PCR.

Reactivo	µl por muestra
Producto de PCR	5 µl
ExoSap	1 µl
Total	6 µl

La mezcla total se colocó en tubos eppendorf de 0.6 ml y puestos dentro del termociclador empleando el programa EXO2 bajo las siguientes condiciones: 37°C/15 minutos y 80°C/15 minutos. Después, se mezclaron los reactivos para secuenciación (tabla 9) tomando en cuenta el número de muestras a analizar.

Tabla 9
Condiciones para secuenciación de las muestras.

Reactivo	µl por muestra
DNA templado	1 µl
Primer (5 µl) FM13	0.5 µl
Raedy Reacc. Premix 2X	2 µl
Big Dye Seq. Buffer	2 µl
Agua destilada	4.5 µl

Volumen total	10 μ l
---------------	------------

Las muestras de secuenciación preparadas fueron colocadas en el termociclador, utilizando el programa SEC31302 bajo las siguientes condiciones: 96°C/1 minuto y 25 ciclos de 96°C/10s, 50°C/5s y 60°C/4 minutos, para finalizar a 4°C).

4.5.2.7. Purificación -Xterminator

A continuación, se preparó la siguiente mezcla de reacción de purificación:

Tabla 10
Condiciones de la reacción de purificación.

Reactivo	μ l por muestra
Sam Buffer	11 μ l
Xterminator	2.5 μ l
Producto de PCR	2.5 μ l
Volumen total	15 μ l

Posteriormente, se incubó la mezcla de reacción en el termomixer durante exactamente 30 minutos. Enseguida, se centrifugaron las reacciones a 2000 rpm durante 2 minutos. Luego, se tomaron 15 μ l del sobrenadante sin tomar nada de la resina y se pasaron a un nuevo tubo de PCR, para finalmente ser llevados a analizar.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Extractos etanólicos en polvo

El rendimiento de extractos etanólicos a partir de pepicha deshidratada y fresca, fueron del 7.04 y 2.008 %, respectivamente (Tabla 11), la diferencia se atribuye al número de ciclos de extracción, en muestra deshidratada se aplicó 8 ciclos de 1 hora con intervalos de 15 min mientras que en muestra fresca fue de 1 ciclo (una hora) con intervalos de 15 min también.

Tabla 11
Rendimiento de extractos etanólicos.

Muestra	Cantidad	Extracto obtenido
Pepicha deshidratada	526.4g	37.1g
Pepicha fresca	2,400g	48.2g

Para obtener extractos en polvo, 30 g de cada muestra dosificadas en 5 g colocadas en frascos de 10 ml, fueron sometidos al proceso de liofilización, sin embargo, al término de la liofilización, la muestra de pipicha deshidratada no se logró obtener la muestra en polvo, por lo que, se descartó de la investigación, caso contrario se observó con la muestra de pipicha fresca, se obtuvo muestra deshidratada, que permitió ser molida en un mortero, y finalmente ser utilizado para estimar su influencia sobre las propiedades organolépticas y capacidad antimicrobiana en queso de cabra artesanal.

Tabla 12
Rendimiento de extractos etanólicos después de la liofilización.

	Cantidad de muestra	Extracto obtenido (g)
Pepicha deshidratada	30g	-----
Pepicha fresca	30g	6.8g



Figura 6. Extracto etanólico después del liofilizado. Pepicha fresca (A) y pepicha deshidratada (B).

5.2. Elaboración del queso de cabra

La elaboración de quesos se realizó siguiendo el procedimiento establecido para elaboración de queso de cabra por los productores de la región de Cadereyta, Nuevo León. El rendimiento de cuajada con respecto al total de leche empleado fue de 13.07 % (Tabla 12).

Debido a la pérdida del suero de la cuajada durante el prensado y moldeado se obtuvieron 15 quesos de 500g c/u, de los cuales se destinaron tres quesos para cada tratamiento, siguiendo el diseño experimental.

Tabla 13
Rendimiento de los quesos de cabra.

Cantidad de leche (ordeñada)	Cuajada	Números de quesos (500g c/u)
65 litros	8,500g	15

5.3. Evaluación sensorial

Los resultados obtenidos durante la evaluación sensorial mediante la prueba de ordenamiento con panelistas no entrenados del CBG, se muestran en el anexo **13**. El análisis de datos de la prueba de ordenamiento con la prueba de Ji cuadrada como con la técnica de diferencia mínima significativa, revelaron que no existe diferencia significativa entre tratamientos, sin embargo, el análisis de comparación de media por el método de tuckey, indicó que las muestras de quesos tratados con 0.4g y 0.8g de extractos etanólicos en polvo de pepicha fresca fueron los más aceptados, debido a que estas muestras presentaron mayor promedio de aceptabilidad.

Prueba de *Ji* cuadrada

$$X_{Cal}^2 = \frac{12}{nK(K+1)} \sum_{i=1}^K R_i^2 - 3n(K + 1)$$

Donde:

n= número de juicios totales

K= número de tratamientos

R_i= suma de puntos totales por muestra

$$X_{Cal}^2 = \frac{12}{14(4)(5)} [(32)2 + (34)2 + (33)2 + (41)2] - [3(14)(5)]$$

$$X_{Cal}^2 = 212.14215 - 210$$

$$X_{Cal}^2 = 2.14215$$

$$X_{Tablas}^2 (\alpha=0.05) = 7.815$$

Si $X^2_{Cal} < X^2_{Tablas(\alpha=0.05)}$ No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

Por lo tanto, $X^2_{Cal}=2.6 < X^2_{Tablas(\alpha=0.05)} = 7.815$

Prueba de Diferencia mínima significativa (DMS)

$$DMS = Q \sqrt{\frac{nK(K+1)}{12}}$$

Donde:

Q = valor tabulado según K y nivel de significancia establecido

n = número de juicios totales

K = número de tratamiento

$$DMS = 1.96 \sqrt{\frac{14(4)(5)}{12}}$$
$$DMS = 9.4676$$

$$A - B = 32 - 34 = -2$$

$$A - C = 32 - 33 = -1$$

$$A - D = 32 - 41 = -9$$

$$B - C = 34 - 33 = 1$$

$$B - D = 34 - 41 = -7$$

$$C - D = 33 - 41 = -8$$

Si $|R_i1 - R_i2| \leq DMS$ No hay diferencia significativa entre tratamientos.

Todas las diferencias son $\leq DMS$, por lo tanto; No hay diferencia significativa.

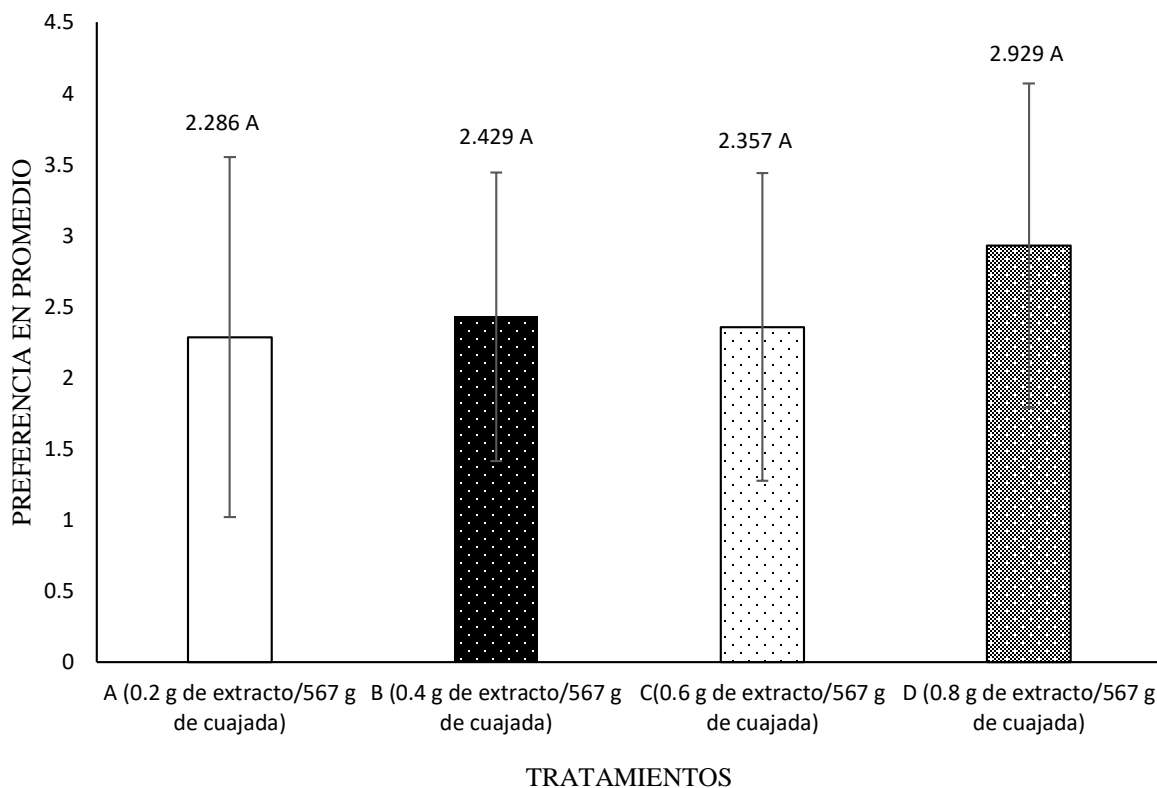


Figura 7. Medias de cuadrados mínimos de la prueba de ordenamiento para determinar el tratamiento de mayor preferencia.

En la prueba triangular, 11 de los 14 panelistas revelaron que existe diferencia entre muestras (Tabla 14), es decir, que los panelistas diferenciaron la muestra control (sin extracto) del tratamiento de mayor preferencia (0.8). Comparando los resultados, con los datos del anexo 4, se puede decir que, la interacción de resultados arrojados por la prueba triangular, muestra un nivel de significancia del 0.1%, lo cual revela que existe un 99.9% de confiabilidad en las respuestas.

Los quesos con 30 días de almacenamiento, presentaron características no aptas para su consumo, es por ello que no fue posible continuar con la evaluación sensorial.

Tabla 14
 Datos obtenidos de la prueba triangular aplicado a panelistas no entrenados (queso día 1).

Panelistas	Numero de muestras		
	123	088	635
1		X	
2		X	
3		X	
4		X	
5			X
6	X		
7		X	
8		X	
9	X		
10		X	
11		X	
12		X	
13		X	
14		X	
Total	2	11	1

Además de la calidad nutricional de los alimentos, el aspecto sensorial, la técnica de preparación, la seguridad alimentaria y el periodo de vida de anaquel son atributos que han cobrado importancia en la industria de los alimentos (Gómez et al., 2013). El uso de conservadores químicos ha sido la forma común de preservar los alimentos por años en la industria alimentaria, 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 (Jiménez et al., 2012).

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 pepicha, aun cuando, se sabe que la pepicha posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Jiménez et al., 2012; Segura et al., 2018; Villa, 2018). En un estudio realizado por Jiménez *et al.*, (2012) indican que extractos de pepicha son capaces de inhibir crecimiento de bacterias y levaduras; además recomiendan el consumo de pepicha en la dieta diaria para mejorar la salud y sugieren el uso de extractos y emulsión, como antimicrobianos y/o antioxidantes naturales.

Uno de los estudios relacionado a nuestros resultados, es el realizado por Guzmán (2009) al evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y extractos (crudo, acuoso y etanólico) de pipicha (*Porophyllum tagetoides*), en el que reporta que los extractos y la emulsión de pipicha son capaces de inhibir únicamente el crecimiento de bacterias y levaduras,

siendo el extracto etanólico el de mayor actividad, al formar halos de inhibición más grandes (15 – 16 mm de diámetro) para casi todos los microorganismos probados además observó que dicho extracto inhibió con la CMI (concentración mínima inhibitoria) más baja (97.6 µg/mL) el crecimiento de levaduras *C. albicans* y *S. cerevisae*.

Por su parte, Segura et al., (2019), al determinar las propiedades antiinflamatoria y antinociceptiva de extractos de hojas de pipicha (*Porophyllum tagetoides*) y *Annona reticulata* en modelo animal, encontraron que en ratones suministrados con extractos de pipicha, a una relación de 200 y 300 mg/kg de peso, redujo significativamente la formación de edema inducido por carragenina, lo que los llevó a concluir que extractos de pipicha presentan notable actividad antiinflamatoria, y que apoyan su uso tradicional en el tratamiento de diversas enfermedades asociadas a la inflamación.

Recientemente, Sixto (2021) al caracterizar la calidad microbiológica del queso de cabra artesanal tratados con 0.2 y 0.6 g de extracto etanólico de pipicha fresca, utilizando placas de 3MTMpetrifilmTM específicas para la identificación de coliformes totales, aerobias mesófilas y Bacterias Ácido Lácticas (BALs); reporta menor crecimiento en mesófilos aerobios, BALs y coliformes totales en quesos tratados con 0.2 g de extracto almacenados en refrigeración hasta por 22 días, además de conservar sus propiedades sensoriales, a diferencia del presente estudio, Sixto (2021), únicamente evaluó dos concentraciones y no aplicó técnicas de evaluación sensorial, además el análisis microbiológico fue dirigido para tres grupos de microorganismos.

Los resultados reportados por Guzmán (2009); Jiménez et al., (2012); Sixto (2021) como los obtenidos en el presente estudio, sugieren que extractos de pipicha pueden ser utilizados como

antimicrobianos y/o antioxidantes naturales, y de esa manera contar con otro aditivo de origen natural que no provoca estragos en el organismo humano y que los alimentos tratados con este aditivo, conservan sus propiedades sensoriales incluso incrementa su valor funcional.

5.4. Caracterización molecular

5.4.1 Extracción de ADN

La identificación molecular de microorganismos nativos en queso de cabra artesanal después de ser tratados con 4 concentraciones de extracto etanólico en polvo de pipicha fresca, consistió en extraer y cuantificar el ADN de microorganismos en muestras de queso al día 1 (día de elaboración del queso), 15 y 30 días de almacenado. En la Figura 8, se muestran los resultados de la extracción de ADN de queso tratados con 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 g de extracto etanólico por 567 g de cuajada, por duplicado; con 30 días de almacenamiento en refrigeración. En todas las muestras se obtuvieron concentraciones de ADN suficiente para la caracterización molecular.

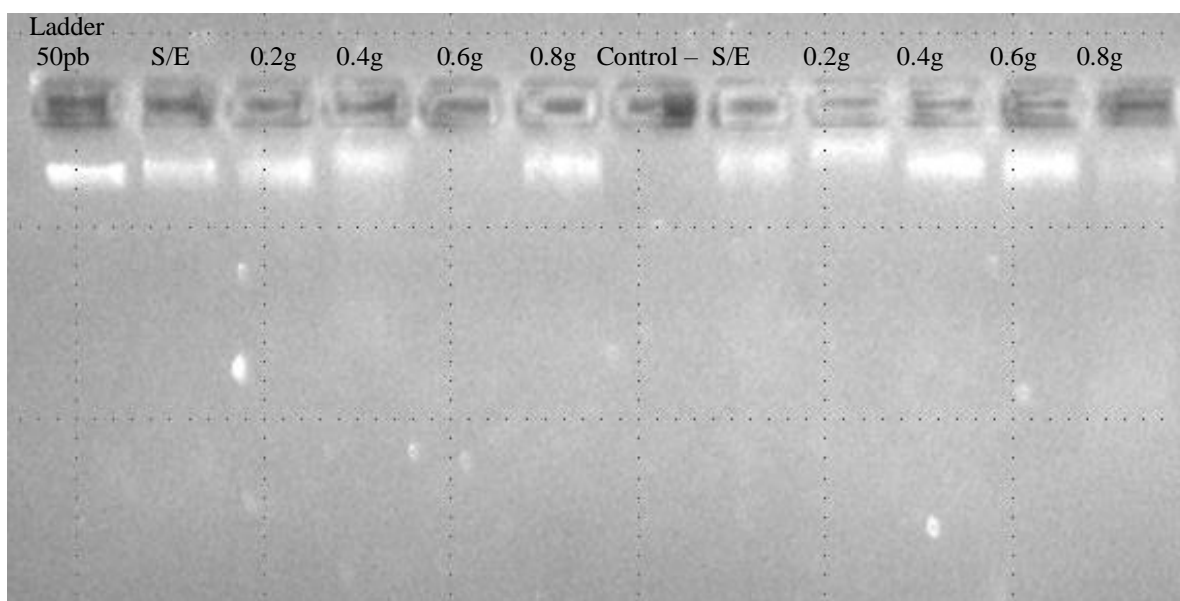


Figura 8. Extracción de ADN de quesos con 30 días de almacenado.

5.4.2. Amplificación del Gen 16s.

En la figura 9, se observan los fragmentos de ADN amplificados con el gen 16s de muestras de leche inicial y pasteurizada (carriles 2 y 3 respectivamente), así como tratamientos de queso día 1 (carril 4 al 9), y día 15 (carril 10 y 11). El tratamiento de 0.2, se realizó por duplicado. Se logró, a excepción de la leche inicial (carril 2) y muestra de queso 0.8 (carril 9), la amplificación del segmento de 1500pb correspondiente al 16S ribosomal.

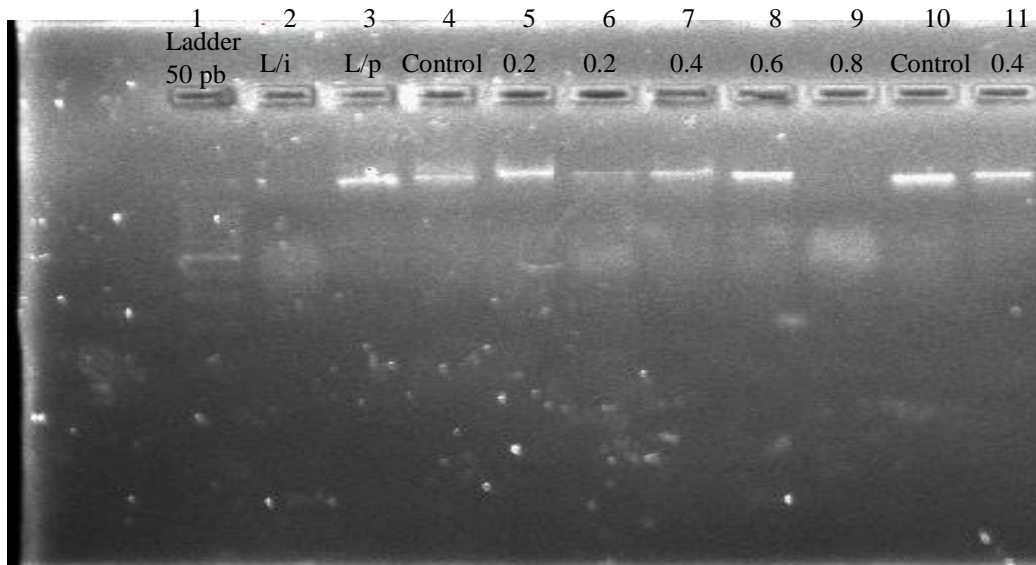


Figura 9. Amplificación del gen 16s en muestras de leche y queso día 1 y 15.

5.4.3. Clonación molecular

El producto de PCR al tiempo inicial y después de 15 días con la muestra control, 0.2 y 0.6, fueron clonados, los resultados se muestran en la figura 10. De acuerdo al marcador de selección, aquellas que presentan la tonalidad blanca, son portadoras del gen de interés, mientras que, aquellas de tonalidad azul, presentan ausencia del mismo, debido a que no son portadoras del plásmido y por consiguiente, no presentan la resistencia antibiotica que este les otorga.

Para la amplificación, fueron seleccionadas al azar 20 colonias portadoras del inserto (blancas) para tener un aproximado de la diversidad microbiana.

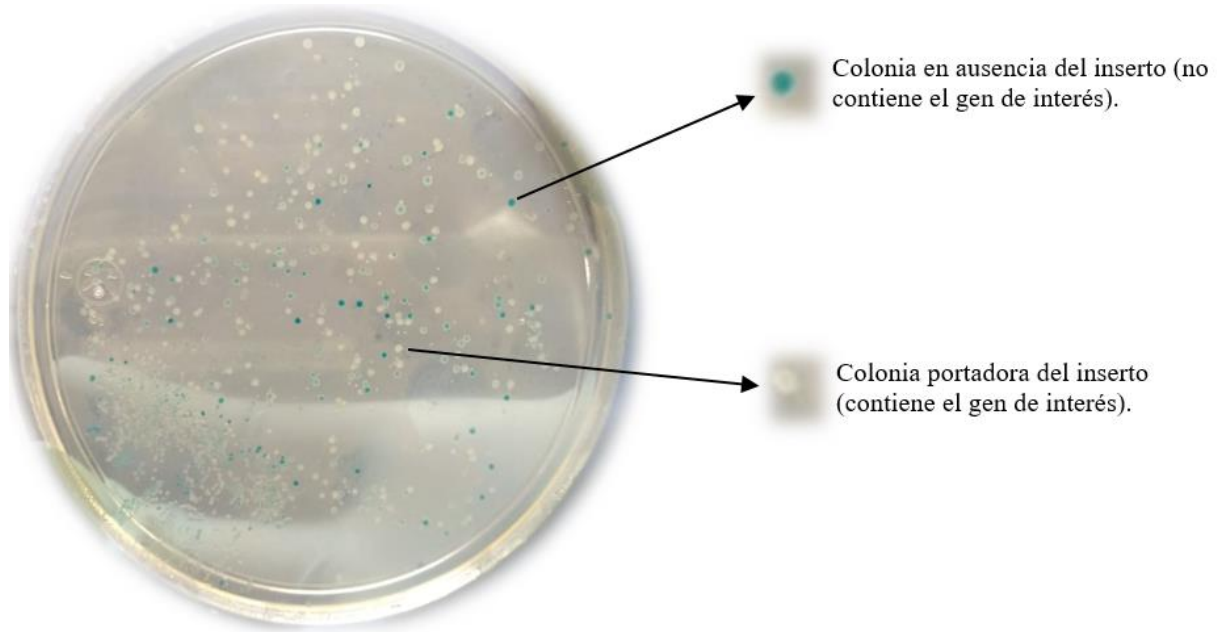


Figura 10. Colonias portadoras y en ausencia del inserto (gen de interés).

5.4.4. Tamizado

En la figura 11, se observan las muestras amplificadas (tamizaje). Por cada tratamiento y para su secuenciación, fueron seleccionadas solo aquellas que presentaron el fragmento de 1500pb. el resto de las muestras que no presentaron esta característica, fueron descartadas. La tabla 15, señala el número de muestras, por tratamiento, seleccionadas que fueron llevadas a secuenciar, así como también las muestras descartadas.

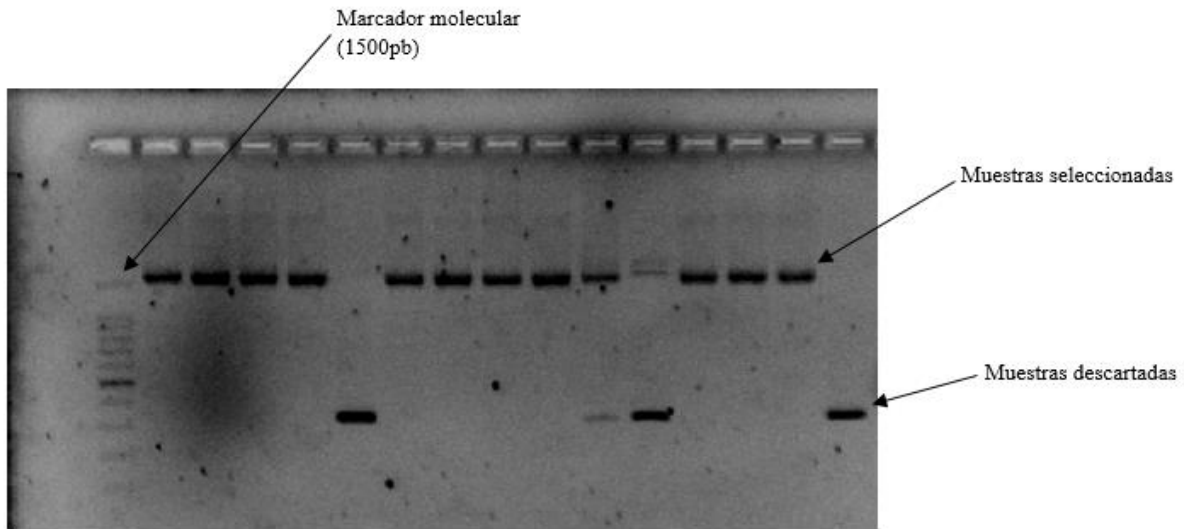


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (tamizaje de los diferentes tratamientos).

Tabla 15
Muestras seleccionadas y descartadas para su secuenciación.

Tratamiento.	No. De muestras seleccionadas para secuenciación.	No. De muestras descartadas.
Pasteurizada	20	0
Control ₁	14	6
0.2 ₁	16	4
0.6 ₁	12	8
Control ₁₅	18	2
0.2 ₁₅	19	1
0.6 ₁₅	10	10
Total	109	31

La tabla 16, muestra la diversidad y el número de microorganismos identificados en cada tratamiento. En ella se observa que el queso control, queso 0.2 y queso 0.6, todos del día 1,

registran la mayor diversidad de microorganismos. Mientras que, para los tratamientos queso 0.2 y queso 0.6 (ambos de 15 días) se observa mayor número de microorganismos. Con respecto a la identidad de los microorganismos, el género *Streptococcus* se presentó en todos los tratamientos del día 1 (queso control, queso 0.2 y queso 0.6), este grupo de bacterias pertenece a las BAL's homofermentativas que tiene como hábitat la mucosa mamaria bovina y la leche, por lo tanto, también se encuentra en productos derivados de la leche, y son considerados como patógenos oportunistas. Mientras tanto, bacterias el generó *Psychrobacter* se presentaron en todos los tratamientos del día15 (control, queso 0.2 y 0.6), cabe señalar, que la presencia de este último género de bacteria no ha sido reportada en leche y sus derivados, sin embargo, se ha reportado como un género bacteriano con un amplio potencial dentro de la industria alimentaria.

También, se muestran otros géneros de bacterias presentes en algunos tratamientos, como: *Staphylococcus*, *Cutibacterium*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Shigella*, los cuales se encuentran en el agua, suelo, ubre de la vaca y en algunos alimentos, y han sido reportados como patógenos causantes de enfermedades infecciosas. De igual manera, aparece el género *Pseudopropionibacterium* que ha sido reportada como una bacteria fermentadora de azúcares y productora de ácido propiónico, que convierte la glucosa o el lactato en propionato, acetato y CO₂.

Debido al número de clonas secuenciadas de tres de cinco tratamientos evaluados en el presente estudio (incluyendo la muestra control negativo), los resultados obtenidos muestran únicamente un panorama de la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de esta planta que pueden ejercer en productos lácteos, tal es el caso de quesos de cabra artesanal que, por seguir un proceso

netamente artesanal resulta importante su aplicación; aunque los resultados indiquen potencial inhibidora que puede tener la pepicha en la industria alimentaria, es necesario realizar más estudios para definir el efecto de los extractos sobre la diversidad y densidad bacteriana.

Tabla 16
Diversidad e identidad microbiana en los diferentes tratamientos de los quesos.

Librería	ID Microorganismo	Núm. de m.o.		Características
Control día 1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	4	18	<i>Streptococcus</i> : Pertenece al grupo de BAL homofermentativas responsables de la viscosidad de la leche y diferencia entre las características de los quesos hechos con leche cruda y pasteurizada. Tienen como hábitats naturales la mucosa mamaria bovina y la leche, por lo tanto, también se encuentran en productos derivados de la leche. Considerado como patógenos oportunistas
	<i>Streptococcus salivarius</i>	4		
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	4		
	<i>Streptococcus lactarius</i>	2		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3		
	<i>Staphylococcus devreisei</i>	1		
Control día 15	<i>Psychrobacter aquaticus</i>	3	18	
	<i>Psychrobacter vallis</i>	7		
	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	8		
Queso 0.2 día 1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	6	19	
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	5		
	<i>Streptococcus salivarius</i>	5		
	<i>Cutibacterium avidum</i>	2		
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	1		
Queso 0.2 día 15	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	18	25	<i>Psychrobacter</i> : causantes de infecciones humanas. Crecen en ambientes salinos, fríos y húmedos a temperaturas de entre -10 y 42°C. Reportado como un género bacteriano con un amplio potencial dentro de la industria alimentaria.
	<i>Psychrobacter aquaticus</i>	5		
	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	2		
Queso 0.6 día 1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	4	15	
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	4		
	<i>Streptococcus salivarius</i>	4		
	<i>el propionicum</i>	1		
	<i>Cutibacterium avidum</i>	1		
	<i>Pseudopropionibacterium propionicum</i>	1		
		1		
Queso 0.6 día 15	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	10	23	<i>Staphylococcus</i>, <i>Cutibacterium</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Aeromonas</i>, <i>Shigella</i> : se encuentran en el agua, suelo, ubre de la vaca y en algunos alimentos, y han sido reportados como patógenos causantes de enfermedades infecciosas.
	<i>Psychrobacter vallis</i>	9		
	<i>Psychrobacter aquaticus</i>	4		

VI. CONCLUSIONES

El número de ciclos durante la obtención de extractos por la técnica de maceración asistida por ultrasonido influye significativamente en el rendimiento, se obtuvo 5.032 % más en muestras sometida a 8 ciclos de 1 hora con intervalos de 15 min (7.04 %) respecto a la muestra sometida a un ciclo (2.008 %). En la elaboración del queso, se obtuvo un rendimiento del 11.53 %, superior al valor promedio reportado por diversos autores, del 10% (1kg de queso por 10 litros de leche).

El análisis estadístico con datos de la prueba sensorial, indicó que no existe diferencia significativa entre los quesos tratados con las diferentes concentraciones de extracto, sin embargo, en la prueba de ordenamiento, los quesos tratados con 0.8 g de extracto etanólico por 567 g de cuajada, presentó mayor aceptabilidad por los panelistas, este al ser evaluado con queso control (sin extracto) en la prueba triangular, los panelistas identificaron diferencia significativa con el queso control (sin extracto).

Se identificaron microorganismos que son comúnmente encontrados en productos lácteos, algunos de ellos se presentaron de manera específica en los diferentes tratamientos. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para definir el efecto de los extractos sobre la diversidad bacteriana.

VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aguilar, J. M. (2012). *Métodos de conservación de alimentos*. Estado de México, México: Red Tercer Milenio.

Alcántara, D. I. A. (2014). *Calidad microbiológica y su relación con la vida útil en quesos frescos expendidos en tres mercados de Trujillo*. Cientifi-k. 4 (1). Pp.7.

Angarita M. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, Volumen 16(numero 5), 796-807 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000500012.

Araya, V. Gallo, L., Quesada, C., Chaves, C., & Arias, M. L. (2008). *Evaluación bacteriológica de la leche y queso de cabra distribuidos en el Area Metropolitana de San José, Costa Rica*. Archivos latinoamericanos de nutrición, 58(2), 182-186.

Baena Ruíz, Torija E. (2001). Riesgos y beneficios de los aditivos alimentarios. *Revista Elsevier*. Vol. 20. Num. 1. Pag. 104-115

Carrillo, M., Reyes, A. (2013). *Vida útil de los alimentos*. *Revista Iberoamericana de la Ciencias Biológicas y Agropecuarias*. Vol. 2 (3). pp

Cervera, P., Clapés J., Rigolgas, R. (2004). *Nutrición y Dietoterapia*. Madrid, España. McGRAW-HILL - Interamericana de España, S. A. U.

Chacón, V. A. (2005). *Aspectos nutricionales de la leche de cabra (Capra hircus) y sus variaciones en el proceso agroindustrial*. *Agronomía Mesoamericana*, 16(2), 239-252.

Chacón, V. A. (2007). *La leche de cabra: un alimento lleno de sorpresas, análisis y opinión*. *Actualidad Zootécnica*. 2 (2). 30-35.

Chacón, V. A., & Pineda, C., M. L. (2009). *Características químicas, físicas y sensoriales de un queso de cabra adaptado del tipo "Crottin de Chavignol"*. *Agronomía mesoamericana*, 20 (2), 297-309.

Costa J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Volumen 22 (Número 5). pp 299-305 de <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X0473092X>.

Diz M. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Revista NPunto*. Volumen 3 (numero 30). pp 88-111 de <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5f69a919884e7Art5.pdf>.

FLORES C. M. A., LEAL, R. P., Basurto, S. M. & Jurado, M. D. R. (2009). *La leche de cabra y su importancia en la nutrición*. *Tecnociencia Chihuahua*, 3(2), 107-113.

Gómez C.L., Ponce-Alquicira E., Freitas M.R.E., Rubio L.M.S. (2013). Effects of natural antimicrobials on microbiological stability, PH, aspect and sensory properties of ground beef parties stored under refrigeration. *Rev Mex Cienc Pecu*, 4(3): 255-270.

González, M. (2002). *Tecnología para la elaboración de queso blanco, amarillo y yogurt*. *Ciencia y Tecnologías de alimentos*. Secretaría Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación. Veraguas, Panamá.

González, M. L., & Franco, F. M. J. (2015). *Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18(3), 250.

Guzmán, A. P. (2009). *Actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y extractos (crudo, acuoso y etanólico) de Pipicha (porophyllum tagenoides)*. (Tesis de grado). Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Básicas. Xalapa, Veracruz. México.

Guzmán, G. M. (2011). *El mercado de queso de cabra en México*. Consejería Agrícola de Chile en México (Consejagri). 7 (2).

<http://infoalimenta.com/ciencia/55/65/los-aditivos-alimentarios/> citada el 28 de Febrero de 2020 a las 12:11 pm.

Jiménez C., Leon E. D. (2009). Biosensores: Aplicaciones y PERSPECTIVAS en el control y calidad de procesos y Productos Alimenticios. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Volumen 16 (numero 1). pp 144-154 de <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a17.pdf>.

Jiménez M.; Guzmán A.P.; Azuara E.; García O.; Mendoza M.R.; Beristain C.I. (2012) Volatile compounds and antioxidative activity of *Porophyllum tagetoides* extracts. *Planta Foods Hum Nutr* 67: 57-63.

Lanchipa, L., & Sosa, Y. (2003). *Evaluación de la carga microbiana patógena en la elaboración del queso fresco en el distrito de Tacna*. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna–Perú.

López, O. M. (2004). *Mejoramiento de vida de anaquel en queso tradicional ranchero y queso de pasta hilada (Oaxaca)*. (Tesis de Maestría). Universidad Iberoamericana Ciudad de México. Departamento de Salud.

Medina T. A., Espinoza R. F. (2009). Microarreglos: Tecnología con aplicaciones en el campo de la salud humana. *Revista Medigraphic*. Volumen 18 (numero 2). pp 52-59. de <https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2009/al092c.pdf>.

Mendoza M. (2013). Biosensores mecánicos en el área biológica y alimentaria: una revisión. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Volumen 12 (numero 2). pp 205-225 de <https://www.redalyc.org/pdf/620/62030721003.pdf>.

Palacios, V. S. (2006). *Caracterización microbiológica de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo Hidalgo*. (Tesis de Pregrado). Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Tulancingo, Hidalgo, México.

Pedrosa A. A. (1999). Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 3(2) Recuperado en 25 de marzo de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011.

Rodríguez, F. F. (2015). *Sustentabilidad en los sistemas de producción caprina*. Folleto Técnico No. 1. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Ciudad de México, México.

Rodríguez, J. (2010). *Consecuencias higiénicas de la alteración de los alimentos*. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los alimentos.

Rodríguez, S. (2011). *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas*. Ra Ximha. Vol. 7 (1). pp. 153 – 170.

Segura C.D.; Martínez J.M.E.; Casas G. G., Martínez C.G.; Guzmán H. E.A.; Vázquez C. B. (2018). Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the extracts from the leaves of *Porophyllum tagetoides* and *Annona reticulate*, *Journal of Medicinal Plants Studies* 7(1): 50-54.

Sierra M., Barros R., Gómez D., Mejía A., Suarez D. (2018). *Productos naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Unigraria. Universidad de Colombia. Pp.56. Bogotá Colombia. Vol. I.

Sixto H.B. (2021). *Caracterización de la calidad microbiológica del queso de cabra artesanal tratado con extractos etanólicos en polvo de pipicha (Porophyllum tagetoides) fresca* (Tesis de licenciatura). Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio, Acatlán, Puebla, México.

Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquilla C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Revista medigraphic*. Vol. 2 (numero 2). pp 70-78. de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>.

Villarreal, J. A. (2003). *Flora del Bajío y regiones adyacentes*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Fascículo 113. Saltillo Coahuila, México. Pp. 34-37.

Villarreal, J. A., Villaseñor, J. L. (2004). *Flora de Veracruz*. Universidad de ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, University of California Riverside, C. A. Fascículo 135. Xalapa, Veracruz, México. Pp. 37-38.

Zambrano, F. (2015). *Estudio comparativo para la conservación del camarón (Penaeus Vannamei) en zumos ácidos utilizando limón sutil y maracuyá con agentes antimicrobianos naturales*. (Tesis de pregrado). Universidad Laica Eloy Alfaro de Banabí, Manta, Ecuador.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Papeleta para la realización de la prueba de ordenamiento.

Nombre: _____ Fecha: _____	
Indicaciones: Frente a usted hay cuatro muestras de queso, saboree cuidadosamente cada una de ellas y ordénelas de mayor a menor (donde: 1. El que más le gusta y 4. El que menos le gusta) de acuerdo a su preferencia	
Muestras	LETRA DE IDENTIFICACION
1.- _____	
2.- _____	
3.- _____	
4.- _____	
Comentarios: _____ _____ _____	
¡Muchas gracias!	

Anexo 2. Papeleta para la realización de la prueba triangular.

Nombre: _____ Fecha: _____	
Nombre del producto: _____	
Indicaciones: Frente a usted hay tres muestras de queso, dos son iguales y una diferente, saboree cuidadosamente y marque con una X la muestra diferente.	
Muestras	Muestras diferentes
088	_____
123	_____
635	_____
Comentarios:	

¡Muchas gracias!	

Anexo 3. Tabla de Kramer de categorías totales necesarias para una significación del 5% (p 0.05).

Los bloques de cuatro cifras representan:

Primer renglón: suma mínima insignificante, cualquier tratamiento; máxima suma de rangos insignificantes, cualquier tratamiento.

Segundo renglón: mínima suma de rangos insignificantes tratamientos predeterminados; máxima suma de rangos insignificante, tratamiento predeterminado.

NR: Número de respuestas.

Numero de tratamientos o muestras ordenadas									
NR	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	3-9	3-11	3-13	4-14	4-16	4-18
3	-	-	-	4-14	4-17	4-20	4-23	5-25	5-28
	-	4-8	4-11	5-13	6-15	6-18	7-20	8-22	8-25
4	-	5-11	5-15	6-18	6-22	7-25	7-29	8-32	8-36
	-	5-11	6-14	7-17	8-20	9-23	10-26	11-29	13-31
5	-	6-14	7-18	8-22	9-26	9-31	10-35	11-39	12-43
	6-9	7-13	8-17	10-20	11-24	13-27	14-31	15-35	17-38
6	7-11	8-16	9-21	10-26	11-31	12-36	13-41	14-46	15-51
	7-11	9-15	11-19	12-24	14-28	16-32	18-36	20-40	21-45
7	8-13	10-18	11-24	12-30	14-35	15-41	17-46	18-52	19-58
	8-13	10-18	13-22	15-27	17-32	19-37	22-41	24-46	26-51
8	9-15	11-21	13-27	15-33	17-39	18-46	20-52	22-52	24-64
	10-14	12-20	15-25	17-31	20-36	23-41	25-47	28-52	31-57
9	11-16	13-23	15-30	17-37	19-44	22-50	24-57	26-64	27-71
	11-16	14-22	17-28	20-34	23-40	26-46	29-52	32-58	35-64
10	12-18	15-25	17-33	20-40	22-48	25-55	27-63	30-70	32-78
	12-18	16-24	19-31	23-37	26-44	30-50	33-57	37-63	40-70
11	13-20	16-28	19-36	22-44	25-52	28-60	31-68	34-76	36-85
	14-19	18-26	21-34	25-41	29-48	33-55	37-62	41-69	45-76
12	15-21	18-30	21-39	25-47	28-56	31-65	34-74	38-82	41-91
	15-21	19-29	24-36	28-44	32-52	37-59	41-67	45-75	50-82
13	16-23	20-32	24-41	27-51	31-60	35-69	38-79	42-88	45-98
	17-22	21-31	26-39	31-47	35-56	40-64	45-72	50-80	54-89
14	17-25	22-34	26-44	30-54	34-64	38-74	42-84	46-94	50-104
	18-24	23-33	28-42	33-51	38-60	44-68	49-77	54-86	59-95
15	19-26	23-37	28-47	32-58	37-68	41-79	46-89	50-100	54-111
	19-26	25-35	30-45	36-54	42-63	47-73	53-82	59-91	64-101
16	20-28	25-39	30-50	35-61	40-72	45-83	49-95	54-106	59-117
	21-27	27-37	33-47	39-57	45-67	51-77	57-87	63-97	69-107
17	22-29	27-41	32-53	38-64	43-67	48-88	53-100	58-112	63-124
	22-29	28-40	35-50	41-61	48-71	54-82	61-92	67-103	74-113
18	23-31	29-43	34-56	40-68	46-80	51-93	57-105	62-118	68-130
	24-30	30-42	37-53	44-64	51-75	58-86	65-97	72-108	79-119
19	24-33	30-46	37-58	43-71	49-84	55-97	61-110	67-123	73-136
	25-32	32-44	39-56	47-67	54-79	62-90	69-102	76-114	84-125

Anexo 4. Tabla de Kramer. Interacción de resultados de la prueba triangular.

Número de respuestas correctas necesarias para establecer diferencia significativa			
Numero de Juicios	Nivel de Significancia		
	5%	1%	0.1%
7	5	6	7
8	6	7	8
9	6	7	8
10	7	8	9
11	7	8	9
12	8	9	10
13	8	9	10
14	9	10	11
15	9	10	12
16	10	11	12
17	10	11	13
18	10	12	13
19	11	12	14
20	11	13	14
21	12	13	15
22	12	14	15
23	13	14	16
24	13	14	16
25	13	15	17
35	18	19	21
40	20	22	24
45	22	24	26
50	24	26	28
60	28	30	33
70	32	34	37
80	35	38	41
85	37	40	43
90	39	42	45
95	41	44	47
100	43	46	49
200	80	84	89
300	117	122	127
400	152	158	165
500	188	194	202
1000	363	372	383
2000	709	722	737