



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



---

---

**Actividad antimicrobiana en la fermentación natural del  
pozol blanco con pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merril).**

**TESIS**

**Que para obtener el Grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS ALIMENTARIAS**

**PRESENTA**

**Ing. Leonor del Carmen Pérez Robles**

Villahermosa, Tabasco, Julio de 2013



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**Actividad antimicrobiana en la fermentación natural del  
pozol blanco con pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merril).**

**TESIS**

**Que para obtener el Grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS ALIMENTARIAS**

**PRESENTA**

**Ing. Leonor del Carmen Pérez Robles**

**Asesoras Internas:**

M.A. Judith Espinosa Moreno

Dra. Edith Miranda Cruz

**Asesora Externa:**

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

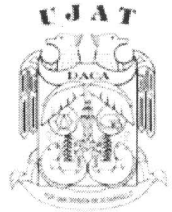
Villahermosa, Tabasco, Julio de 2013



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”

**55**  
ANIVERSARIO  
**UJAT**



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Villahermosa; Tabasco a 03 de Julio de 2013

**ING. LEONOR DEL CARMEN PÉREZ ROBLES  
EGRESADA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS ALIMENTARIAS  
P R E S E N T E**

Por este conducto y de acuerdo a su solicitud de autorización de impresión de Tesis, informo a usted que sobre la base del Artículo 26 del reglamento de Posgrado de esta Universidad, esta Dirección a mi cargo le autoriza la impresión de su trabajo recepcional bajo la modalidad de Tesis intitulado: **“Actividad antimicrobiana en la fermentación natural del pozol blanco con pimienta (*Pimienta dioica* (L.) Merrill)”**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

**ATENTAMENTE**

  
**M.A.A. ALMA CATALINA BERUMEN ALATORRE**

**DIRECTORA**

U.J.A.T.



DIVISION ACADÉMICA DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DIRECCION

C.c.p. Expediente del (a) egresado (a).  
Archivo.

Miembro CUMI X desde 2008

**Consortio de  
Universidades  
Mexicanas**  
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Carretera Villahermosa-Teapa Km 25. R/A. La Huasteca 2ª Secc. Villahermosa, Tab. México. C.P. 86280

Tel. (993) 142-9151, 3581585, 358-1500 ext. 6601

e-mail: direccion.daca@ujat.mx

## CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada “**Actividad antimicrobiana en la fermentación natural del pozol blanco con pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merrill)**”, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la Ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 05 días del mes de Julio del año 2013.

**A U T O R I Z O**

---

**IAA. LEONOR DEL CARMEN PEREZ ROBLES**  
**TESISTA**

## ÍNDICE

	Página
Índice de Cuadros.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Agradecimientos.....	x
Dedicatorias.....	xiii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
2.1. Alimentos fermentados.....	3
2.2. Conocimiento del pozol.....	5
2.2.1. Etnobiología.....	5
2.2.2. Diversidad microbiana.....	6
2.3. <i>Zea mays</i> L.....	7
2.3.1. Etnobotánica.....	7
2.3.2. Composición química.....	8
2.3.3. Actividad biológica.....	8
2.4. <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merril.....	9
2.4.1. Etnobotánica.....	9
2.4.2. Composición química.....	10
2.4.3. Actividad biológica.....	10
2.5. Actividad antimicrobiana de origen natural en los alimentos.....	11
2.5.1. Compuestos fenólicos.....	13
2.5.1.1. Flavonoides.....	16
2.6. Calidad microbiológica de los alimentos.....	17
2.6.1. Indicadores de patógenos bacterianos en los alimentos.....	18
2.7. Métodos de identificación de microorganismos.....	19

2.7.1. Métodos convencionales o tradicionales.....	20
2.7.2. Métodos moleculares.....	20
<b>III. Justificación.....</b>	<b>22</b>
<b>IV. Objetivos.....</b>	<b>24</b>
4.1. Objetivo general.....	24
4.2. Objetivos Específicos.....	24
<b>V. Materiales y Métodos.....</b>	<b>25</b>
5.1. Lugar del desarrollo del trabajo .....	25
5.2. Materias primas y medios de cultivo .....	25
5.3. Elaboración y fermentación.....	25
5.4. Proceso de fermentación natural.....	26
5.5. Análisis microbiológicos.....	26
5.5.1. Preparación de los análisis microbiológicos.....	26
5.5.2. Microorganismos estudiados .....	27
5.5.3. Aislamiento e identificación de bacterias coliformes.....	27
5.6. Análisis fisicoquímicos.....	29
5.6.1 Análisis de pH.....	29
5.6.2. Análisis de acidez titulable.....	29
5.7. Determinación de fenoles totales.....	29
5.8. Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	30
<b>VI. Resultados y Discusión.....</b>	<b>31</b>
6.1. Cuantificación de la microflora de la fermentación natural.....	31
6.1.1. Microorganismos mesófilos aerobios totales.....	31
6.1.2. Bacterias ácido lácticas.....	32
6.1.3. Bacterias coliformes totales.....	33
6.1.4. Levaduras y hongos.....	35
6.2. Identificación de bacterias coliformes.....	37
6.3. pH y acidez titulable.....	40
6.4. Fenoles totales de pozol adicionado con y sin pimienta.....	42
<b>VII. Conclusiones.....</b>	<b>45</b>
<b>VIII. Recomendaciones.....</b>	<b>46</b>

<b>IX. Literatura citada</b> .....	47
<b>Anexo 1.</b> Sistema de identificación de <i>Enterobacteriaceae</i> y otros bacilos Gram negativos no exigentes.....	57
<b>Anexo 2.</b> Preparación de la escala de McFarland.....	58
<b>Anexo 3.</b> Galería de tubos del API .....	59
<b>Anexo 4.</b> Curva de calibración utilizando como patrón estándar ácido gálico en un rango de concentración de 0.0 a 0.1 mg L <sup>-1</sup> .....	60
<b>Anexo 5.</b> Resultados obtenidos del Análisis Estadístico. ....	61

Juárez  
México.

Autónoma de Tabasco.

## Índice de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Distribución de componentes fenólicos.....	14
Cuadro 2. Cepas identificadas con el sistema API® 20E en el pozol con pimienta .....	37
Cuadro 3. Cepas identificadas con el sistema API® 20E en el pozol sin pimienta .....	38
Cuadro 4. Concentración de fenoles totales (mg de ácido gálico g <sup>-1</sup> ) ....	43



## Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Estructura general de un flavonoide.....	16
Figura 2. Microorganismos mesófilos aerobios totales (Log UFC g <sup>-1</sup> ) presentes en la fermentación natural de pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).....	31
Figura 3. Bacterias ácido lácticas (Log UFC g <sup>-1</sup> ) presentes en la fermentación natural de pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).....	32
Figura 4. Bacterias Coliformes Totales (Log UFC g <sup>-1</sup> ) presentes durante la fermentación natural del pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).....	34
Figura 5. Levaduras y hongos presentes (log UFC g <sup>-1</sup> ) en la fermentación natural de pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).....	36
Figura 6. Valores de pH en la fermentación natural de pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).....	40
Figura 7. Acidez titulable de la fermentación natural del pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).....	42
Figura 8. Contenido de fenoles totales (expresado en mg de ácido gálico g <sup>-1</sup> ) durante la fermentación natural de pozol con pimienta (CP) y pozol sin pimienta (SP).....	43

# **AGRADECIMIENTO**

## **A DIOS**

Gracias por darme fortaleza, fuerzas, sabiduría, confianza y fe, para poder lograr con éxito este trabajo tan anhelado, al lado de mis seres queridos.

## **A MIS PADRES Y HERMANOS**

Francisco Pérez Guzmán y Francisca Robles Ramón, por su amor y su apoyo incondicional, muchas gracias. Javier y Trinidad, por todo su apoyo y por sus palabras de aliento, gracias, los quiero mucho, Dios los bendiga.

## **A MI ESPOSO E HIJOS**

Juan José Silva Jiménez, María José y Juan José., por su comprensión y el apoyo, por ser pacientes y por confiar en que esta investigación concluyera.

## **A MI SUEGRA**

Por su apoyo incondicional y por las palabras que siempre me ha brindado de aliento.

## **A MIS ASESORAS**

M.A. Judith Espinosa Moreno, Dra. Edith Miranda Cruz, Dra. María del Carmen Wacher Rodarte, por su apoyo y dedicación para que este trabajo se lograra.

## **A MI TUTORA**

M.C. Dora Centurión Hidalgo por todo su apoyo, esfuerzo y dedicación en este trabajo, mi respeto y admiración.

También gracias a Blanquita, Maya, Eliut, Omar de Dios, Alma Catalina, Pedro, Melchor, Claudia, Judith, Dora, Hortencia, Gerardo Vera, Cancino, Jaime, Rubio, María Esther, Oswaldo, Olivet, Eloísa, María Adelfa, Lili, Edith, Corzo, Jorge Arturo, Rodolfo Osorio, Rebolledo, Sol, Lucy, Lichita, Almita, Paty, Estela, Irma, Rita, Toñita, Laura, Vero, Lulu, Arely Banda, Arely Lanestosa, Wilbert, Mamani, Heradia, Bety, Diana, muchas gracias a todosssss, por esas palabras de aliento y por ser quienes son....

En agradecimiento les dedico este bello Poema:

Cúltivo una rosa blanca  
en Junio como en Enero  
para el amigo sincero  
que me da su mano franca.

Y para el cruel que me arranca  
el corazón con que vivo,  
cardo ni ortiga cultivo;  
cultivo la rosa blanca.

José Martí



## **AGRADECIMIENTO ESPECIAL**

A CONACYT Ciencia Básica por el apoyo al proyecto titulado “Metagenómica funcional de alimentos fermentados tradicionales de maíz: búsqueda de enzimas de interés biotecnológico y estudio de la diversidad microbiana” con clave CB-2008-01 No. 101784 y cuya directora es la Dra. María de los Dolores Reyes Duarte de la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa.



## **DEDICATORIA**

Lucha constantemente y lograras tus metas.

A todos en general, por ser un trabajo que tomo tiempo, esfuerzo y dedicación, ya que en cada momento conté con una palabra de aliento y de ánimo, para que finalmente este trabajara se lograra... Dios, Padres, hermanos, esposo, hijos, Comité Revisor, Tutora, Asesoras, Vecinos, Compañeros de clases, compañeros de vista, Profesores, Administrativos, Conocidos, son muchossss, mil gracias a cada uno de Ustedes, Que Dios los bendiga a cada uno.....



## Resumen

El pozol es una bebida ancestral en el estado de Tabasco que se consume sin y con fermentación natural y se le adiciona sabores como el cacao, pimienta, camote, entre otros. Durante la fermentación se desarrolla una gran diversidad de microorganismos procedentes de los diferentes substratos, de los utensilios en donde se prepara, frecuentemente es impredecible y su presencia está determinada por la clase de ingredientes utilizados, las modalidades en los procesos de elaboración y las condiciones ecológicas de los lugares en donde ocurren. Por lo anterior, se evaluó el efecto antimicrobiano de *Pimenta dioica* (L.) Merrill y el contenido de fenoles totales en la fermentación natural del pozol blanco. La masa de pozol se obtuvo del maíz nixtamalizado, dividiéndose en dos tratamientos: con pimienta (CP) y sin pimienta (SP). El tiempo de observación de la fermentación fue de 0, 12, 24, 36 y 48 h realizándose la cuantificación de bacterias aerobias totales, bacterias lácticas, coliformes totales, levaduras y hongos así como los análisis fisicoquímicos de pH, acidez titulable y fenoles totales. El aislamiento e identificación de las cepas de coliformes se realizó con apoyo del Sistema API. La cantidad de bacterias lácticas, el pH y la acidez alcanzada durante el tiempo de fermentación indican que se llevó a cabo una fermentación láctica y los valores alcanzados fueron similares a los reportados en otros trabajos sobre la fermentación del pozol. Las cepas con mayor presencia en el pozol SP fueron *Klebsiella pneumoniae* y *Raoultella terrigena* y en el pozol CP fueron *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. Se observó que la concentración de fenoles totales en los tratamientos CP y SP no fue significativamente diferente en el contenido de fenoles totales pero sí fue diferente entre ambos tratamientos (CP y SP), la cantidad utilizada de *Pimenta dioica* no fue suficiente para inhibir el crecimiento microbiano ni la concentración de fenoles.

**Palabras clave:** fermentación natural, pozol, *Pimenta dioica*, compuestos fenólicos.

## Abstract

It is known that all the traditional fermented beverages, pozol included, are made without an accurate control, specially a microbial one, so the types of microorganisms that develop in different substrates are variable, frequently unpredictable and their presence is determined by the class ingredient used, elaboration process types and the ecological conditions of the places where these beverages are prepared and consumed. For this reason, the antimicrobial effect of *Pimenta dioica* and the total phenols content were evaluated during the pozol natural fermentation. Pozol dough was prepared from traditional nixtamalized maize (SP) and adding allspice to one treatment (CP). Fermentation observation times were de 0, 12, 24, 36 y 48 h. The analyzed variables were the counts of total mesophyll bacteria, lactic bacteria, coliforms, yeasts and fungi. Coliform strains were isolated and identified with the API System, and the main strains that were found in the pozol SP were *Klebsiella pneumoniae* and *Raoutella terrigena* and *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* in the pozol CP. Physicochemical analysis, pH and titratable acidity, as well as total phenols were determined. It was observed that the amount of *Pimenta dioica* used was not enough to low the microbial content during pozol fermentation. pH and titratable acidity presented values corresponding to a natural fermentation. It was observed that total phenol concentration was not significantly different but both CP and SP treatments were different between them.

**Key words:** natural fermentation, pozol, *Pimenta dioica*, phenolic compounds.

## I. Introducción

Los alimentos fermentados juegan un papel importante en la seguridad alimentaria mejorando los medios de vida, nutrición y el bienestar social de millones de personas en todo el mundo, siendo uno de los métodos de conservación más antiguos y ampliamente utilizados. La fermentación es un proceso dinámico en el que intervienen varias reacciones anabólicas y catabólicas simultáneas dependiendo de la fuente de sustrato, la microflora y los factores ambientales; estas reacciones desempeñan diversas funciones importantes tales como la mejora o creación de sabores únicos, propiedades de cambio de textura y la digestibilidad de los alimentos (Ogunjobi *et al.*, 2005). La producción de alimentos fermentados en condiciones controladas y su calidad dependen del conocimiento y control de la microbiota presente mientras que, en el caso de los alimentos fermentados tradicionales obtenidos mediante una fermentación natural en la que no se añaden inóculos, éstos están constituidos de forma complejas ya que son difíciles de describir mediante el uso de métodos convencionales (Díaz y Wachter, 2003).

La fermentación de alimentos es practicada por todas las culturas del mundo y es una forma de conservar los alimentos. La elaboración de alimentos fermentados no requiere de conocimientos biológicos, es de manera natural porque los microorganismos responsables están en el medio ambiente (Scott y Sullivan, 2008). Un ejemplo de alimento fermentado de forma natural es el pozol, bebida fermentada no alcohólica a base de maíz (*Zea mays* L.), consumidas en el sureste de México, principalmente en los estados de Tabasco y Chiapas. Su consumo tradicional es con maíz sólo o adicionado con algún aditivo como el cacao (*Theobroma cacao*), la pimienta (*Pimenta dioica*), el camote (*Ipomoea batatas*) o el chile (*Capsicum annum*) (Ulloa y Herrera, 1984). En los procesos de fermentación del pozol se desarrolla una gran variedad de microorganismos, dentro de los cuales destacan las bacterias lácticas que acidifican la masa, al igual que los mohos y levaduras que contribuyen a la producción de aromas y sabores (Wachter *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 1999).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que tienen diversas aplicaciones en la industria de los alimentos, siendo una de las principales la



fermentación de la leche, la carne y los vegetales para obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados, entre otros. Asimismo, son de gran utilidad en la producción de vinos y cerveza; contribuyen en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva (Ramírez *et al.*, 2011). El ácido láctico es el principal metabolito producido por las BAL homofermentativas y se ha utilizado como agente sanitizante en carnes con el objetivo de incrementar la seguridad de estos alimentos (Wakil *et al.*, 2008).

Los aditivos son ingredientes que no son alimentos y que se utilizan en el procesado de los alimentos para favorecer su capacidad de conservación, apariencia, sabor, textura o para ayudar en el proceso (Lok *et al.*, 2010). Algunos de estos aditivos naturales se les atribuye una acción antioxidante por lo que son de interés para la industria alimentaria para evitar la rancidez y poseen potencial de protección dentro del cuerpo humano contra los daños causados por especies reactivas al oxígeno (Böhm y Schlesier 2004), ya que contienen sustancias como polifenoles, vitamina C, carotenoides y vitamina E (Franco, 2006). En cuanto a las sustancias utilizadas como conservadores en los alimentos, aun cuando la mayor parte son de origen químico, actualmente también existen diversos productos de origen natural con actividad antimicrobiana y que están presentes en plantas, hierbas y especias (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006).

Todas las bebidas fermentadas tradicionales son elaboradas sin un control preciso, especialmente desde el punto de vista microbiológico, por lo que los tipos de microorganismos que se desarrollan en los diferentes sustratos, para la obtención de las bebidas, son variables, frecuentemente impredecibles y su presencia está determinada por la clase de ingredientes utilizados, las modalidades en los procesos de elaboración y las condiciones ecológicas de los lugares donde son preparadas y consumidas (Ulloa y Herrera, 1984). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de *Pimenta dioica* (L.) Merrill en la fermentación natural del pozol.

## II. Antecedentes

### 2.1. Alimentos fermentados

En la mayoría de los países tropicales, donde los productos lácteos son difíciles de almacenar, la base de la dieta diaria son los alimentos ricos en almidón (yuca, maíz, sorgo, entre otros). Para mejorar las posibilidades de almacenamiento de los alimentos se han utilizado los procesos tradicionales de fermentación natural, que se han desarrollado a lo largo de los siglos (Ben y Ampe, 2000). La fermentación es uno de los métodos de conservación de los alimentos más antiguos y extendidos a nivel mundial. Prácticamente, todas las naciones tienen algún tipo tradicional de productos fermentados por la acción de lactobacilos, ya sea solos o en combinación con otros microorganismos. Se ha visto como un proceso dinámico en el que intervienen varias reacciones anabólicas y catabólicas simultáneas dependiendo de varios factores, tanto de cantidad y tipo tanto de sustrato como de microflora y de ambientales que desempeñan funciones importantes como la mejora o desarrollo de sabores, cambios de textura y la digestibilidad de los alimentos (Ogunjobi *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista bioquímico, la fermentación es un proceso metabólico que genera energía de compuestos orgánicos, sin involucrar un agente exógeno oxidado. La fermentación participa en el procesado de alimentos, principalmente en la conservación a través de la formación de metabolitos inhibitorios (ácidos orgánicos como ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), etanol, bacteriocinas, desarrollo de alimentos a través de la inhibición de patógenos, desarrollo del valor nutricional y mejora de la calidad organoléptica de los alimentos (Bourdichon *et al.*, 2012). La fermentación ocurre de forma anaeróbica en ausencia de aceptores de electrones externos y se libera sólo una pequeña cantidad de energía, en consecuencia, se sintetizan pocas moléculas de Adenosín Trifosfato (ATP). En cambio, si está presente el oxígeno o cualquier otro aceptor terminal, la generación de los productos de la fermentación es innecesaria y la glucosa puede oxidarse por completo hasta CO<sub>2</sub>. Cuando esto ocurre, es posible obtener un rendimiento más alto de ATP (Madigan *et al.*, 2009).

•Durante la fermentación natural de un alimento, ocurre una serie de sucesos naturales que involucran a los microorganismos y cuyo resultado es una población dominada por bacterias ácido-lácticas. Al respecto, Wakil *et al.* (2008) mencionan que, para demostrar el papel de estos microorganismos en los productos fermentados y en la calidad, es esencial cuantificar los grupos predominantes de los mismos e investigar la dinámica de la comunidad total, así como de la calidad final y el almacenamiento de los productos ya que dependen fuertemente de la ruta que llevó a cabo la fermentación.

Los alimentos fermentados juegan un papel importante en la seguridad alimentaria, principalmente mejorando los medios de vida, la nutrición y el bienestar social de millones de personas en todo el mundo. El proceso de fermentación conduce a la conservación de alimentos aumentando la gama de materias primas que pueden utilizarse para producir alimentos, eliminando factores antinutricionales y favoreciendo que los alimentos sean seguros para su consumo (Ogunjobi *et al.*, 2005). Durante el proceso de fermentación, también se mejoran las características sensoriales del sustrato, se aumenta la digestibilidad del mismo y se inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos y sus toxinas (Beltrán-Orozco *et al.*, 2001). En una bebida fermentada natural tradicional indígena denominada “Tej” elaborada en Etiopía a partir de miel estudiada por Bahiru *et al.* (2006), se encontró que en la flora láctica estuvieron presentes especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* y que otros grupos más fueron los lactobacilos y las bacterias coliformes presentaron una reducción en su número debido al pH final del producto. Además, determinaron que la fermentación de las muestras del Tej depende de la microflora natural presente en los sustratos, en los utensilios y en el equipo usado. En estudios realizados por Alvarado *et al.* (2006) en alimentos fermentados tradicionales mexicanos (chorizo, pulque, tepache, queso), identificaron bacterias ácido lácticas a las que se les atribuyó principalmente la reducción de pH por la producción de ácidos orgánicos y la presencia de grupos de *Lactobacillus* y *Lactococcus* que son buenos productores de ácido y podrían contribuir a la inocuidad de los alimentos.

## 2.2. Conocimiento del pozol

El pozol es una bebida elaborada con maíz nixtamalizado y molido para formar una masa de la cual se prepara la bebida, mezclando una porción de ella con agua. Durante la preparación de la masa se le puede agregar cacao tostado y molido, semilla de zapote (piste) o camote (Centurión *et al.*, 2003). En determinados lugares del estado de Tabasco y Chiapas, los consumidores lo envuelven en hoja de plátano (*Musa spp.*) cuando realizan viajes cortos para posteriormente consumirlo durante el almuerzo (Barros y Buenrostro, 2011; Ulloa y Herrera, 1984). Esta masa de pozol también se lleva envuelta en hoja de platanillo (*Heliconia spp.*) o de hoja blanca (*Calathea lutea*), con el objeto de reducir la desecación de la masa durante el tiempo que dure la fermentación, el cual varía de uno a cinco días o más; algunos grupos indígenas como los lacandones y chamulas, dejan fermentar el pozol dos o más semanas y lo consumen ya enmohecido (Ulloa y Herrera, 1984).

Como parte de la cultura del consumo de bebida de pozol, los consumidores lo prefieren agrio (fermentado), condición que se obtiene almacenando a temperatura ambiente la masa de pozol, envuelta en hoja de plátano (*Musa AAB*), de to (*Marantha sp*) o cubierta con un lienzo de tela, durante varios días (de dos a cinco días) (Centurión *et al.*, 2003); durante el almacenamiento ocurre el crecimiento de una diversidad de microorganismos (Wacher *et al.*, 1993).

### 2.2.1. Etnobiología

Se han realizado diversos trabajos que presentan datos etnobiológicos sobre la preparación y los usos del pozol por mestizos y grupos étnicos del sur y sureste de México, como Chontales y Choles de Tabasco; Mayas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo; Lacandones, Tzotziles, Chamulas, Tzeltales, Zoques, Choles y Mames de Chiapas y Zapotecos de Oaxaca (Ulloa y Herrera, 1984). En algunos estados del sur de México, como en La Chinantla, Oaxaca, se prepara el pozol con adición de canela, azúcar y hueso de zapote mamey asado y molido que le confiere un tono almendrado, se mezcla por amasado y se envuelve en hojas de plátano; el cual es conocido en el estado de Chiapas como pozol agrio. También se prepara pozol con cacao o pataste, conocido como cacao silvestre (Barros y Buenrostro, 2011).

• Para su consumo en el estado de Tabasco, se prepara una bebida en la cual la masa de pozol (masa molida y fermentada de maíz nixtamalizado) se mezcla con agua, adicionándole sal, azúcar, miel, chile u otros ingredientes, lo que da lugar a distintas variedades de pozol. No obstante, el ingrediente principal de esta bebida sigue siendo el maíz nixtamalizado y la adición de otros ingredientes se realiza generalmente antes de la fermentación de la masa, observando que la acción de estos ingredientes modifica la textura y el sabor de la bebida final (Centurión y Espinosa, 1996).

En ocasiones el pozol ha sido utilizado para controlar la diarrea u otras afecciones intestinales, probablemente por una acción semejante al uso que hacen otras personas de medicamentos o productos alimenticios que contienen levaduras o lactobacilos (Ulloa y Herrera, 1984). Es importante señalar que también se ha utilizado el pozol con pimienta fermentado por 24 h como inductor de leche materna, el cual se consume durante 30 días después del parto (Comunicación personal, Sra. Susana López Hernández, 2009, Tacotalpa, Tabasco).

### **2.2.2. Diversidad microbiana**

Todas las bebidas fermentadas indígenas son elaboradas sin un control preciso, desde el punto de vista microbiológico, por lo que los tipos de microorganismos que se desarrollan en los diferentes sustratos para la preparación de dichas bebidas, son muy variables; frecuentemente son impredecibles y su presencia está determinada por la clase de ingredientes utilizados, las modalidades en los procesos de elaboración y las condiciones ecológicas de los lugares donde son preparadas y consumidas. Como consecuencia de esto, es muy difícil obtener productos higiénicamente controlados, además, presenten las características apreciadas por los grupos indígenas y mestizos que los consumen de forma habitual (Ulloa y Herrera, 1984).

En un estudio de los microorganismos presentes en pozol comercial y pozol elaborado en condiciones estériles de laboratorio se encontró la presencia de bacterias mesófilas aerobias, bacterias ácido lácticas, levaduras y mohos (Wacher *et al.* (1993). En otros estudios realizados en masas de pozol, se aislaron 46 cepas de bacterias ácido lácticas donde los tipos predominantes fueron 23 cepas de *Leuconostoc*, 10 cepas de lactobacilos homofermentativos, 9 cepas de *Lactococcus* y 4 cepas de

lactobacilos heterofermentativos productores de dextrano (Nuraida *et al.*, 1995). En un estudio microbiológico realizado al pozol utilizando bandas de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizantes (DGGE) realizado por Ben y Ampe (2000), se identificaron comunidades bacterianas de *Streptococcus bovis*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*.

### **2.3. Zea mays L.**

El principal componente del pozol es el maíz (*Zea mays* L.) por lo que es importante hacer una revisión de sus propiedades. La FAO (1993) menciona que el maíz es una palabra de origen indio caribeño, significa literalmente «lo que sustenta la vida». Es, junto con el trigo y el arroz, uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible. Alarcón *et al.* (2011) mencionan que este alimento era un artículo esencial en las civilizaciones maya y azteca. Tenía un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y nutrición.

#### **2.3.1. Etnobotánica**

La evidencia más antigua de la existencia del maíz es de unos 7,000 años de antigüedad y ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México), pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América. Este cereal era un artículo esencial en las civilizaciones mayas y aztecas el cual tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y nutrición (Alarcón *et al.*, 2011). La supervivencia del maíz más antiguo y su difusión se debió a los seres humanos, quienes recogieron las semillas para posteriormente plantarlas. A finales del siglo XV, tras el descubrimiento del continente americano por Cristóbal Colón, el grano fue introducido en Europa a través de España. Se difundió entonces por los lugares de clima más cálido del Mediterráneo y posteriormente a Europa septentrional. Se puede

definir a la planta del maíz como un sistema metabólico cuyo producto final es, en lo fundamental, almidón depositado en unos órganos especializados: los granos (FAO, 1993).

### 2.3.2. Composición química

El grano de maíz está compuesto por un 70 a 75% de almidón, 8 a 10% de proteína y 4 a 5% de aceite, presentes en tres estructuras: el germen (embrión), el endospermo y el pericarpio. El germen constituye del 10 al 12% del peso seco y contiene el 83% de los lípidos y el 26% de la proteína del grano. El endospermo constituye el 80% del peso seco y contiene el 98% del almidón y el 74% de las proteínas del grano (Álvarez, 2006). El pericarpio es la parte estructural más externa del grano. Los tejidos del pericarpio son continuos y forman una cubierta completa de la semilla. El pericarpio es una película cuyo espesor generalmente varía de 60 a 80  $\mu\text{m}$  y está formado por un tejido denso correoso cuya composición es 77.7% fibra, 9.1% proteína, 7.3% almidón, 1% grasa y 4.4% de otras sustancias (Muñoz y Calderón, 1999). El pericarpio constituye el 5 al 6% del peso seco e incluye todos los tejidos de cobertura exterior, con un 100 % de fibras vegetales (Álvarez, 2006). Los compuestos fenólicos en el grano de maíz, están conformados por flavonoides y ácidos fenólicos; estos últimos contribuyen a la tolerancia del grano al ataque de insectos. Los ácidos fenólicos más importantes en el grano de maíz son el ferúlico, p-cumárico y sinápico (Salinas-Moreno *et al.*, 2007).

### 2.3.3. Actividad biológica

El estudio de los compuestos fenólicos es importante por las funciones de algunos de ellos en los mecanismos de defensa de la planta contra el ataque de patógenos así como por sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas y anticancerígenas (Cabrera-Soto *et al.*, 2009). Se han realizado estudios sobre la comparación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos y antocianinas totales de diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) donde encontraron que las concentraciones de compuestos fenólicos en los extractos de las diferentes variedades estuvieron comprendidos entre 170 y 617  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (López y Baeza, 2010). En

reportes de Cabrera-Soto *et al.* (2009), sobre el contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con las propiedades físicas, se menciona que los fenoles libres en el pericarpio variaron entre 107.3 y 181.7 mg g<sup>-1</sup> de materia seca, los fenoles glucosilados de 14.9 a 28.7 mg g<sup>-1</sup> de materia seca y los fenoles esterificados de 86.6 a 137.1 mg g<sup>-1</sup> de materia seca.

#### **2.4. *Pimenta dioica* (L.) Merril**

La pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merril) pertenece a la familia Myrtaceae de distribución mesoamericana y caribeña. Se encuentra distribuida desde el este de México hasta el sudeste. Es una especie que forma parte de la composición del bosque tropical que ha sido utilizada desde tiempo inmemorial por distintas grupos indígenas. En la actualidad se explota como recurso forestal no maderable y aporta un importante ingreso económico a los agricultores. Sus frutos secos se utilizan como condimento y se trata de un producto del mercado nacional mexicano que también se exporta a Alemania, Estados Unidos, Jamaica y Reino Unido (Barco, 1998).

##### **2.4.1. Etnobotánica**

La utilización más extendida de esta planta es como condimento, para lo que se usan los frutos desecados que son muy aromáticos y reúnen las características de aroma y sabor a clavo, canela y nuez moscada, por lo que en inglés se denomina *allspice* (Barco, 1998). La *Pimenta dioica* (L.) Merril es un árbol conocido comúnmente como pimienta, pimienta bomba, pimienta de clavo, pimienta de Jamaica, pimienta dulce, pimienta gorda y pimienta malagueta. Sus frutos y hojas han sido referidos como medicinales, alimenticios e industriales (Martínez *et al.*, 2004). La pimienta ha sido utilizada por las primeras civilizaciones de América Central como aroma para el chocolate y también por su acción antimicrobiana (Rao *et al.*, 2010). También se ha reportado que el aceite esencial presenta un amplio abanico de usos como anestésico, carminativo, estimulante, aromático, antidiarreico y antidisentérico y, desde el punto de vista farmacológico, muestra una notable actividad antifúngica y antioxidante (Barco, 1998).



### 2.4.2. Composición química

La composición química de la pimienta seca es de 13% de humedad, 8% de taninos y 25% de fibra cruda (Barco, 1998). Entre los compuestos químicos de la planta se reportan: vitamina C, aceites esenciales, carbohidratos, taninos, flavonoides, esteroides y alcaloides (Martínez *et al.*, 1997). Las semillas de pimienta contienen entre 3.0-4.5% de aceites esenciales volátiles (en especial eugenol, 65-80%) (Martínez *et al.*, 2004; Barco, 1998), así como resinas, taninos, azúcares y gomas (Martínez *et al.*, 2004). Contiene 0.027% de aceites esenciales en la hoja y se han identificado, por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GS-MS), 10 compuestos principales: 4-terpineol, eucaliptol, cariofileno, óxido de cariofileno, éster metílico del ácido cinámico, eugenol,  $\alpha$ -selineno,  $\alpha$ -terpineol y  $\beta$ -selineno (Vázquez, 2011). Por su parte, Park *et al.* (2007) indican que el eugenol representa el 86.44% de la composición química en el aceite esencial de la pimienta.

### 2.4.3. Actividad biológica

En estudios realizados por Vázquez (2011) sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de la hoja de *P. dioica* por medio del método de difusión en agar, se encontró que se inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella typhimurium* por la presencia del aceite de *P. dioica*. Por otra parte, Borgez-Argáez *et al.* (2010) reportaron que el aceite esencial de la hoja de *P. dioica* presentó actividad biológica frente a *S. aureus*.

Se han realizado estudios con los componentes del aceite esencial de *P. dioica*, como el  $\alpha$ -terpineol y el eugenol, contra bacterias patógenas para el ser humano y se encontró que el  $\alpha$ -terpineol presentó actividad inhibitoria *in vitro* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus typhimurium*, *S. aureus*, *Leuconoctus monocytogenes* y *B. cereus* (Consentino *et al.*, 1999), mientras que el eugenol presentó actividad antibacteriana en un rango de 1.0 a 0.5  $\mu\text{l mL}^{-1}$  para *E. coli*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* (Kim *et al.*, 1995).

Se ha encontrado que los componentes de los aceites esenciales de *Trachyspermum ammi*, *P. dioica* y *Litsea cubeba* son útiles como nematocidas para *B. xylophilus* (Park *et al.*, 2007). Para el uso práctico de estos tres aceites esenciales y

sus componentes como nueva fuente nematocida, estos mismos autores mencionan que se necesitan estudios adicionales sobre la fitotoxicidad, acción sistémica y formulación para mejorar la potencia nematocida, estabilidad y reducción de costos.

## **2.5. Actividad antimicrobiana de origen natural en los alimentos**

Las plantas no solo se consumen como alimento por los humanos, en muchas ocasiones se emplean para añadirle sabor, olor o inhibir la proliferación de microorganismos en los mismos (Cabello y Belloso, 2009). Con estos fines se ha empleado la planta completa o algunas de sus partes como la raíz, hoja, tallo, flor, semilla, fruto o extractos de estas partes. Han sido capaces de protegerse del ataque de diversos microorganismos patógenos, produciendo grandes cantidades de metabolitos secundarios, con función protectora, mediante sustancias químicas con actividad antimicrobiana. Entre los metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos. La toxicidad de los fenoles se atribuye a la oxidación de compuestos, los terpenos están involucrados en el rompimiento de la membrana, a través de los compuestos lipofílicos, mientras que las lectinas y polipéptidos pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la exclusión competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero. Los aceites esenciales han demostrado poseer características insecticidas, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Borboa-Flores *et al.*, 2010). Las especias y condimentos se han convertido en una parte integral de la dieta humana para impartir sabor y color a la comida., también son considerados como nutraceuticos en vista de sus propiedades nutricionales, medicinales y terapéuticas (Ani *et al.*, 2006).

Las hierbas y especias comestibles, como el orégano, romero, tomillo, salvia, albahaca, cúrcuma, jengibre, ajo, nuez moscada, clavo, macís e hinojo, han sido utilizados con éxito solos o en combinación con otros métodos de preservación (Burt *et al.*, 2007; Sandasi *et al.*, 2008). Estas especias y hierbas exhiben actividad antimicrobiana; entre las más usadas en alimentos se encuentran el apio, cilantro, laurel, almendra, albahaca, café, puerro, rábano picante, hierbabuena, tomillo, entre

otros (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006). Estas plantas ejercen efectos directos o indirectos en el aumento de la vida útil de los productos alimenticios como agentes antimicrobianos contra una variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Sin embargo, su eficacia depende del pH, la temperatura de almacenamiento, la cantidad de oxígeno, la concentración de aceite esencial y componentes activos del mismo (Burt *et al.*, 2007; Sandasi *et al.*, 2008). La actividad antimicrobiana es uno de los efectos evidentes de dichos extractos contra patógenos de origen alimentario. Su efecto depende de su fuente de origen, método de extracción y el nivel de sustancias que contiene. De forma individual deben ser utilizados en una alta concentración para observar efectos comparables con antibióticos (Cabello y Belloso, 2009).

Actualmente, ha surgido la necesidad de buscar alternativas para la conservación de los alimentos debido a que el consumo de conservadores químicos se asocia con intoxicaciones. Por lo que el empleo de plantas como conservadores de alimentos ha aumentado desde la década de 1990, con más de un uso de las especias y de sus aceites esenciales naturales como bio-conservadores para aumentar la vida útil y, en general, la calidad de los alimentos reduciendo o eliminando los microorganismos patógenos (Simitzis *et al.*, 2008).

La estabilidad de algunos alimentos frente al ataque de los microorganismos se debe a la presencia de determinadas sustancias naturales en las que se ha demostrado que tienen actividad antimicrobiana (Jay, 2002). Diversos ensayos revelan que las plantas representan una fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos de origen natural (Zampini y Cudmani, 2007). Por otra parte, a las plantas también se les atribuye otras propiedades como son el efecto antioxidante, regulación del sistema hormonal, actividad antibacteriana y antiviral (Navas *et al.*, 2007).

Los agentes antimicrobianos actúan sobre la estructura de la célula bacteriana y sobre sus procesos metabólicos y sus posibles modos de acción, como la desnaturalización de proteínas, rompimiento de la membrana o la pared celular, remoción de grupos sulfhidrilos libres, interferencia con reacciones enzimáticas de los márgenes y por acción sobre el ADN (Llop *et al.*, 2001). En la actualidad, la mayoría de los agentes antimicrobianos producidos en forma sintética también se encuentran en forma natural como componentes de ciertos alimentos; estos compuestos químicos con

acción antimicrobiana pueden clasificarse como aditivos tradicionales con acción directa o indirecta (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006).

En general, cada día se descubren más plantas, o partes de estas, que contienen antimicrobianos naturales como los que incluyen: compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas, por lo que no solo se tendrá mayor seguridad sino mejor calidad de los alimentos ya que este tipo de antimicrobianos se consideran como fuentes potencialmente seguras (Sauceda, 2011).

### **2.5.1. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos es un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras químicas y actividad; son importantes constituyentes de las plantas y, a su vez, les otorgan múltiples efectos benéficos. Los polifenoles presentan una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo la actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antihipertensiva, estrogénica, antioxidante y efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares (Muñoz y Ramos 2007).

El efecto de los componentes de las plantas en el organismo casi siempre se observa a partir del conocimiento popular del uso tradicional y repetitivo. Se sabe que los vegetales y las frutas tienen diferentes componentes fitoquímicos responsables de propiedades terapéuticas, como es su actividad antioxidante, anti-mutagénica y propiedades anticancerígenas (Nunes *et al.*, 2011). El efecto antioxidante de las legumbres y frutas se atribuye a la presencia de polifenoles, vitamina C, carotenoides y vitamina E (Franco, 2006). Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, siendo parte importante tanto en la dieta humana y animal; constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8,000 compuestos distintos (Martínez-Valverde *et al.*, 2000). Entre los compuestos fenólicos están los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estibilenos y curcunoides (Cuadro 1). Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos (A y B) ligados mediante un anillo pirano, lo cual deja un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6, común en la mayoría de estos compuestos

(Escamilla *et al.*, 2009). Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilos (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Los compuestos fenólicos como los flavonoles, típicamente presentes en frutas y en el té verde, tienen actividad antibacteriana. Mientras que Puupponen-Pimiä *et al.* (2001) demostraron que la miricetina, utilizada como compuesto químico puro, inhibe el crecimiento de bacterias ácido lácticas, derivadas de la flora del tracto gastrointestinal de humanos, pero no afectó al crecimiento de *Salmonella*, mientras que los extractos preparados directamente a partir de fresas, frambuesas y otras frutas fueron fuertes inhibidores de *Salmonella* y *E. coli*.

**Cuadro 1. Distribución de componentes fenólicos**

Componentes fenólicos	Grupos	Compuestos	Posición OH	Número OH	
<b>1. Ácidos fenólicos</b>	Hidroxicinámico	caféico	3,4-OH	2	
		clorogénico	3,4 OH	2	
		-p-cumárico	4-OH	1	
	Hidroxibenzoico	ferúlico	gálico	4-OH	1
			siringico	3,4,5-OH	3
		vanílico	galato	4-OH	1
			catequina	5,7,3,4,5,3,4,5-OH	8
<b>2. Flavonoides</b>	Flavan-3-ol (flavanoles)	(-)-epigalo galato (EGCG)	5"-OH	7	
		(-)-epicatequina galato (ECG)	5,7,3,4,3,4,5-OH	6	
		(-)-epigalocatequina (EGC)	3,5,7,3,4,5-OH	5	
		(-)-epicatequina (EC)	3,5,7,3,4-OH	5	
		(+)-catequina (C)	3,5,7,3,4-OH	6	
	Flanoles	miricetina	3,5,7,3,4,5-OH		

	quercetina		3,5,7,3,4-OH	5
	morina		3,5,7,3,4,-OH	5
	kaempferol		3,5,7,4-OH	4
	quercetina-3-rutinosido (rutina)		5,7,3,4-OH	4
Chalconas	buteína		2,4,3,4-OH	4
	floretina		2,4,6,4-OH	4
	cartamina		4.5.4-OH	3
Flavonas	luteolina		5,7,3,4-OH	4
	baicaleína		5,6,7-OH	3
	apigenina		5,7,4-OH	3
Flavanonas	naringenina		5,7,4-OH	3
	hesperetina		5,7,3-OH	3
	naringenina-7-rutinosido		5,4-OH	2
	hesperetina-7-rutinosido		5,3-OH	2
Isoflavonas	genisteina		5,7,4-OH	3
	daidzeina		7,4-OH	2
	gliciteina		7,4-OH	2
	genisteina-7-glucósido		5,4-OH	2
<b>3. Taninos</b>	catequina	3-o-galato	5,7,3,4,3,4,5-OH	7xn=7
	(monómero)		(n=1)	
	procianidina	b-1	3,5,7,3,4-OH	5xn=10
	(dímero).		(n=2)	
	procianidina	b-2 digalato	5,7,3,4,3,4,5-OH	7xn=14
	(dímero)		(n=2)	
	procianidina	c-1 (trímero)	3,5,7,3,4-OH	5xn=15
			(n=3)	
<b>4. Estilbenos y curcuminoides</b>	Estilbenos	piceatanol	3,5,3,4-OH	4
		resveratrol	3,5,4-OH	3
		piceatannol-3-glucósido	3,5,4-OH	3
		resveratrol-3-glucósido	5,4-OH	2
Curcuminoides	curcumina		8,8-OH	2

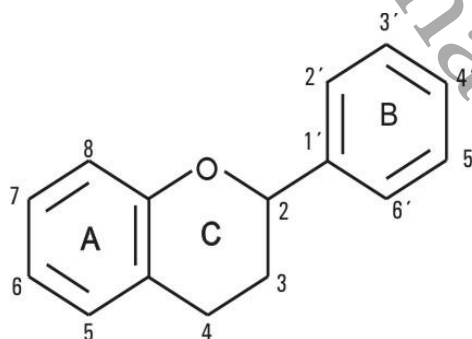
demetoxicurcumina	8,8-OH	2
bisdemetoxicurcumina	8,8-OH	2

**Fuente:** Muñoz y Ramos, 2007.

### 2.5.1.1. Flavonoides

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soya, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual (Martínez-Flores *et al.*, 2002; Muñoz y Ramos, 2007) y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales junto con vitaminas y minerales. Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como el arándano, ginkgo biloba y cardo. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

Se han identificado más de 5,000 flavonoides diferentes cuya actividad como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de su estructura química. En la Figura 1 se muestra la estructura básica de un flavonoide, la cual permite una diversidad de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.



**Figura 1.** Estructura general de un flavonoide.

Se han realizado ensayos para el análisis de la actividad antibacteriana de las chalconas, flavonas y flavononas, tanto sintéticas como naturales, con el fin de determinar las sinergias de las combinaciones de flavonoides en contra de *S. aureus*, *E. coli* y *Enterobacter aerogenes*, encontrando que las combinaciones de flavonoides presentaron un mayor efecto contra *E. coli* que en *S. aureus* debido a la presencia de porinas en la membrana exterior de las bacterias Gram negativas (Alvarez *et al.*, 2008).

## 2.6. Calidad microbiológica de los alimentos

Existen diversos géneros de microorganismos presentes en la naturaleza; sin embargo, bajo condiciones normales, un alimento suele albergar pocos tipos. Entre estos microorganismos se incluyen los presentes en forma natural en los alimentos crudos, que proporcionan un nicho ecológico y los que provienen de fuentes externas debido a la exposición que sufren los alimentos desde su producción hasta su consumo (Ray y Bhunia, 2010). El nivel de población de cada tipo de microorganismo presente inicialmente en un alimento depende de las condiciones intrínsecas y extrínsecas a las que se expone el alimento. Por ello, si llegara a presentarse crecimiento de microorganismos, los tipos predominantes serán aquellos para los que exista una condición óptima en el alimento. Se debe reconocer que la carga microbiana en un alimento es el resultado de la contaminación inicial por diferentes fuentes y por el crecimiento de contaminantes antes de las pruebas microbiológicas y, por lo general, es difícil separar ambos (Jay *et al.*, 2005). La información acerca de la carga microbiana normal ayuda a determinar la calidad microbiológica de un alimento y también establece estándares y especificaciones microbiológicas del mismo. Se espera que los alimentos que se producen en condiciones higiénicas y con métodos de conservación apropiados tengan una menor carga microbiana. Cabe señalar que la presencia microbiana no reduce la calidad del alimento, excepto en el caso de la existencia de algunos patógenos y, en algunos casos, es necesario que los microorganismos crezcan y se multipliquen en el alimento para generar cambios definitivos en su calidad (Ray y Bhunia, 2010).



• En los términos de la microbiología de los alimentos, la calidad comprende tres aspectos: la Inocuidad donde el alimento no debe contener niveles de un patógeno o de su toxina que sea probable que causen trastornos cuando se consume aquél; aceptabilidad/vida comercial donde un alimento no debe contener niveles de microorganismos suficientes para convertirlo en alterado desde el punto de vista organoléptico en un tiempo inadmisiblemente corto; y la estabilidad donde un alimento debe ser de calidad constante tanto con respecto a su inocuidad como respecto a su vida comercial. El consumidor no admitirá productos que presenten grandes variaciones en cuanto a su vida comercial de un lote a otro y evidentemente no está dispuesto a contraer alguna enfermedad cada vez que come un determinado producto (Adams y Moss, 1997).

### **2.6.1. Indicadores de patógenos bacterianos en los alimentos**

Existe un gran número de posibles razones de la presencia de los indicadores microbianos y la ausencia de patógenos, o viceversa, en los alimentos; es decir, no existe una correlación directa entre el número de cualquier indicador y los patógenos de tipo entérico. Los indicadores microbianos se emplean a menudo para estimar la seguridad microbiológica e higiene de los alimentos, sugerir la presencia de patógenos y evaluar la calidad microbiológica (Ashbolt *et al.*, 2001).

Un indicador de seguridad alimentaria debe satisfacer los siguientes criterios: ser detectable fácil y rápidamente; distinguirse de otros miembros de la microbiología de los alimentos; tener un historial de asociación constante con el patógeno de cuya presencia es indicador; encontrarse siempre en el producto cuando el patógeno esté presente; ser un microorganismo cuyo número debería correlacionarse con el patógeno en cuestión; tener requerimientos y velocidad de crecimiento iguales o exceder a los que ostenta el patógeno; tener una cinética de muerte que al menos sea paralela con la del patógeno e idealmente que persista un tiempo ligeramente superior al del patógeno en cuestión; estar ausente en alimentos en los que el patógeno no esté, aunque quizá pueda estar presente en determinado número mínimo (Jay *et al.*, 2005).

Cuando se aplican criterios microbiológicos para garantizar la seguridad de los alimentos, el objetivo último es reducir o eliminar un potencial riesgo de toxiinfección

alimentaria. En los productos alimenticios que sufren con frecuencia la contaminación por microorganismos dañinos, puede ser benéfica la aplicación de criterios microbiológicos. Dependiendo de la naturaleza del patógeno en cuestión, pueden ser importantes o no niveles bajos de un microorganismo en el producto. Algunos microorganismos tienen una dosis infectiva tan baja que la sola presencia de alguno de ellos en el alimento representa un riesgo sanitario significativo. Para tales microorganismos, el interés no es si el patógeno tiene o no capacidad de multiplicarse en el alimento sino si el microorganismo puede sobrevivir durante un tiempo en el alimento. Por ejemplo, la presencia de *E. coli* en el agua potable indica una posible contaminación fecal y, por lo tanto, la presencia potencial de patógenos entéricos (Smoot y Pierson, 1997).

## **2.7. Métodos de identificación de microorganismos**

Los microorganismos juegan un rol muy importante, dado que son benéficos para su salud o economía (probióticos, fijadores de nitrógeno, entre otros) o bien patógenos para el humano o para los animales y plantas económicamente importantes. Dado lo anterior, se ha desarrollado una serie de metodologías para poder diferenciar un microorganismo de otro y para poderlos identificar (Rodríguez-Herrera *et al.*, 2009).

Para entender la presencia y el crecimiento de los microorganismos en los alimentos se reconoce en la actualidad la importancia de su estudio con un enfoque ecológico. La producción de alimentos fermentados en condiciones controladas y su calidad dependen del conocimiento y control de la flora presente. Los alimentos fermentados tradicionales se obtienen mediante fermentaciones naturales (en las que no se añaden inóculos) y están constituidos por microbiotas complejas, que son difíciles de describir mediante el uso de métodos convencionales. Existen diferentes alternativas para la determinación de la estructura microbiana de estos alimentos. Una de ellas consiste en aislar microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en el DNA (Díaz y Wachter, 2003).

La tipificación de la cepa bacteriana, o identificación de bacterias a nivel de cepa, es particularmente importante para el diagnóstico, el tratamiento y la vigilancia epidemiológica de infecciones bacterianas. La tipificación de la cepa también tiene

aplicaciones en el estudio de la dinámica de poblaciones bacterianas. En las últimas dos décadas, los métodos moleculares han sustituido progresivamente ensayos fenotípicos para escribir las cepas bacterianas (Li *et al.*, 2009).

### **2.7.1. Métodos convencionales o tradicionales**

Las técnicas de identificación de las bacterias basadas en el cultivo y las características fenotípicas, son laboriosas y pueden requerir varias semanas para obtener resultados, lo cual no resulta viable cuando se analizan alimentos perecederos como los lácteos y la carne fresca (Rojas-Herrera y González-Flores, 2006). Existe una necesidad clara de identificación de microorganismos en muestras ambientales que ofrezca un acercamiento para entender las comunidades microbianas en sistemas biológicos con usos específicos en el tratamiento, de la salud pública y la biorremediación, ya que las técnicas tradicionales utilizadas en el análisis de las estructuras y la dinámica de las comunidades microbianas, además de la dificultad de detectar los microorganismos no cultivables presentes en la muestra, hacen necesario un aislamiento que implica tiempos largos de análisis y falta de confiabilidad en los resultados (Cárdenas *et al.*, 2003).

### **2.7.2. Métodos moleculares**

La aplicación de la microbiología molecular es un área de rápido movimiento. Una de las ramas de esta disciplina está implicada en el desarrollo de métodos moleculares para la identificación y el seguimiento de los microorganismos en los ecosistemas naturales. Los métodos en microbiología molecular se han convertido en un soporte válido para las técnicas tradicionales. Durante los últimos años, la identificación de bacterias basada en métodos moleculares, especialmente las que incluyen la secuenciación de los genes que codifican ADN 16S ribosomal, se ha convertido en una herramienta muy importante en el estudio de las comunidades bacterianas en muestras ambientales (Danilo, 2004).

En las últimas dos décadas, los métodos moleculares han sustituido progresivamente ensayos fenotípicos para describir las cepas bacterianas. Por lo que los métodos actuales de genotipado bacteriano son clasificados en tres categorías

principales: (1) métodos basados en ADN bacteriano, que clasifican de acuerdo con el tamaño de los fragmentos generados por la amplificación y/o digestión enzimática de ADN genómico, (2) los métodos de secuenciación de ADN, que estudian el polimorfismo de secuencias de ADN y (3) métodos basados en hibridación de ADN, utilizando sondas nucleotídicas (Li *et al.*, 2009).

México.

### III. Justificación

Un alimento funcional se define como aquel que ha demostrado en forma suficiente la actividad benéfica sobre una o más funciones del cuerpo, más allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad (Lorente y Serra, 2001). Los compuestos naturales de los alimentos, llamados fitoquímicos, son sustancias que se encuentran en los tejidos provenientes de plantas comestibles que los seres humanos pueden ingerir a diario en pequeñas cantidades y exhiben un potencial para modular el metabolismo humano de manera favorable para prevenir ciertas enfermedades (Bonafine *et al.*, 2006). El efecto benéfico de los alimentos vegetales se atribuye principalmente a sustancias con actividad antioxidante, como los compuestos polifenólicos, el ácido ascórbico (vitamina C), los carotenoides y la vitamina E, los antioxidantes protegen a la célula del daño causado por los radicales libres (Franco, 2006). Por otro lado, las sustancias antimicrobianas presentes en los aceites esenciales sirven para combatir microorganismos patógenos y bacterias de deterioro de los alimentos (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Los alimentos fermentados tradicionales mexicanos, como las bebidas a base de maíz (tesgüino) y el queso “de poro”, al ser producidos de forma regional no se conocen fuera del lugar donde son consumidos. A diferencia de otras bebidas tradicionales mexicanas de importancia, como el mezcal y el tequila, que se originan en procesos fermentativos y luego son destiladas, el pozol es una bebida fermentada no alcohólica de maíz (*Zea mays* L.) consumida en el sureste de México, principalmente en los estados de Chiapas y Tabasco, así como en algunos países Centroamericanos. Los productos fermentados presentan ventajas en seguridad, conservación y valor nutritivo. Sin embargo, la aceptación y seguridad sanitaria no han sido suficientemente evaluadas en estos productos (Vera *et al.*, 2010). Una gran variedad de microorganismos se desarrollan en el pozol, dentro de la cual se ha demostrado que las bacterias lácticas son el principal grupo microbiano presente (Farrés *et al.*, 1999) que acidifican la masa y los mohos y las levaduras que contribuyen a la producción de aromas y sabores, aumentan sus cualidades nutritivas pues, aunado a los valores alimenticios propios del maíz, el proceso de fermentación.

• Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano de la adición de *Pimenta dioica* en el pozol y se determinó la concentración de fenoles totales durante la fermentación natural del mismo a temperatura de  $32 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para ello, se realizó el estudio de la dinámica poblacional microbiana que se presentó en la fermentación del pozol aislando las bacterias indicadoras de calidad higiénica de los alimentos.

México.

## **IV. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto antimicrobiano de *Pimenta dioica* en el pozol fermentado.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Cuantificar los cambios en las poblaciones microbianas totales durante la fermentación natural del pozol con y sin adición de *Pimenta dioica*.
- Aislar las bacterias coliformes con mayor predominancia en la fermentación natural del pozol, identificándolas mediante el sistema API.
- Determinar el contenido de fenoles totales durante el proceso de fermentación natural del pozol.

## **V. Materiales y métodos**

### **5.1. Lugar del desarrollo del trabajo**

El estudio del proceso de fermentación se realizó en el Laboratorio de Etnobotánica, la determinación de fenoles totales se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos y la cuantificación de los microorganismos en el Laboratorio de Compuestos Bioactivos, de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, ubicada en el Km 25 de la Carretera Villahermosa-Teapa, en el Municipio del Centro, Tabasco. La identificación de las cepas aisladas de coliformes se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en la Ciudad de México, D.F.

### **5.2. Materias primas y medios de cultivo**

En el mes de septiembre de 2011, se compraron 15 kg de granos de maíz (*Zea mays* L.) con un productor, Señor Eduardo de la Cruz, de la variedad tuxpeño, en la comunidad Cerro Blanco 5ª Sección del Municipio de Tacotalpa, del estado de Tabasco; esto con la finalidad de tener un solo tipo de maíz. La pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merril) se adquirió con el Señor Alberto Pérez en el poblado Jahuacapa del Municipio de Jalapa, del estado de Tabasco, recién cosechada. La cal se compró en la tienda CONASUPO ubicada en la Ranchería La Huasteca 2ª Sección, del estado de Tabasco. Los medios de cultivo utilizados fueron: Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV; Bioxon), Agar de Mann Rogosa Sharpe (MRS; Difco), Agar Papa Dextrosa (PDA; Bioxon), Agar Cuenta Estándar (ACE; Bioxon).

### **5.3. Elaboración y fermentación**

El pozol se elaboró de forma tradicional a partir de 1.5 kg de maíz por cada lote. El proceso inició con la nixtamalización que consistió en adicionar los granos de maíz a una solución de cal  $\text{Ca(OH)}_2$  al 2.5% en una relación de 1:2 (p/v) de maíz:agua que se mantuvo en ebullición durante 60 minutos, hasta el desprendimiento del pericarpio del grano. Se dejó reposar 5 min y se procedió a lavar con agua potable, por cinco veces,



hasta eliminar el pericarpio de los granos de maíz. Después se molió el maíz en un molino eléctrico marca Estrella con motor de 0.5 HP. Una vez obtenida la masa, se homogenizó manualmente adicionando agua purificada comercial en una relación 6:1 (p/v) masa:agua (Comunicación personal, Sra. Elsa María Jiménez Castillo, 2011). La pimienta (*Pimenta dioica* L.) se molió en un molino para especias marca KRUPS GX4100 y se tamizó en una malla número 20. Para preparar el pozol de maíz con pimienta, se adicionó el 2% de pimienta molida a la masa de pozol.

#### **5.4. Proceso de fermentación natural**

Se preparó un lote, por triplicado, para el tratamiento de pozol con pimienta (CP) y otro lote para el tratamiento de pozol sin pimienta (SP). Cada lote se fraccionó en porciones de 100 g que se colocaron en recipientes de 24 x 18 cm de PVC (policloruro de vinilo) sin tapa cubiertos con gasa para protegerlos del polvo y se incubaron a una temperatura de  $32 \pm 2$  °C, para el proceso de fermentación natural, en una estufa Marca Carbolite. Durante la fermentación, se tomaron muestras por lote cada 12 h (0, 12, 24, 36 y 48 h).

#### **5.5. Análisis microbiológicos**

##### **5.5.1. Preparación de las muestras para el análisis microbiológico**

La preparación y dilución de la muestra para el análisis microbiológico se realizó de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994, preparando una dilución primaria con 10 g de la muestra colocada en condiciones asépticas en una bolsa con sello tipo cierre (Zipper Seal, Member's Mark<sup>MR</sup>), a la cual se le agregaron 90 ml de agua peptonada al 0.1% estéril y se homogenizó moviendo la bolsa con las manos durante dos minutos. A partir de esta primera dilución, se prepararon diluciones decimales consecutivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) (NOM-110-SSA1-1994). Posteriormente, se sembró un inóculo de 0.1 mL de estas siete diluciones por duplicado en cajas Petri con el medio de cultivo estéril y solidificado, correspondiente a cada tipo de microorganismo, y distribuyendo en forma uniforme sobre la superficie del agar con una asa de Digrafsky de vidrio.

## **5.5.2. Microorganismos estudiados**

### **Microorganismos mesófilos aerobios totales**

Para este tipo de microorganismos se utilizó el Agar para Cuenta Estándar (ACE; Bioxon) y las placas se incubaron invertidas a una temperatura de  $30\pm 1$  °C durante 24 h, contando las placas de las diluciones que presentaron entre 25 y 250 colonias (NOM-092-SSA1-1994).

### **Bacterias ácido lácticas**

Estas se enumeraron por el método de conteo en placa en el medio Agar de Mann Rogosa Sharpe (MRS; Difco). Las cajas inoculadas se incubaron invertidas a una temperatura de  $30\pm 1$  °C durante 48 h (Wacher *et al.*, 1993).

### **Bacterias coliformes totales**

Las muestras se inocularon en placas con Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV; Bioxon) y se incubaron invertidas a una temperatura de  $30\pm 1$  °C durante 24 h y se contaron las placas de las diluciones que presentaron de 25 a 250 colonias (NOM-113-SSA1-1994).

### **Levaduras y Hongos**

Las diluciones se inocularon en placas con Agar Papa Dextrosa (PDA; Bioxon) y se incubaron invertidas a una temperatura de  $30\pm 1$  °C durante 48 h, contando las placas de las diluciones que presentaron de 10 a 150 colonias (NOM-111-SSA1-1994).

## **5.5.3. Aislamiento e identificación de bacterias coliformes**

### **Aislamiento**

Para la identificación de las bacterias coliformes presentes en ambos tratamientos, se realizó el aislamiento y la purificación de las colonias que crecieron en el Agar Rojo Violeta Bilis (ARGB) durante la fermentación. Se seleccionaron las colonias con crecimiento característico después de 24 h de incubación a una temperatura de 37 °C, es decir, las que presentaron color rojo o rosa con precipitado y/o halo rojo alrededor (NOM-113-SSA1-1994). El aislamiento se realizó con

resiembras sucesivas en ARVB y la pureza de las colonias se comprobó mediante la observación microscópica de bacilos cortos Gram negativos.

### **Identificación**

Una vez comprobada la pureza de cada colonia, se realizaron las pruebas de catalasa y de oxidasa de acuerdo a lo recomendado por Fernández *et al.* (2010). La prueba de la oxidasa se realizó en el Cepario de la Facultad de Química de la UNAM usando como control positivo una cepa de *Vibrio cholerae* N00-1, crecida por 48 h en caldo BHI a una temperatura de 37 °C. Se seleccionaron las colonias que resultaron catalasa positiva y oxidasa negativa.

La identificación se realizó con el sistema API® 20E, que es un sistema estandarizado que permite la identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes, incluye 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas (Anexo 1), así como una base de datos en línea. Cada cepa seleccionada se sembró por estría cruzada, bajo condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar, en agar nutritivo y se incubó a una temperatura de 37 °C por 18 h. Se realizó una suspensión de cada cepa bacteriana (equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland) en 0.5 ml de solución salina al 0.85% (Anexo 2) y se sembró en una galería del sistema siguiendo las instrucciones del fabricante (API, 2010) (Anexo 3). Se sellaron los extremos de las galerías y se incubaron a 37 °C por 18 h y los resultados se leyeron de acuerdo a las instrucciones y utilizando los reactivos para revelar las pruebas bioquímicas proporcionados por el fabricante del sistema. De cada lectura se generó un código de 7 dígitos que se introdujo a la base de datos del sistema en la página electrónica de Biomérieux (bajo licencia concedida a la UNAM) la cual generó una hoja de identificación de la cepa. Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **5.6. Análisis fisicoquímicos**

### **5.6.1. Análisis de pH**

Las muestras para la determinación del pH se procesaron inmediatamente después de tomarlas (Ben y Ampe, 2000). Para medir este parámetro se adicionaron 50 mL de agua destilada a 5 g de muestra para cada tiempo de muestreo, se homogenizó manualmente con una varilla de vidrio durante 30 segundos aproximadamente y después se procedió a tomar la lectura de unidades de pH con un potenciómetro Hanna Instruments, pH 213, previamente calibrado.

### **5.6.2. Análisis de acidez titulable**

Esta fue determinada en una muestra de pozol diluida en agua 1:10 (p/v) por titulación con NaOH 0.1 N hasta alcanzar un valor de pH final de 8,5; el valor de acidez titulable se expresó en ml gastados de NaOH 0.1 N (Gatto y Torriani, 2004).

## **5.7. Determinación de fenoles totales**

El contenido de fenoles totales se determinó utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu (modificado de Othman *et al.* 2007), protegiendo de la luz las muestras y soluciones preparadas con papel aluminio. Para ello, se preparó una curva de calibración utilizando como patrón una solución estándar de ácido gálico en un rango de concentración de 0.0 a 0.1 mg L<sup>-1</sup> (Anexo 4). La concentración de fenoles totales se expresó como el equivalente de ácido gálico (EAG) en mg por g de pozol.

Para preparar la curva estándar de ácido gálico (Anexo 4), se pesaron en una balanza analítica (Modelo: PW 124, Marca: ADAM) 5 mg de ácido gálico, en papel aluminio, e inmediatamente se vertió en un matraz aforado de 50 mL agregando 5 ml de etanol al 70 % y disolviendo completamente, lavando el vaso dos veces con etanol al 70% con porciones de 5 ml antes de aforar el matraz.

Para la preparación del bicarbonato de sodio, se pesaron en una balanza analítica (Modelo: PW 124, Marca: ADAM) 9.4 mg y se vertió en un matraz aforado de 200 mL, se le agregaron 5 ml de agua destilada disolviendo bien antes de aforar el matraz. En una serie de tubos falcón de 50 ml se agregó ácido gálico en las siguientes cantidades: 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml. A cada tubo se le adicionó 0.750 mL de

reactivo de Folin-Ciocalteu (guardado en refrigeración hasta su uso) dejándose en reposo durante 5 min. Posteriormente, se le añadió 0.750 mL de la solución de bicarbonato de sodio (0.566 M) y se dejó en incubación durante 90 min a temperatura ambiente leyendo posteriormente la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Modelo: AAnalyst 100, Marca: PERKIN ELMER). Se preparó un blanco con todos los reactivos excepto la solución de ácido gálico. Los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (Othman *et al.*, 2007).

Para determinar el contenido total de fenoles durante la fermentación, se pesó la cantidad de 5 g de la muestra de pozol de cada tratamiento (CP y SP) en una balanza analítica (Modelo: PW 124, Marca: ADAM) y se agregó a un tubo con tapón de rosca adicionando 5 mL de etanol acuoso al 70% y agitando en un Vortex (Maxi Mix II) durante tres minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 400 rpm durante 30 min en una centrífuga (Marca: Dynamic® II Centrifuge, Modelo: Becton Dickinson). De los sobrenadantes obtenidos de cada tratamiento se tomó una alícuota de 5 mL colocándola en un tubo falcón de 50 ml y se adicionaron 5 mL de etanol al 70%. Se le agregó 0.750 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo durante 5 min y agregando 0.750 mL de solución de bicarbonato de sodio (0.566 M). Después se incubó durante 90 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Modelo: AAnalyst 100, Marca: PERKIN ELMER). Los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (Othman *et al.*, 2007).

### **5.8. Diseño experimental y Análisis Estadístico**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, determinando la diferencia significativa entre medias mediante una prueba "t" para medias de dos muestras emparejadas con un nivel de significancia de  $p \leq 0.5$  usando el paquete estadístico Excel® 2010 (Meyer, 2012).

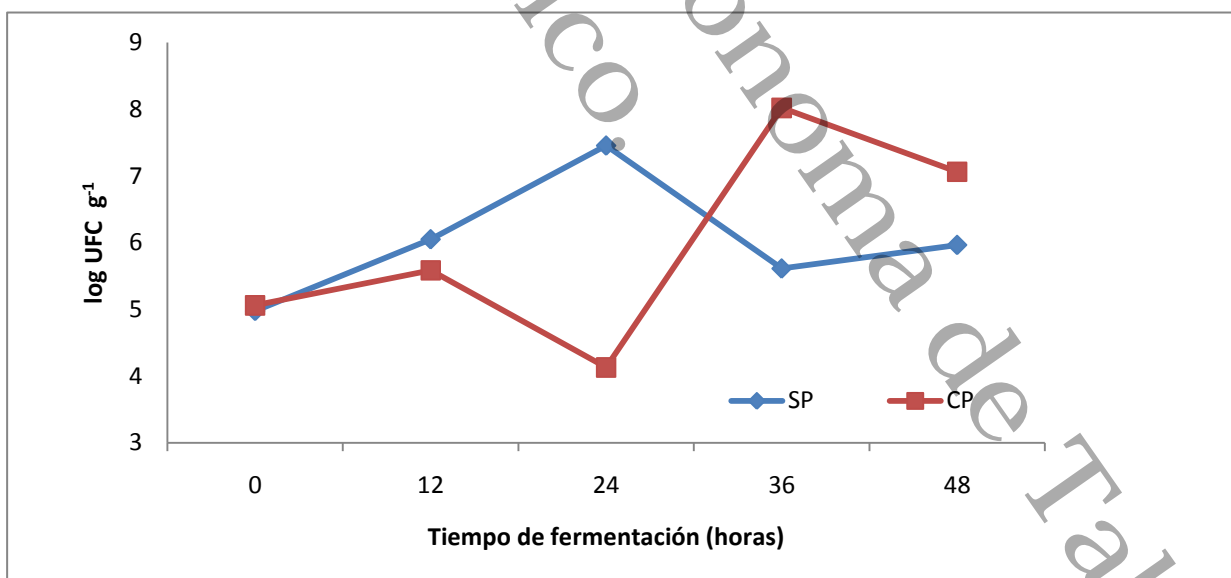
## VI. Resultados y discusión

La dinámica de la comunidad microbiana durante la fermentación natural del pozol CP y SP fue monitoreada durante 48 horas. La microflora total y de los grupos específicos se cuantificó por medio de cultivo selectivos.

### 6.1. Cuantificación de la microflora durante la fermentación natural de pozol

#### 6.1.1. Microorganismos mesófilos aerobios totales

Durante el desarrollo de la fermentación natural del pozol se encontró que al inicio de la misma, la cantidad de microorganismos mesófilos aerobios totales fue similar en los dos tratamientos (Figura 2). Para el tratamiento de pozol CP la cantidad de mesófilos aerobios totales a las 24 h fue menor  $4.1 \log \text{ UFC g}^{-1}$ , presentándose a las 36 h la mayor cantidad; mientras que el mayor crecimiento en el tratamiento de pozol SP se alcanzó a las 24 h con  $7.45 \log \text{ UFC g}^{-1}$ , con una tendencia a disminuir a las 48 h presentando sólo diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) a las 24 h (Anexo 5), lo que podría deberse al pH alcanzado en este tiempo afectando el crecimiento de dichos microorganismos.

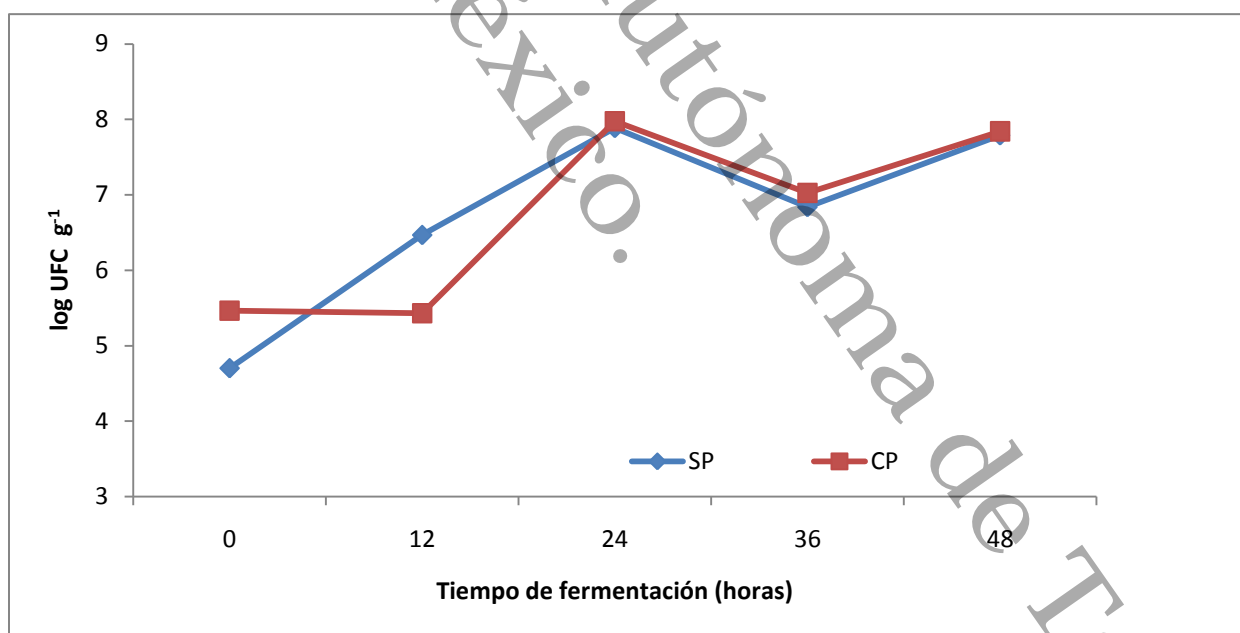


**Figura 2.** Microorganismos Mesófilos Aerobios Totales ( $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ) presentes en la fermentación natural de pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).

En un estudio realizado por Ben y Ampe (2000) sobre la dinámica del pozol fermentado, se encontró que la cantidad de microorganismos mesófilos aerobios fue de  $10^9 - 10^{10}$  UFC  $g^{-1}$  a las 96 h de fermentación y, en este trabajo, se encontraron valores menores de  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  a las 24 h en el pozol SP y  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  a las 36 h en el pozol CP, probablemente porque se usaron condiciones diferentes de fermentación.

### 6.1.2. Bacterias Ácido Lácticas

Durante la dinámica de la fermentación natural del pozol SP, se encontró que las BAL estuvieron presentes con 4.7 log UFC  $g^{-1}$  al inicio de la misma (Figura 3), alcanzando el máximo crecimiento a las 24 h con un valor de 7.8 log UFC  $g^{-1}$ . Sin embargo, en el pozol CP el número de BAL fue de 5.4 log UFC  $g^{-1}$  a las 12 h de fermentación, considerándose como un periodo de latencia, alcanzando la misma cantidad que el pozol SP a las 24 h. No se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre los tratamientos (Anexo 5).



**Figura 3.** Bacterias Ácido Lácticas (log UFC  $g^{-1}$ ) presentes en la fermentación natural de pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).

En un estudio de pozol originario de Villahermosa, Tabasco, incubado a 30 °C, se reportó que la cantidad de BAL fue de  $10^7$  a  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  a las 24 h de fermentación (Ben y Ampe, 2000). En este trabajo, el mayor número de BAL fue a las 24 h para los dos tratamientos aunque éste fue menor que en el estudio mencionado. Por otro lado, Nuraida *et al.* (1995) reportaron que la concentración de BAL fue de 7.9 log UFC  $g^{-1}$  a las 48 h en la fermentación del pozol a temperatura ambiente y en este trabajo, se encontró este valor a las 24 h.

Se ha reportado que algunos microorganismos fermentadores producen compuestos antimicrobianos que favorecen la obtención de alimentos seguros y con larga vida de anaquel. Entre estos microorganismos están diversas especies del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*. El grupo más importante en la fermentación natural tradicional de alimentos son las bacterias ácido lácticas (Kalui *et al.*, 2010).

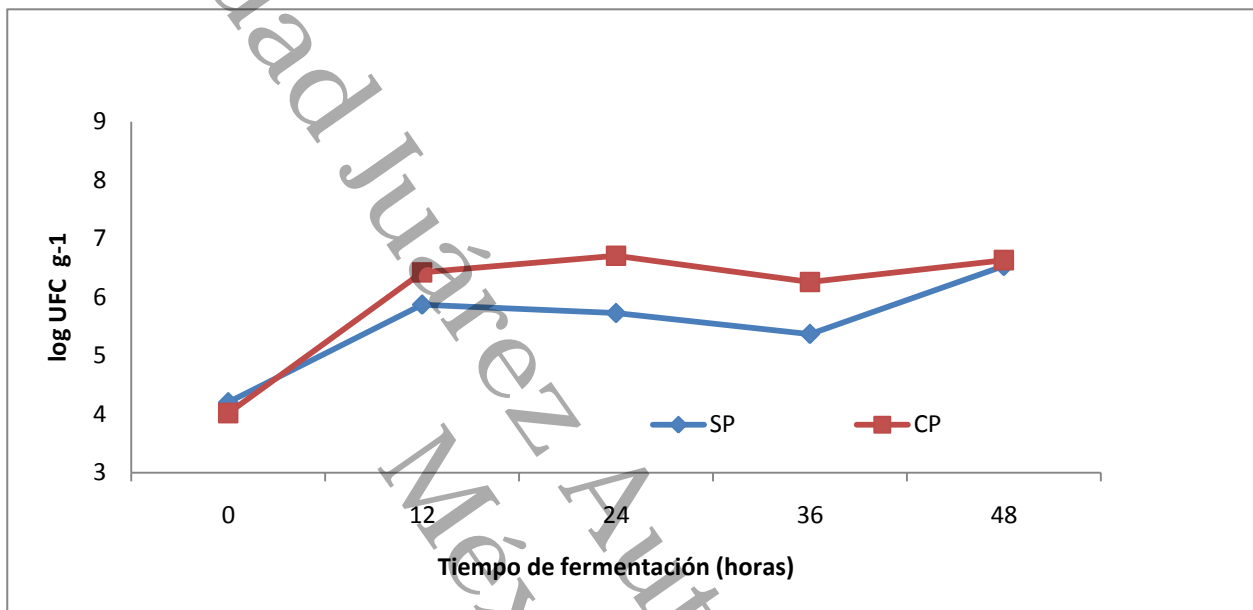
En el estudio de Alvarado *et al.*, (2006) se demostró que la capacidad acidificante de diferentes cepas de BAL sugiere su potencial en la inhibición del crecimiento de patógenos como *S. aureus* y *E. coli* enteropatógenas. Por otro lado, Wakil *et al.* (2008) estudiaron la fermentación natural de la harina de granos de maíz y frijol fermentada durante 72 h a 30°C, encontraron que las cuentas de bacterias mesófilas totales, bacterias ácido lácticas, enterobacterias, levaduras y hongos aumentaron rápidamente en las primeras 24 h. Después de 24 h de fermentación, la presencia de enterobacterias disminuyó después de 24 h siendo relacionada con la disminución del pH (menor de 4.5) y el aumento de la acidez titulable debida a la actividad de las bacterias lácticas en las primeras 48 h de fermentación que degradan los carbohidratos presentes liberando ácido láctico.

### **6.1.3. Bacterias coliformes totales**

Durante la fermentación del pozol se encontró que, al inicio de la misma, las bacterias coliformes totales presentes estuvieron entre 4.0 y 4.2 log UFC  $g^{-1}$  en los dos tratamientos (Figura 4): en el pozol SP aumentaron a 5.8 log UFC  $g^{-1}$  a las 12 h de fermentación y conforme transcurrió el tiempo, el crecimiento presentó una tendencia a disminuir a 5.3 log UFC  $g^{-1}$  hasta las 36 h. Sin embargo, el máximo crecimiento se



alcanzó a las 48 h con  $6.5 \log \text{ UFC g}^{-1}$ , mientras que el número de bacterias coliformes totales en el pozol CP, fue mayor durante toda la fermentación alcanzando  $6.7 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a las 24 h,  $6.2 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a las 36 h y terminando con  $6.6 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a las 48 h. No obstante, no se presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre los tratamientos para estos microorganismos (Anexo 5).



**Figura 4.** Bacterias Coliformes Totales ( $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ) presentes durante la fermentación natural del pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).

En un estudio de la dinámica de la fermentación de pozol, Ben y Ampe (2000) encontraron que el número de enterobacterias fue de  $10^8 \text{ UFC g}^{-1}$  después de 4 días y, al comparar con los datos obtenidos en este trabajo, el valor fue menor ( $10^7 \text{ UFC g}^{-1}$ ). En otro estudio realizado por Sainz *et al.*, (2001) sobre la sobrevivencia y la caracterización de cepas de *E. coli* en la fermentación del pozol, encontraron que las enterobacterias estuvieron presentes entre 4.2 y 7.8 Log UFC g<sup>-1</sup>. Al comparar los resultados realizados en este trabajo, coinciden los valores al inicio de la fermentación con 4.2 Log UFC g<sup>-1</sup>; sin embargo, la cantidad al final de coliformes totales fue menor con  $6.5 \log \text{ UFC g}^{-1}$  en el pozol SP y  $6.6 \log \text{ UFC g}^{-1}$  en el pozol CP.

En estudios realizados por Mensah *et al.* (1991) en avena y masa de maíz, se inocularon con *Shigella flexneri* y *E. coli* enterotoxigénica y, durante el proceso de fermentación, se encontró que la mitad de las cepas fueron inhibidas a las 8 h debido al proceso fermentación. Al comparar con este estudio se encontró que en el proceso de fermentación del pozol SP a las 12 h, los coliformes totales se encontraron en menor número de UFC g<sup>-1</sup> que el pozol CP.

Generalmente, las bacterias Gram negativas son menos sensibles a los antimicrobianos debido al lipopolisacárido de la membrana externa de este grupo que restringe la difusión de compuestos hidrofóbicos. Sin embargo, esto no significa que las bacterias Gram positivas siempre son más sensibles. Las bacterias Gram negativas generalmente son más resistentes a los antimicrobianos de origen vegetal e, incluso, no muestran efecto comparadas con las bacterias Gram positivas (Tajkarimi *et al.*, 2010).

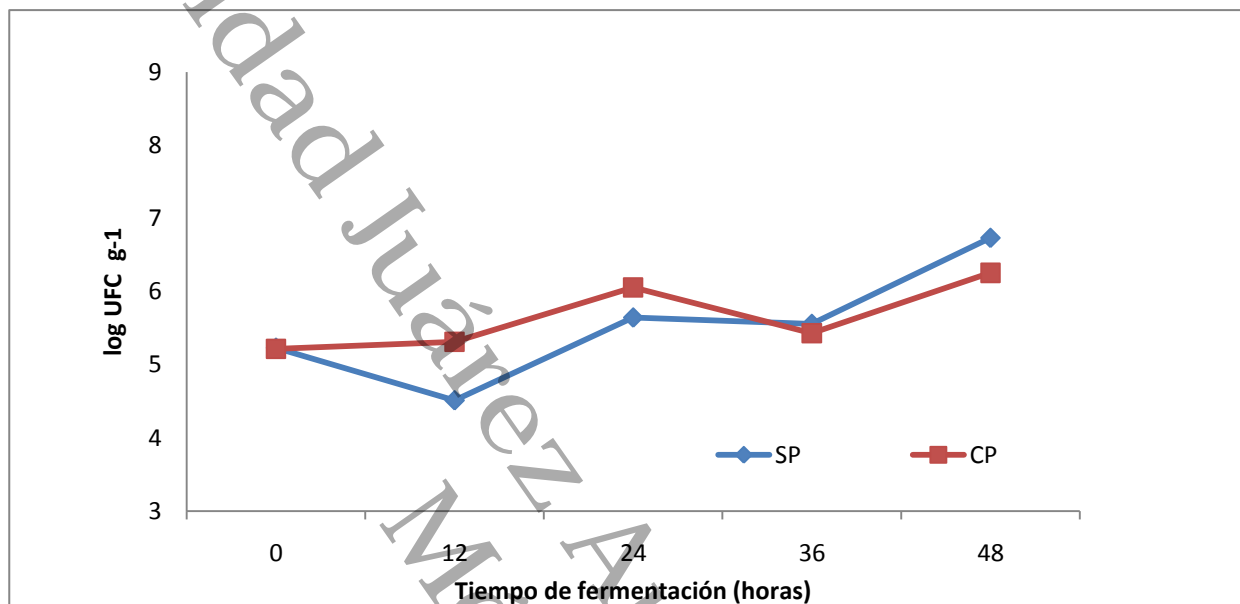
Se ha encontrado que las bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*, *B.cereus*) fueron más sensibles a extractos de comino amargo que las bacterias Gram negativas (*Enterobacter spp*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*). Este comportamiento lo presentaron las bacterias ácido lácticas (Gram positivas) durante las primeras 12 horas en la fermentación de pozol con pimienta (Ani *et al.*, 2006).

Actualmente, los antimicrobianos naturales están recibiendo atención por algunos beneficios que presentan tales como: controlar diversos microorganismos reduciendo la necesidad del uso de antibióticos, controlar la contaminación microbiana en los alimentos, mejorar las técnicas para extender la vida de anaquel eliminando patógenos indeseables y/o retardar el deterioro microbiano, disminuir el desarrollo de resistencia a antibióticos de los microorganismos patógenos o fortalecer las células inmunológicas en humanos (Tajkarimi *et al.*, 2010).

#### **6.1.4. Levaduras y Hongos**

Durante el seguimiento la fermentación, se encontró que la cantidad inicial de levaduras y hongos fue de 5.2 log UFC g<sup>-1</sup> para ambos tratamientos (Figura 5). No obstante, el máximo crecimiento se presentó a las 24 h siendo mayor en el pozol CP.

Sin embargo, a las 36 h de fermentación se alcanzaron valores similares de 5.4 y 5.5 log UFC g<sup>-1</sup> en el pozol CP y SP, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre los tratamientos en este tipo de microorganismos (Anexo 5).



**Figura 5.** Levaduras y hongos presentes (log UFC g<sup>-1</sup>) en la fermentación natural de pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).

La frecuencia con la que ciertas especies, o por lo menos ciertos géneros de microorganismos son encontrados en el pozol, podría estar relacionada con el tipo de substrato y las condiciones ambientales que prevalecen en los lugares en donde este alimento es preparado, además de que muy probablemente influye el manejo que se hace a los ingredientes durante el proceso de elaboración (Ulloa y Herrera, 1984). Es importante mencionar que el agua que se utilizó para el proceso de amasado fue agua purificada comercial, con la finalidad de controlar esta variable debido a que, en estudios realizados por Wachter *et al.* (1993) se encontró que la flora microbiana es alterada por cualquier manejo durante el proceso. Si se toma la muestra en una unidad de mayor cantidad conlleva a alterar las condiciones ecológicas de la flora microbiana y

otros parámetros relacionados con los procesos de fermentación como la cantidad de sustrato, microorganismos presentes y la temperatura (Díaz y Wachter *et al.*, 2003).

## 6.2. Identificación de bacterias coliformes.

Se seleccionó un total de 59 colonias presumiblemente diferentes y representativas de los cinco tiempos de muestreo: 10 del pozol SP y 49 del pozol CP. Durante el proceso de purificación se seleccionaron 42 cepas y, después de la observación microscópica y de las pruebas de catalasa y oxidasa, se terminó con la selección de 25 cepas para realizar la identificación con el sistema API<sup>®</sup>, quedando al final 6 cepas identificadas del pozol SP y 19 del pozol CP. Al final de la identificación con del sistema API<sup>®</sup>, se obtuvieron en total 12 códigos diferentes. Nueve de estos códigos se obtuvieron a partir de las cepas aisladas del pozol CP donde cuatro correspondieron a *Klebsiella pneumoniae* y cinco a *Enterobacter cloacae* (Cuadro 2), mientras que para las cepas aisladas del pozol SP se encontraron dos códigos para *Klebsiella pneumoniae* y uno para *Raoutella terrigena* (Cuadro 3).

**Cuadro 2.** Cepas identificadas con el sistema API<sup>®</sup> 20E en el pozol con pimienta.

<b>Código</b>	<b>Identificación</b>
1105573	<i>Enterobacter cloacae</i>
1214773	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5015773	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3304573	<i>Enterobacter cloacae</i>
5214773	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1355773	<i>Enterobacter cloacae</i>
7215773	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3305573	<i>Enterobacter cloacae</i>
1301573	<i>Enterobacter cloacae</i>

**Cuadro 3.** Cepas identificadas con el sistema API® 20E en el pozol sin pimienta.

<b>Código</b>	<b>Identificación</b>
<b>4214773</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>5204773</b>	<i>Raoutella terrigena</i>
<b>5215773</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

El Fufu es un producto pastoso húmedo fermentado a partir de yuca y es considerado, junto con el gari, como un alimento indígena tradicional del Sur de Nigeria. Se ha encontrado que las bacterias ácido lácticas predominantes en este producto son, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*, junto con *Bacillus*, *Enterococcus*, *Klebsiella* y *Candida*; todos estos microorganismos imparten propiedades probióticas a este producto (Ray e Sivakumar, 2009).

Las características bacteriológicas más distintivas del género *Klebsiella* son la ausencia de motilidad y la presencia de una cápsula de polisacáridos. Esto da a las colonias su aspecto mucoso, brillante y forma la base para el sistema de serotipificación. Se han definido más de 70 tipos capsulares, los que incluyen algunos con reacciones cruzadas con la de otros patógenos encapsulados como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. *K. pneumoniae* es la especie más común del género y es capaz de causar neumonía lobular clásica, una característica de otras bacterias encapsuladas. La mayor parte de las neumonías causadas por *Klebsiella* son indistinguibles de las producidas por otras enterobacterias. De todas las enterobacterias, *Klebsiella* se encuentra entre las más resistentes a los antimicrobianos (Ryan y Ray, 2011).

La Agbelina es un producto fermentado popular en la Costa de marfil y Ghana. La microflora presente en la fermentación de la yuca para producir Agbelina consiste en bacterias ácido lácticas con una dominación de varias especies de *Lactobacillus*, así como de levaduras de los géneros *Candida* y *Zygosaccharomyces*, que le confieren atributos sensoriales como color, suavidad, cohesividad, aroma y acidez determinados por la aceptación del consumidor. Mientras que el Lafun es un producto harinoso fino preparado a partir de yuca fermentada y secada, que se consume comúnmente en los estados del Sur-Oeste de Nijeria. Los microorganismos involucrados en la preparación

de la fun incluyen especies de *Bacillus*, *Klebsiella*, *Leuconostoc*, *Corynebacterium*, *Candida* y *Lactobacillus* (Ray e Sivakumar, 2009).

Se ha reportado que *K. pneumoniae* es una bacteria que desempeña un importante papel como causa principal de las enfermedades infecciosas oportunistas siendo el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos e infecciones de heridas quirúrgicas (López y Echeverri, 2009). Las enterobacterias comprenden universalmente el 50% de los aislados encontrados en infecciones adquiridas en los hospitales y 80% de todos los aislados Gram negativos. Dentro de esta familia, el segundo género en importancia es *Klebsiella* spp., siendo *K. pneumoniae* la especie más estudiada y de mayor relevancia clínica (Echeverri-Toro *et al.*, 2012).

Las bacterias del género *Enterobacter* por lo común fermentan lactosa con rapidez y producen colonias similares a las de *Klebsiella*, aunque no tienen el aspecto mucoso. Una característica diferencial es su motilidad por flagelos peritricos que, por lo común, están presentes en bacterias del género *Enterobacter* pero que se encuentran ausentes de manera uniforme en bacterias del género *Klebsiella*. El género *Enterobacter* es menos virulento que *Klebsiella* (Ryan y Ray, 2011).

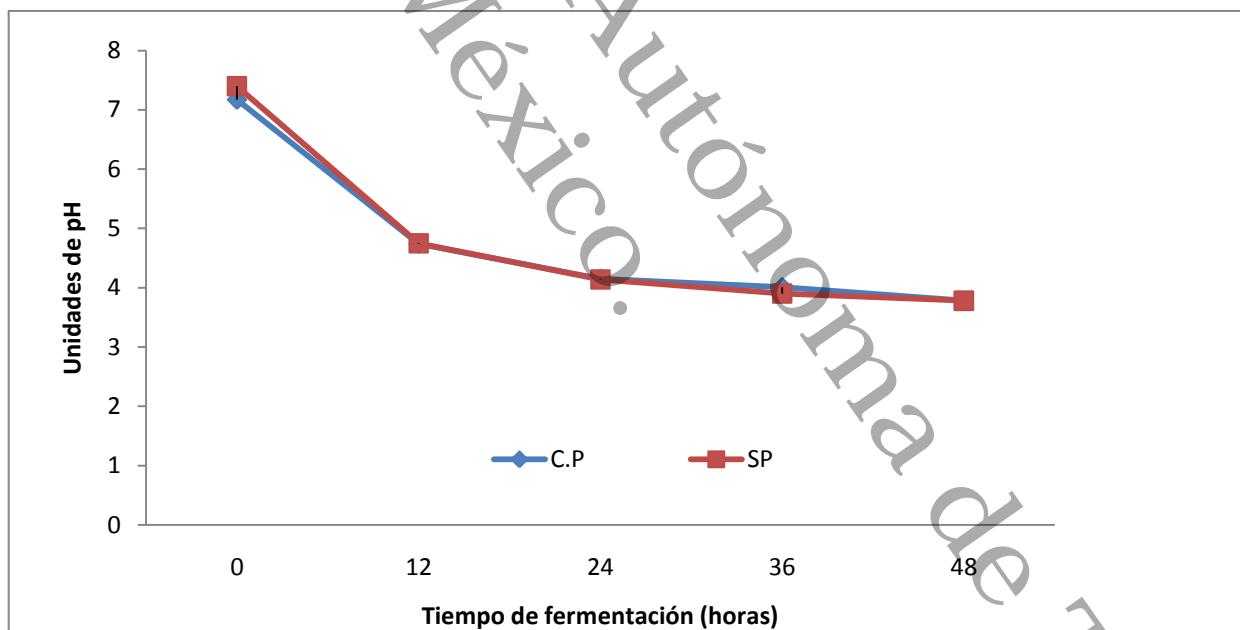
Las especies de *Enterobacter*, especialmente *E. cloacae*, se encuentra como comensal en hábitats naturales como agua, drenaje, vegetales, suelo, carne y, en ambientes hospitalarios, en la piel y tracto intestinal de humanos y animales. Antes de la aparición de los antibióticos, las especies de *Enterobacter* raramente eran encontradas como patógenos, pero estos organismos se encuentran ahora más frecuentemente como agentes causales de infecciones nosocomiales tales como infecciones del tracto urinario y bacteremia. *E. cloacae* se ha encontrado en una variedad de infecciones tales como endocarditis, ventriculitis, meningitis, artritis o osteomielitis y neumonía (Grimont y Grimont, 2006).

Para la bacteria *Raoultella terrigena* (antes conocida como *Klebsiella terrigena*) es una bacteria Gram negativa, miembro de la familia Enterobacteriaceae, descrita por primera vez en 1981 como *Klebsiella terrigena*; es raramente encontrada y es principalmente reportada como organismo acuático y del suelo. Sin embargo, la primera infección humana causada por este organismo fue reportada en 2007 en un paciente

de 45 años quien desarrolló endocarditis, causada por *R. terrigena*, posterior a un trasplante de hígado. *R. terrigena* es un bacilo no móvil con una prominente cápsula de polisacárido que le confiere una gran apariencia en la tinción de Gram y le provee de resistencia contra muchos de los mecanismos de defensa del huésped (Shaikh y Morgan, 2011).

### 6.3. pH y acidez titulable

Con respecto al pH, se encontró que en los tratamientos de pozol CP y pozol SP se presentaron valores iniciales de 7.4 y 7.17, respectivamente. A las 12 h de fermentación, el pH fue de 4.75 y conforme transcurrió la fermentación continuó la tendencia a disminuir en ambos tratamientos hasta alcanzar un pH de 3.78 a las 48 h (Figura 6). No se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre los tratamientos (Anexo 5).



**Figura 6.** Valores de pH en la fermentación natural de pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).

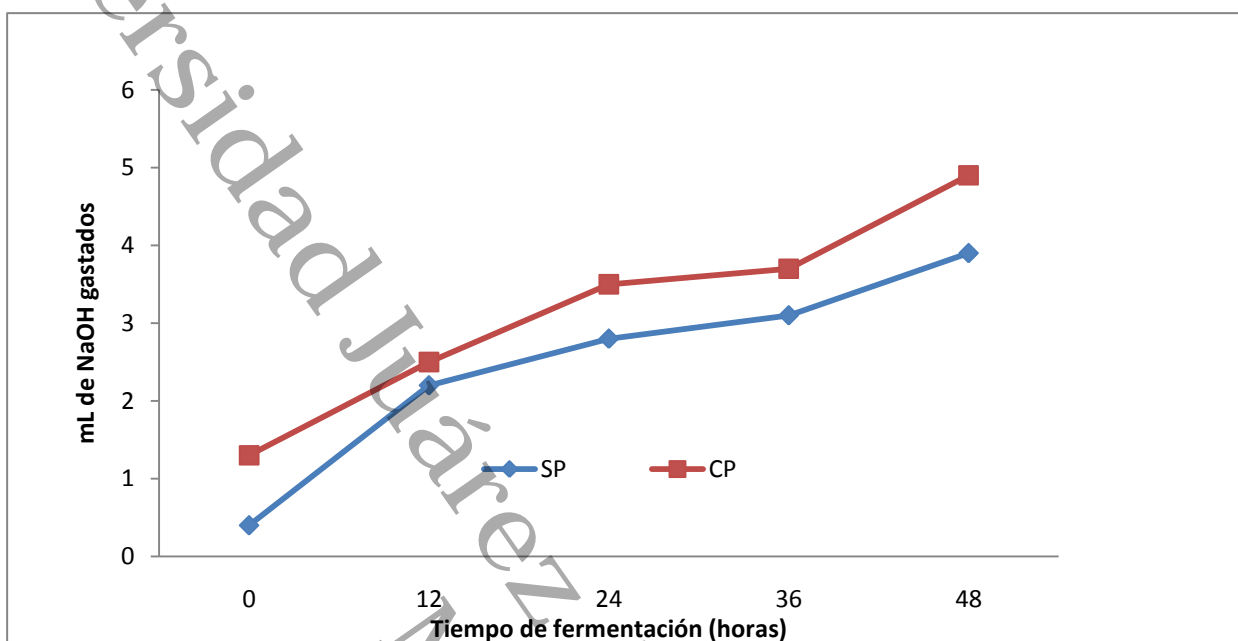
Ben y Ampe (2000), en un estudio en pozol, reportaron que el pH alcanzado a las 24 h de fermentación fue de 3.8-4.0. Al comparar con lo encontrado en el pozol CP, este valor se alcanzó a las 12 h, reduciéndose así el tiempo de fermentación en 12 h mientras que, para el pozol SP, el pH de 4.0 se alcanzó entre las 24 y 36 h en este trabajo. Alvarado *et al.* (2006) reportaron que el potencial antimicrobiano de los alimentos mexicanos tradicionales se le atribuye principalmente a la reducción del pH resultante de la actividad acidificante producida por los ácidos orgánicos de las BAL asociadas. Este comportamiento de reducción de pH concuerda con la fermentación del pozol tanto SP como CP. Nuraida *et al.* (1995) estudiaron la microbiología del pozol fermentado a temperatura ambiente durante nueve días y encontraron que el pH osciló entre 4.7 y 5.7 a las 12 h alcanzando valores de pH entre 3.6–3.9 al final de la fermentación. Estos resultados concuerdan con los encontrados en este trabajo donde se obtuvieron valores de 4.74 y 4.75 a las 12 h y a las 48 h se alcanzaron valores similares al final de la fermentación de 3.78 para ambos tratamientos (pozol SP y CP). En un trabajo realizado sobre el uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas, encontraron que uno de los principales factores que influyen en la supervivencia y crecimiento de los microorganismos es la acidez del medio, por ello las bacterias capaces de causar enfermedades no pueden crecer a valores de pH por debajo de 3.9 a 4.0 (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006). El pH alcanzado en la fermentación del pozol SP y CP se encuentra dentro de estos valores reportados asegurando la inhibición de bacterias patógenas.

En cuanto al valor obtenido de la acidez titulable (AT), expresado como mililitros gastados de NaOH 0.1 N fue de 0.4 mL de NaOH 0.1 N al inicio de fermentación en el pozol SP y aumentó hasta las 48 h con un valor final de 3.9 mL gastados de NaOH 0.1 N (Figura 7). En contraste, en la fermentación del pozol CP la acidez titulable inició con 1.3 mL gastados de NaOH 0.1 N continuando con la misma tendencia hasta alcanzar 4.9 mL gastados de NaOH 0.1 N al final de la fermentación. No se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre los tratamientos (Anexo 5).

Gatto y Torriani (2004) estudiaron el cambio de la población microbiana durante la fermentación de masa agria para pan y reportaron que la acidez titulable presentó la tendencia a aumentar conforme transcurrió la fermentación. Al comparar estos valores



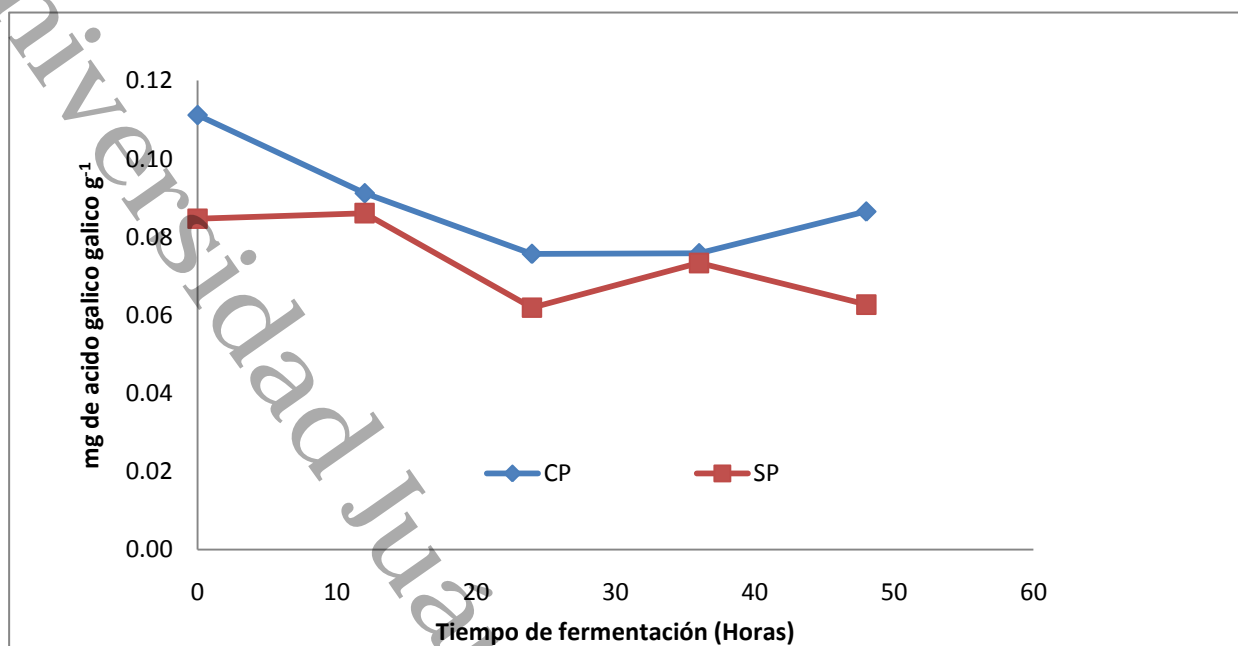
con la fermentación del pozol, se encontró la misma tendencia de aumento de los mililitros gastados conforme transcurrió la fermentación.



**Figura 7.** Acidez titulable de la fermentación natural del pozol con pimienta (CP) y sin pimienta (SP).

#### 6.4. Fenoles totales de pozol con y sin pimienta.

En general, los valores del contenido de fenoles totales en el pozol (Figura 8), disminuyeron a medida que transcurrió la fermentación de 0 a 48 horas, tanto en el pozol adicionado con pimienta (de 0.11 a 0.09 mg de ácido gálico  $\text{g}^{-1}$  de pozol) como en el pozol sin pimienta (de 0.08 a 0.06 mg de ácido gálico  $\text{g}^{-1}$  de pozol). En esta misma Figura se observa que los valores del contenido de fenoles totales en el pozol CP es mayor que los del pozol SP durante todo el tiempo que duró la fermentación.



**Figura 8.** Contenido de fenoles totales (expresado en mg de ácido gálico g<sup>-1</sup>) durante la fermentación natural de pozol con pimienta (CP) y pozol sin pimienta (SP).

Se observó que al comparar los tratamientos CP y SP, a las 0, 24 y 48 h existen diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) pero a las 12 y 36 h no las hay (Cuadro 4). Lo anterior podría deberse a la concentración de la pimienta y también a los fenoles presente en el maíz.

**Cuadro 4.** Concentración de fenoles totales (mg de ácido gálico g<sup>-1</sup>)

Tiempo (horas)	Pozol con pimienta	Pozol sin pimienta
0	0.112 ± 0.000001 <sup>a</sup>	0.088 ± 0.000005 <sup>a</sup>
12	0.093 ± 0.000002 <sup>b</sup>	0.089 ± 0.000001 <sup>a</sup>
24	0.074 ± 0.000001 <sup>a</sup>	0.063 ± 0.000000 <sup>a</sup>
36	0.074 ± 0.000005 <sup>b</sup>	0.076 ± 0.000010 <sup>a</sup>
48	0.085 ± 0.000001 <sup>a</sup>	0.064 ± 0.000001 <sup>a</sup>

Los tratamientos con letras iguales no son diferentes estadísticamente ( $p \geq 0.05$ ). Grados de libertad = 2. P (T <= t) dos colas. t = student.

• El contenido de fenoles solubles e insolubles en el endospermo y germen del grano de maíz (*Zea mays*) fue estudiado por Cabrera-Soto *et al.*, (2009) en dos genotipos experimentales (HE y H-161) cultivados en diferentes localidades y tres maíces comerciales (Oso, Sable y Leopardo) mediante el método de Folin-Ciocalteau. Dentro de este tipo de fenoles, dominaron los fenoles libres en las tres estructuras. La variación de estos compuestos en el endospermo de las muestras del grano fue de 45.3 a 94.2 mg g<sup>-1</sup> MS. Al tratar de comparar lo anterior con los resultados obtenidos en el pozol (0.0846 mg g<sup>-1</sup> = 84.68 µg g<sup>-1</sup> MH), no se pudieron contrastar debido a que aquellos están calculados en materia seca y en este trabajo se realizó la determinación en materia húmeda. Por otro lado, no se encontraron reportes de fenoles totales en pozol fermentado en la bibliografía disponible.

## VII. CONCLUSIONES

En la fermentación natural de pozol blanco tanto CP como SP, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de microorganismos que están presentes (bacterias mesófilas totales, bacterias lácticas, coliformes, levaduras y mohos) y que de manera conjunta llevan a cabo reacciones metabólicas produciendo ácidos orgánicos al acidificar el pozol. En la caracterización de las bacterias coliformes, se encontraron coincidencias en ambos tratamientos con excepción de la bacteria *Raoutella* que solo estuvo presente en el pozol SP, a pesar de que la mayor diversidad, en base a los códigos, fue en el pozol con pimienta., No se encontraron diferencias en cuanto a la cantidad de fenoles tanto en pozol CP como SP ni se observó efecto antimicrobiano con la concentración de pimienta utilizada en el pozol.

## VIII. RECOMENDACIONES

Realizar estudios con diferentes concentraciones de pimienta en la fermentación del pozol para determinar el efecto antimicrobiano y a la vez llevar a cabo pruebas de aceptación sensorial para evaluar la cantidad en que debe ser adicionada al pozol así como determinar otros compuestos, además del contenido de fenoles totales, que contiene la pimienta y que han presentado actividad antimicrobiana.

México.

## IX. Literatura citada

- Adams, M. R., Moss, M. O. (1997). Microbiología de los alimentos. Editorial Acriba, España. 405 p.
- Alarcón, A. E., Guzmán, G. R. I., Aquino, B. E. N., Chavez, S. J. L. (2011). Actividad anticancerígena "in vitro" de extractos de maíz y tortilla azul. *3er. Congreso internacional. Biología, química y agronomía*. Consultada el día 10 de Enero del 2013 en la página: [http://scholar.google.com.mx/scholar?q=Actividad+anticancer%C3%ADgena+E2%80%9Cin+vitro%E2%80%9D+de+extractos+de+ma%C3%ADz+y+tortilla+azul&btnG=&hl=es&as\\_sdt=0&as\\_vis=1](http://scholar.google.com.mx/scholar?q=Actividad+anticancer%C3%ADgena+E2%80%9Cin+vitro%E2%80%9D+de+extractos+de+ma%C3%ADz+y+tortilla+azul&btnG=&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1).
- Alvarado, C., García, A. B. E., Martín, S. E., Regalado, C. (2006). Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican Foods. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48:3-4.
- Álvarez, A. (2006). Aplicaciones del maíz en la tecnología alimentaria y otras industrias En: ILSI (Recopilador). Volumen II: Maíz y nutrición. Serie de informes especiales. Argentina. pp: 9-13.
- Alvarez, M. A., Debattista, N. B., Pappano, N. B. (2008). Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. *Folia Microbiologica* 53 (1): 23-28.
- Ani, V., Varaderaj, M.C., Akhilender Naidu, K. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cumin nigrum* L.). *European Food Research Technology* 224: 109-115.
- API. 2010. Folleto API 20E. Biomérieux, Francia
- Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. K., Snozzi, M. (2001). Indicators of microbial water quality. In: Fewtrell, L. and Bartram, J. (Eds.). Water Quality: Guidelines, Standards and Health. Risk assessment and management for water-related infectious disease. *IWA Publishing, London*. Consultada el 08 de Septiembre de 2001. En la página de Internet: [www.who.int/entity/water\\_sanitation\\_health/dwq/iwachap13.pdf](http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/dwq/iwachap13.pdf)

- Bahiru, B., Mehari, T., Ashenafi, M. (2006). Yeast and lactic acid flora of *tej*, an indigenous Ethiopian honey wine: variations and between production units. *Food microbiology* 23: 277-282.
- Barco, M. M. J. (1998). La pimienta de Jamaica [*Pimenta dioica* (L.) Merril, Myrtaceae] en la sierra norte de Puebla (México). *Anales Jardín botánico de Madrid* 56 (2): 338.
- Barros, C., Buenrostro, M. (2011). Pozol, Popo, Champurrado. *Revista Digital Universitaria* 12 (4): 2-8.
- Beltrán-Orozco, M. C., Cruz, E. E., Wachter, C., Centurión, D., Espinosa, J. (2001). Comportamiento cinético del pH, acidez titulable y contenido proteínico, del pozol, durante el proceso de fermentación. *Bebidas Mexicanas, Alfa Editores Técnicos. Octubre-Noviembre 2001*. pp: 29-34.
- Ben, N. O., Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (9): 3664-3673.
- Böhm, V., Schlesier, K. (2004). Methods to evaluate the antioxidant activity. In: Dris, R., Jain, S.M. (Ed), *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*. 3: 55-71. Consultada en <http://www.springerlink.com/content/u975877104337277/> el día 09 de noviembre del 2011.
- Bonafine, O., Cañizares, A., Laverde, D. (2006). Importancia de los fitoquímicos en la alimentación. *Instituto Nacional de investigación y tecnología agraria y alimentaria* 7: 9-12.
- Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E.O., Acedo-Félix, E., Ponce, J.F., Cruz –Villegas, M., García-Hernández, J.L., Ortega-Nieblas, M.M. (2010). Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12: 539-547.
- Borges-Argáez. R., Cáceres, F. M., Reyes, C. E. D., Zarrabal, U. G. J., Espinosa, M. J., Centurión, H. D., Novelo, P. J. I., Rocha, U. J. A. (2010). Antimicrobial activities and composition of essential oils of *Pimenta dioica* L. Merr. and *Plectranthus*

- *amboinicus* Lour obtained by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and steam distillation. // *Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, PROSCIBA*. Brazil. pp: 1-8.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, Ch., Frisvad, C. J., Gerds, L. M., Hammes, P. W., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, B. I., Prajapati, B. J., Seto, Y., Schure, T. E., Boven, V. A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., Hansen, B. E. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154: 87-97.
- Burt, S. A., Zee, V. D. R., Koets, P. A., Graaff, M. A., Knapen, V. F., Gaastra, W., Haagsman, P.H., Veldhuizen, J. A. E. (2007). Carvacrol induces heat shock protein go and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and environmental microbiology* 73 (14): 4484-4490.
- Cabello N. M., Belloso M.G. (2009). Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. *Revista Universidad de Oriente Agrícola* 9 (3): 705-710.
- Cabrera-Soto, M. L., Salinas-Moreno, Y., Velazquez-Cardelas, G. A., Espinosa-Trujillo, E. (2009). Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. *Agrociencia* 43: 827-839.
- Cárdenas, L. P., Sastoque, A. M., Peña, M. R. (2003). Métodos moleculares en muestras ambientales: una alternativa para establecer la relación entre la estructura de la comunidad microbiana y la operación del sistema. *In: Universidad del Valle; CINARA; International Water Association. Memorias del evento: Agua 2003. Cartagena de Indias, IWA*. pp: 76-83.
- Centurión, H. D., Espinosa, M. J. (1996). Rescate de tecnología alimentaria tradicional del Estado de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Unidad Sierra. Villahermosa, Tabasco, México. 65 p.
- Centurión, H. D., Espinosa, M. J., Poot, M. J. E. & Cázares, C. J. G. (2003). Cultura alimentaria tradicional de la región Sierra de Tabasco. *Universidad Juárez Autónoma de Tabasco*. 53 p.



- Consentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F. (1999). *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29: 130-135.
- Danilo, E. (2003). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56: 297-314.
- Díaz, R. G., Morlon-Guyot, J., Wachter, C. (1999). Diversidad de bacterias lácticas amilolíticas del pozol. En *Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. 12-17 Septiembre, Huatulco, Oaxaca, México*. 40 p.
- Díaz, R. G., Wachter, R. C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 45 (1-2): 30-40.
- Echeverri-Toro, L. M., Rueda, Z. V., Maya, W., Agudelo, Y., Ospina, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Revista Chilena de Infectología* 29 (2): 175-182.
- Escamilla, J. C. I., Cuevas, M. E. Y., Guevara, F. J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM* 52 (2): 73-75.
- FAO. 1993. El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición, N°25. Roma, Italia. 90 p.
- Farrés, A., Ampé, F., Escalante, A., Flores, M. T., Guyot, J. P., Morlon-Guyot, J., Romero, M.T., Wachter, C. (1999). Determinación de la diversidad bacteriana del pozol: un enfoque polifásico. *Memorias VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Del 12 al 17 de septiembre de 1999 Huatulco, Oaxaca, México*.
- Fernández, O. A., García, F. C., Saéz, N. J. A., Valdezate, R. S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En: Cercenado, E., Cantón, R. (Eds). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Consultada el día 16 de Diciembre de 2012 en la página electrónica: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap37.asp>

- Franco, M. E. (2006). Actividad antioxidante *in vitro* de las bebidas de frutas. *Bebidas-Alfa Editores Técnicos 2*: 20-27.
- Gatto V., Torriani S. (2004). Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. *Annals of Microbiology 54* (1): 31-42.
- Grimont, F., Grimont, P. A. D. (2006). The Genus *Enterobacter*. *Prokaryotes 6*:197–214. DOI: 10.1007/0-387-30746-x\_9.
- Gutiérrez, A. D. M., Ortiz, G. A., Mendoza, C.A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación Animal. *Simposio de Metrología, Santiago de Querétaro, México, del 22 al 24 de Octubre 2008*.
- Jay, M. J. (2002). Microbiología moderna de los alimentos. 4ª Edición. Editorial Acribia, España. 44 p.
- Jay, M. J., Loessner, J. M., Golden, A. D. (2005). Microbiología moderna de los alimentos. 5ª Edición. Editorial Acribia, España. 476 p.
- Kalui, M. C., Mathara, M. J., Kutima, P. M. (2010). Probiotic potential of spontaneously fermented cereal based foods – A review. *African Journal of Biotechnology 9* (17): 2490-2498.
- Kim, J., Marshall, M. R., Wei, C. J. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 43*: 2839-2845.
- Li, W., Raoult, D., Fournier, P. E. (2009). Bacterial strain typing in the genomic era. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews 33* (5): 892-916.
- Llop, H. A., Valdés-Dapena, V. M. M., Zuazo, S. J. L. (2001). Microbiología y parasitología médicas, Tomo I. *Editorial Ciencias Médicas, La Habana, Cuba*. pp: 252-254.
- Lok, Y-W. K., Chung, W-Y., Benzie, F. F. I., Woo, J. (2010). Colour additives in snack foods consumed by primary school children in Hong Kong. *Food Additives and Contaminants: Part B 3* (3): 148-155.

- López, M. I. X., Baeza, J. R. (2010). Comparación de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y antocianinas totales de diferentes variedades de maíz (*Zea mays* L). *INVURNUS* 5 (2): 19-22.
- López, V. I. A., Echeverri, T. L. M. (2009). *K. pneumoniae*: ¿la nueva “Superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Revista médica Universidad de Antioquía* 23 (2): 157-165.
- Lorente, F., Serra, D. J. (2001). Alimentos funcionales: Prebióticos. *Acta pediátrica* 59: 150-155.
- Madigan, T. M., Martinko, M. J., Dunlap, V. P., Clark, P.D. (2009). Brock, Biología de los microorganismos. 12ª Edición. Pearson Educación, España.137 p.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, M.J., Tuñón, J. M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acción antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 7 (6): 271-278.
- Martínez, M. A., Evangelista, V., Mendoza, M., Basurto, F., Mapes, C. (2004). Estudio de la pimienta gorda *Pimenta dioica* (L.) Merrill, un producto forestal no maderable de la sierra norte de Puebla, México. En: Miguel N. Alexiades y Patricia Shanley, Editores. Productos forestales, medios de subsistencia y conservación. Volumen 3. America latina. Editorial Centro para la Investigación Forestal Internacional. Indonesia pp: 23-41.
- Martínez, M. J., Molina, N. Boucourt, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L.(Guayaba). *Revista cubana de plantas medicinales* 2 (1): 12-14.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.J., Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 50 (1): 5-18.
- Mensah, P., Tomkins, A.M., Drasar, B.S., Harrison, T.J. (1991). Antimicrobial effect of fermented Ghanaian maize dough. *Journal of Applied Microbiology* 70 (3): 203-210.
- Meyer, E. M. (2012). Tabla de contenidos y muestra de hojas. Manual de Excel 2010. Consultada el día 06 de Junio de 2013 en la página electrónica: [http://aplicaexcel.galeon.com/Demos/DM\\_Excel\\_2010.pdf](http://aplicaexcel.galeon.com/Demos/DM_Excel_2010.pdf).

- Muñoz, H. R. A., Calderón, A. (1999). Estudio de la influencia del Ca (OH)<sub>2</sub> en las películas de pericarpio de maíz nixtamalizado mediante técnicas fototérmicas. *Superficies y vacío* 8: 80-84.
- Muñoz J. A. M., Ramos E. F. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista Horizonte Médico* 7(1): 23-31.
- Navas, C., Belloso, G., Colivet, B.J., Méndez, J. (2007). Actividad antimicrobiana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. (pimienta) sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas. *Revista Facultad de Agronomía* 1: 355-359.
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NOM-113-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- NOM-181-SSA1-1998. Norma Oficial Mexicana, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para tratamiento de agua, de tipo doméstico.
- Nunes, S. R., Kahl, S. F. V., Sarmiento, S. M., Richter, F. M., Costa-Lotufo, C. V., Rodríguez, R. F. A., Abin-Carriquiry, J. A., Martínez, M. M. Ferronato, S., Ferraz, F. B. A., Silva, J. (2011). Antigenotoxicity and antioxidant activity of acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at two stages of ripeness. *Plant Foods for Human Nutrition* 66: 129-135.
- Nuraida, L., Wacher, C. M., Owens D. J. (1995). Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology y Biotechnology* 11: 567-571.
- Ogunjobi, A. A., Adebayo-Tayo, C. B., Ogunshe, A. A. (2005). Microbiological, proximate analysis and sensory evaluation of processed Irish potato fermented in brine solution. *African Journal of Biotechnology* 4 (12): 1409-1412.

- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* 100: 1523-1530.
- Pasterán, F., Corso, A., Galas, M. (2003). Manual de procedimientos. *Salmonella*: Parte II. Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires, Argentina. 11 pp.
- Park, K., Kim, J., Lee, S.G., Shin, S.C. (2007). Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*) and Litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Journal of Nematology* 39 (3): 275-279.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90: 494-507.
- Ramírez, R. J. C., Rosas, U. P., Velázquez, G. M. Y., Ulloa, J. A., Arce, R. F. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* 2 (7): 2-16.
- Rao, S. P., Sheth, R.N., Jayaveera, N. K., Rao, S. K. (2010). Pharmacognostic standardisation of the leaves of *Pimenta dioica* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1 (9): 110-115.
- Ray, B., Bhunia, A. (2010). Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. 4ª Edición. Editorial McGraw Hill, México. 25 p.
- Raybaudi-Massilia, M. R., Fortuny, S. R., Belloso, M. O. (2006). Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. / *Simposio Ibero-Americano de vegetales frescos cortados, España*. pp: 15-21.
- Ray, R. C., Sivakumar, P. S. (2009). Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops: review. *International Journal of Food Science and technology* 44: 1073- 1087.
- Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C. N., Ayala-Labarríos, L. A., Rocha-Revilla, J.C., Padilla-García, V., Espinosa-Hernández, T. C. (2009). Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. *Acta de química Mexicana* 1(1). Consultada el día 16 de Diciembre de 2012 en la página electrónica <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/AQMmicroorganismos.html>

- Rojas-Herrera, R.A., González-Flores, T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica* 31 (2): 69-76.
- Ryan, J. K., Ray, G. C. (2011). Sherris, Microbiología médica. 5ª Edición. Editorial McGraw Hill, México. 462 p.
- Sainz, T., Wacher, C., Espinoza, J., Centurión, D., Navarro, A., Molina, J., Inzunza, A., Cravioto, A., Eslava, C. (2001). Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 71: 169-176.
- Salinas-Moreno, M. Y., López-Reynoso, R. J. J., González-Flores, B. G. (2007). Compuestos fenólicos del grano de maíz y su relación con el oscurecimiento de masa y tortilla. *Agrociencia* 41 (3): 295-305.
- Sandasi, M., Leonard, M. C., Viljoen, M. A. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* 19: 1070-1075.
- Sauceda, R. E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* 7 (1): 153-170.
- Shaikh, M. M., Morgan, M. (2011). Sepsis caused by *Raoultella terrigena*. *Journal of the Royal Society of Medicine Short Reports* 2:49. DOI 10.1258/shorts.2011.010127.
- Simitzis, P. E., Deligeorgis, S. G., Bizelis, J. A., Dardamani, A., Theodosiou, I., Fegeros, K. (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science* 79: 217–223.
- Scott, R., Sullivan, C. W. (2008). Ecology of fermented foods. *Human ecology review* 15 (1): 25-31.
- Smoot, M. L., Pierson, D. M. (1997). Microorganismos indicadores y criterios microbiológicos. En: Doyle, P. M., Beuchat, R. L. & Montville, J. T. *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y frontera*. Editorial Acribia, España. 75 p.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S. A., Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21: 1199–1218.
- Ulloa, M., Herrera, T. (1984). Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y

- tepache. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica.* (47-53): 145-163.
- Vázquez, C. D. A. (2011). Actividad antimicrobiana y composición química de los aceites esenciales de *Malvaviscus arboreus*, *Pimienta dioica*, *Byrsonima crassifolia*, *Psidium guajava* y *Tradescantia pendula* var *Zebrina*. Tesis de Maestría en Ciencias Alimentarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 4 p.
- Vera, J. R., Cortés, G. N., Contreras, M. A. (2010). Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*). *Revista Venezolana de ciencia y tecnología de alimentos* 1(1): 70-80.
- Wacher, C., Cañas, A., Cook, E. P., Barzana, E., Owens, D.J. (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 269-274.
- Wakil, S. M., Onilude, A. A., Adetutu, E. M., Ball, A. (2008). PCR-DGGE fingerprints of microbial successional changes during fermentation of cereal-legume weaning foods. *African Journal of Biotechnology* 7 (24): 4643-4652.
- Zampini, C. I., Cudmani, N. I. M. (2007). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 41 (3): 385-393.

**Anexo 1.**

Sistema de identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes.





## Anexo 2.

### Preparación de la escala de McFarland

Para preparar la escala de McFarland de 8 tubos, primero se preparó el cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) al 1% y el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 1%: se pesaron 0.5 g de  $\text{BaCl}_2$  en 50 ml de agua destilada y en otro matraz aforado se pipeteó 1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en 100 ml de agua destilada. Después, se prepararon los 8 tubos utilizando las proporciones descritas en seguida (NOM-181-SSA1-1998; Pasterán *et al.*, 2003).

### Escala de McFarland

Tubo de McFarland	Solución de $\text{BaCl}_2$ al 1.0% (ml)	Solución de $\text{H}_2\text{SO}_4$ al 1.0% (ml)
1	0.1	9.9
2	0.2	9.8
3	0.3	9.7
4	0.4	9.6
5	0.5	9.5
6	0.6	9.4
7	0.7	9.3
8	0.8	9.2

Se agitó para homogeneizar la mezcla y se leyó la transmitancia del precipitado obtenido en cada tubo para determinar la equivalencia de la concentración de bacterias en UFC/ml como se muestra en el siguiente cuadro.

### Equivalencia de la concentración de bacterias en UFC/ml.

Tubo No.	Transmitancia %	Equivalencia de UFC/ml ( $\times 10^6$ )
1	68.43	300
2	46.20	600
3	31.41	900
4	25.03	1200
5	16.74	1500
6	11.84	1800
7	10.85	2100
8	7.68	2400

### Anexo 3.

Galería de tubos del API.



api® 20 E

REF: / 2012/09/29  
Origne / Source / Herkunft /  
Origin / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie: ποτόλ σιν / μιλκ

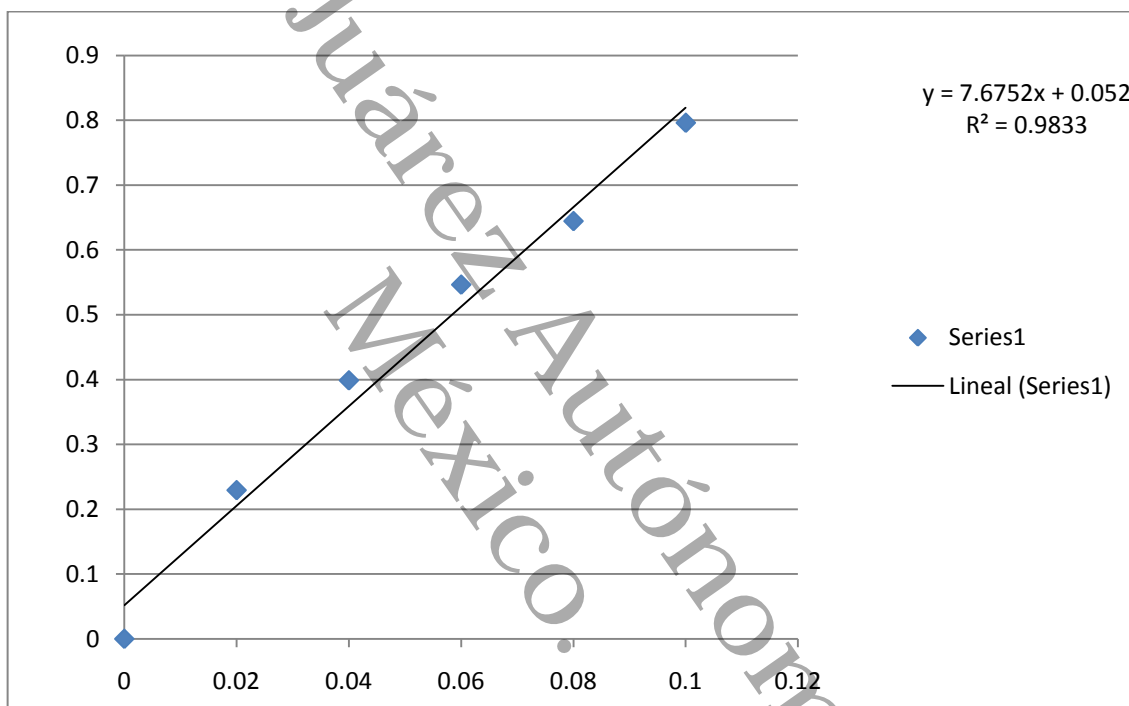
-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
4			2			1			4			7			7			3		

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy:

Ident. / Ταυτοποίηση:

#### Anexo 4.

Curva de calibración utilizando como patrón estándar de ácido gálico en un rango de concentración de 0.0 a 0.1 mg L<sup>-1</sup>.



## Anexo 5. Resultados obtenidos del Análisis Estadístico.

### Microorganismos mesófilos aerobios (ufc/g).

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas.

tiempo 0		
	con	sin
Media	3.757131894	6.48514907
Varianza	5.097852533	6.816994597
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-0.970482217	
P(T<=t) dos colas	0.434179898	ns
tiempo 12		
	con	sin
Media	5.00697382	4.409101682
Varianza	1.003941315	8.088992891
Grados de libertad	2	
Estadístico t	0.562140291	
P(T<=t) dos colas	0.630618384	ns
tiempo 24		
	con	sin
Media	3.203555846	5.919896573
Varianza	2.576751955	7.068198728
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-4.466414165	
P(T<=t) dos colas	0.046648504	*
tiempo 36		
	con	sin
Media	5.697459533	5.108522571
Varianza	16.19916008	0.762838332
Grados de libertad	2	
Estadístico t	0.323686268	
P(T<=t) dos colas	0.77688865	ns
tiempo 48		
	con	sin
Media	5.096305326	7.060761155
Varianza	11.62087472	3.59457504
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-0.64139798	
P(T<=t) dos colas	0.586958455	ns

**Bacterias lácticas (ufc/g)**

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

<b>tiempo 0</b>		
	con	sin
Media	4.616921901	4.818860919
Varianza	2.159657953	0.040068956
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-0.209473683	
P(T<=t) dos colas	0.853478332	ns

<b>tiempo 12</b>		
	con	sin
Media	4.523111513	5.292231554
Varianza	2.479147105	4.149744961
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-2.879952004	
P(T<=t) dos colas	0.102384048	ns

<b>tiempo 24</b>		
	con	sin
Media	8.466954539	7.82432715
Varianza	0.724783784	0.01159293
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1.160634429	
P(T<=t) dos colas	0.365600395	ns

<b>tiempo 36</b>		
	con	sin
Media	5.036870577	6.859232727
Varianza	11.86162469	0.001246478
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-0.907180895	
P(T<=t) dos colas	0.460066577	ns

<b>tiempo 48</b>		
	con	sin
Media	7.544656536	7.242583411
Varianza	0.265212297	0.895303882
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1.213323247	
P(T<=t) dos colas	0.348855955	ns

**Bacterias coliformes totales (ufc/g)**

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

<b>tiempo 0</b>		
	con	sin
Media	3.030792866	3.336079988
Varianza	2.942655284	2.260480295
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-2.49506381	
P(T<=t) dos colas	0.130029278	ns

<b>tiempo 12</b>		
	con	sin
Media	5.165497249	6.398104182
Varianza	4.745794808	0.829863609
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-0.691040718	
P(T<=t) dos colas	0.560970666	ns

<b>tiempo 24</b>		
	con	sin
Media	6.171713451	5.602235855
Varianza	0.86142729	0.047717195
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1.389855193	
P(T<=t) dos colas	0.299062156	ns

<b>tiempo 36</b>		
	con	sin
Media	4.782508579	4.364045242
Varianza	6.560142747	3.042283676
Grados de libertad	2	
Estadístico t	0.887079171	
P(T<=t) dos colas	0.468625203	ns

<b>tiempo 48</b>		
	con	sin
Media	5.855645637	5.487652611
Varianza	1.815025011	3.268720069
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1.383414291	
P(T<=t) dos colas	0.300720179	ns

### Levaduras y hongos (ufc/g)

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

<b>tiempo 0</b>		
	con	sin
Media	4.028322629	4.053632614
Varianza	4.242313897	4.154689862
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-2.050220265	
P(T<=t) dos colas	0.17683761	ns

<b>tiempo 12</b>		
	con	sin
Media	4.224502574	4.091255574
Varianza	3.546346083	0.530783206
Grados de libertad	2	
Estadístico t	0.199883443	
P(T<=t) dos colas	0.860051999	ns

<b>tiempo 24</b>		
	con	sin
Media	4.414997241	5.228968451
Varianza	8.068786426	0.51539152
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-0.664187392	
P(T<=t) dos colas	0.574897314	ns

<b>tiempo 36</b>		
	con	sin
Media	4.520909176	4.904201667
Varianza	2.486782671	1.275706492
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-1.483595591	
P(T<=t) dos colas	0.276170457	ns

<b>tiempo 48</b>		
	con	sin
Media	4.77018167	6.288262507
Varianza	6.616484365	0.59175771
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-1.458347532	
P(T<=t) dos colas	0.282113969	ns

pH

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

<b>tiempo 0</b>		
	con	sin
Media	6.976666667	7.453333333
Varianza	0.278033333	0.008533333
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-1.75212998	
P(T<=t) dos colas	0.221848647	ns

<b>tiempo 12</b>		
	con	sin
Media	4.376666667	5.013333333
Varianza	0.110033333	0.052633333
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-2.860320054	
P(T<=t) dos colas	0.103582711	ns

<b>tiempo 24</b>		
	con	sin
Media	4.346666667	4.563333333
Varianza	0.038033333	0.138633333
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-1.889822365	
P(T<=t) dos colas	0.199359231	ns

<b>tiempo 36</b>		
	con	sin
Media	4.163333333	4.266666667
Varianza	0.022533333	0.101733333
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-0.85195705	
P(T<=t) dos colas	0.483977958	ns

<b>tiempo 48</b>		
	con	sin
Media	4.09	4.043333333
Varianza	0.0931	0.052633333
Grados de libertad	2	
Estadístico t	0.638345054	
P(T<=t) dos colas	0.58859103	ns



**Acidez titulable (mL NaOH/g)**

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

<b>tiempo 0</b>		
	con	sin
Media	0.833333333	0.733333333
Varianza	0.063333333	0.123333333
Grados de libertad	2	
Estadístico t	0.288675135	
P(T<=t) dos colas	0.8000000	ns

<b>tiempo 12</b>		
	con	sin
Media	2.583333333	2.15
Varianza	0.145833333	0.0075
Grados de libertad	2	
Estadístico t	2.334868926	
P(T<=t) dos colas	0.144662797	ns

<b>tiempo 24</b>		
	con	sin
Media	3.3	2.833333333
Varianza	0.04	0.063333333
Grados de libertad	2	
Estadístico t	2.000	
P(T<=t) dos colas	0.183503419	ns

<b>tiempo 36</b>		
	con	sin
Media	3.4	3.7
Varianza	0.13	0.28
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-0.608163641	
P(T<=t) dos colas	0.604943847	ns

<b>tiempo 48</b>		
	con	sin
Media	4.1	3.666666667
Varianza	0.64	0.103333333
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1.462614271	
P(T<=t) dos colas	0.281098357	ns

**Fenoles (eq ac. gálico/g)**

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

<b>tiempo 0</b>		
	con	sin
Media	0.1117886	0.0878153
Varianza	0.0000009	0.0000052
Grados de libertad	2	
Estadístico t	19.467539	
P(T<=t) dos colas	0.002628229	**
<b>tiempo 12</b>		
	con	sin
Media	0.092505733	0.089118199
Varianza	0.0000017	0.0000009
Grados de libertad	2	
Estadístico t	4.25524886	
P(T<=t) dos colas	0.051035902	ns
<b>tiempo 24</b>		
	con	sin
Media	0.0737440	0.0627128
Varianza	0.0000014	0.0000004
Grados de libertad	2	
Estadístico t	19.36731843	
P(T<=t) dos colas	0.002655391	**
<b>tiempo 36</b>		
	con	sin
Media	0.073570287	0.076089222
Varianza	0.0000048	0.0000103
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1.428727453	
P(T<=t) dos colas	0.289292532	ns
<b>tiempo 48</b>		
	con	sin
Media	0.085470085	0.063928844
Varianza	0.0000005	0.0000011
Grados de libertad	2	
Estadístico t	21.50432724	
P(T<=t) dos colas	0.002155472	**