

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



“Evaluación de extractos polifenólicos de residuos de Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*) obtenidos mediante técnicas de extracción alternativas para su efecto contra Bacterias Patógenas a Humanos”

Presentada por:

ROSA ELENA GUERRA OLGUÍN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Noviembre 2012

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Tesis

“Evaluación de extractos polifenólicos de residuos de Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*)
obtenidos mediante técnicas de extracción alternativas para su efecto contra Bacterias
Patógenas a Humanos”

Presentada por:

ROSA ELENA GUERRA OLGUÍN

Que se somete a Consideración del H. Jurado Examinador como requisito Parcial para
obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Presidente



Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda

Sinodal

APROBADA



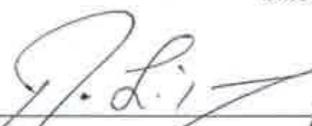
Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Sinodal



QFB. Diana Margarita Morales-Adame

Sinodal



Dr. Ramiro López Trujillo

Coordinador de Ciencia Animal



Dedicatorias

A mis padres por estar siempre a mi lado apoyándome en todo momento, por impulsarme siempre a seguir adelante, y ser mejor como persona y profesionalista.

A mis hermanos que no importa la distancia siempre nos apoyaremos y estaremos unidos.

A mis abuelos, tíos y tías, gracias por apoyarme siempre y por la confianza que han depositado en mí.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial para Angélica Velázquez Arellano, Dolores Barranco Valle, Blanca Estela Hernández García, Nidia Neydi Pérez Vázquez y César Alejandro Martínez de la Parra quienes estuvieron a mi lado en todo momento gracias por su amistad, sus consejos y su apoyo incondicional.

Al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández, gracias por su paciencia, sus consejos, enseñanzas, su confianza y apoyo para la realización de este proyecto.

Gracias también a la QFB. Diana Morales por sus valiosas enseñanzas y sus consejos y por brindarme su apoyo y amistad.

Al personal del CEMAP gracias por su apoyo y disponibilidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo financiero para la realización de esta tesis.

A mis amigos de siempre gracias por su apoyo y motivación para seguir adelante.

El presente trabajo forma parte del Proyecto de Investigación: “Obtención de fitomoléculas bioactivas de bajo impacto ambiental para la sustitución de químicos sintéticos en la agricultura a partir de procesos de fermentación fúngica de residuos de nogal pecanero” clave ECO-2010-C01-150074 de la Empresa Fitokimica Industrial de México S.A. de C.V. misma que pertenece al Corporativo BioIndustrial del Norte y que una parte del trabajo fue llevado a cabo en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro bajo la responsabilidad del Dr. Mario Alberto Cruz Hernández y otra parte en las instalaciones de la empresa.

Contenido general

Resumen	13
Abstract	14
1. Introducción	15
1.2 Justificación.....	17
1.3 Objetivos	19
1.3.1 Objetivo general	19
1.3.2 Objetivos específicos	19
1.4 Hipótesis.....	19
2. Revisión de Literatura.....	21
2.1 Descripción del las bacterias patógenas	21
2.1.1 <i>Salmonella typhi</i>	21
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	22
2.1.3 <i>Enterobacter aerogenes</i>	22
2.1.4 <i>Proteus mirabilis</i>	23
2.1.5 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
2.2 Descripción del material vegetal.....	24
2.2.1 Nogal pecanero.....	24
2.2.2 Características del cultivo	24
2.2.3 Características nutrimentales de la nuez.	25
2.2.4 Cáscara	25
2.2.5 Ruezno.....	26
2.2.6 Tallo.....	26
2.3 Métodos de Extracción.....	26
2.3.1 Extracción asistida por ultrasonido	27
2.3.2 Extracción asistida por microondas.	27
2.3.3 Extracción por infusión.	28

2.4 Fermentación.....	28
2.4.1 Fermentación Líquida o Sumergida.....	29
2.4.2 Biodegradación de taninos	30
2.4.3 Degradación fúngica	30
2.5 Compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos	30
2.5.1 Polifenoles.....	30
2.5.2 Taninos	31
2.5.3 Clasificación de los taninos:.....	32
2.5.3.1 Taninos hidrolizables (TH).....	32
2.5.3.2 Taninos condensados (TC)	33
2.5.4 Taninos Complejos.....	33
2.5.5 Usos de los Taninos.....	33
3. MATERIALES Y METODOS	36
3.1 Obtención de cepas bacterianas	36
3.2 Conservación de las cepas bacterianas	36
3.2.1 Conservación de las cepas en tubos de Agar Nutritivo.....	36
3.2.2 Conservación de las Cepas en Tubos Eppendorf	37
3.2.3 Conservación con Leche Estéril (Congelación).....	37
3.2.4 Conservación con Glicerol (Refrigeración)	38
3.2.5 Conservación por Liofilización.....	38
3.2.6 Prueba de viabilidad	38
3.3 Obtención de extractos.....	39
3.3.1 Método de infusión.....	39
3.3.2 Método de ultrasonido y método de microondas	39
3.4 Obtención del extracto libre de células	40
3.4.1 Preparación del medio líquido	40
3.5 Determinación del contenido de polifenoles.	41

3.5.1 Determinación de Taninos Hidrolizables (Waterman y Mole, 1994).....	41
3.5.1.1 Preparación de la curva patrón de TH	41
3.5.2 Determinación de Taninos Condensados (Swann y Hillis 1959)	42
3.5.2.1 Preparación de la curva patrón de TC	43
3.6 Evaluación de la actividad antibacteriana.....	44
3.6.1 Evaluación por el método Difusión en Agar.....	44
3.6.2 Evaluación por el método de Sensi-discos.....	45
4. Resultados y discusión	47
4.1 Conservación de las cepas bacterianas.	47
4.2 Obtención de los extractos y extractos libres de células.	47
4.2.1 Extractos Acuosos y Etanólicos	47
4.2.2 Extractos libres de células	48
4.3 Evaluación de los extractos etanólicos y acuosos contra las bacterias patógenas a humanos.	52
4.3.1 Evaluación del los extractos usando la técnica de Difusión en Agar ...	52
4.3.2 Evaluación del los extractos usando la técnica de Sensi-discos	73
Conclusiones	75
Referencias bibliográficas	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Formulacion del medio liquido Czapek Dox-Residuo de Nogal.	40
Cuadro 2. Cepas patógenas conservadas.	47
Cuadro 3. Extractos evaluados contra las bacterias patógenas.....	53
Cuadro 4. Extractos libres de células evaluados contra las bacterias patógenas.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva patrón para la determinación de taninos hidrolizables	42
Figura 2. Curva patrón para la determinación de taninos condensados.....	43
Figura 3. Contenido de TH, TC y TT en extractos obtenidos por infusión. Codificación de los tratamientos primera letra el material vegetal (T= tallo, C= cascara, R= ruezno), A=agua, E= etanol, I=infusión.....	48
Figura 4. Taninos Hidrolizables (TH) de residuos fermentados con <i>Aspergillus niger</i>	49
Figura 5. Taninos Hidrolizables (TH) de residuos fermentados con T25	50
Figura 6. Taninos Condensados (TC) de residuos fermentados con <i>Aspergillus niger</i>	51
Figura 7. Taninos Condensados (TC) de residuos fermentados con T25	52
Figura 9. Porcentaje de inhibición de bacterias patógenas a la concentración de 0.5% del extracto RAI.....	54
Figura 10. Porcentaje de Inhibición del extracto CAI a una concentración del 0.5% contra bacterias patógenas.	55
Figura 11. Porcentaje de inhibición del extracto TEI a una concentración de 0.5%, contra bacterias patógenas.	56
Figura 12. Porcentaje de inhibición del extracto REI a una concentración del 0.5% contra bacterias patógenas.	56
Figura 13. Porcentaje de inhibición del extracto CEI a una concentración del 0.5% contra bacterias patógenas.	57
Figura 14. Porcentaje de inhibición del extracto TEI contra bacterias patógenas.....	58
Figura 15. Porcentaje de inhibición del extracto REI contra bacterias patógenas	59
Figura 16. Porcentaje de inhibición del extracto Cáscara en Etanol por Infusión a una concentración del 1%, contra las bacterias patógenas.....	60

Figura 17. Porcentaje de inhibición del extracto TEI a una concentración del 2% contra las bacterias patógenas.....	60
Figura 18. Porcentaje de inhibición del extracto REI contra bacterias patógenas.....	61
Figura 19. Porcentaje de inhibición del extracto CEI al 2% contra bacterias patógenas.....	62
Figura 20. Porcentaje de inhibición del extracto TAI al 2% contra bacterias patógenas.....	63
Figura 21. Efecto inhibitorio del extracto RAI al 2% contra bacterias patógenas.....	64
Figura 22. Porcentaje de inhibición del extracto CAI contra bacterias patógenas.....	65
Figura 23. Porcentaje de inhibición del extracto TEI a una concentración del 5% contra las diferentes bacterias patógenas.....	66
Figura 24. Porcentaje de inhibición del extracto REI a una concentración del 5%, contra bacterias patógenas.....	67
Figura 25. Porcentaje de inhibición del extracto CEI a una concentración del 5%, contra bacterias patógenas en humanos.....	68
Figura 26. Porcentaje de inhibición del extracto Tallo en Agua por Infusión a una concentración del 5% contra bacterias patógenas.....	69
Figura 27. Porcentaje de Inhibición del extracto Ruezno en Agua por Infusión a una concentración del 5% contra bacterias patógenas en humanos.....	70
Figura 28. Porcentaje de inhibición del extracto Cáscara en Agua por Infusión a una concentración del 5% contra bacterias patógenas a humanos.....	70
Figura 29. Porcentaje de inhibición usando la mezcla del extracto ruezno mas cáscara en etanol por infusión al 0.5%.....	71
Figura 30. Porcentaje de inhibición de la mezcla del extracto ruezno mas cáscara en etanol por infusión.....	72
Figura 31. Porcentaje de inhibición de la mezcla de extractos ruezno y cáscara en agua por infusión contra las bacterias patógenas.....	72

Figura 32. Porcentaje de inhibición de la mezcla de extractos ruezno y cáscara en agua por infusión al 1% contra las bacterias patógenas.....73

Figura 33. Porcentaje de inhibición del extracto REU 15' contra las bacterias patógenas.....74

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de extractos obtenidos a partir de residuos de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) por los métodos de infusión, microondas y ultrasonido utilizando como solventes agua y etanol, así como también los extractos libres de células obtenidos mediante fermentación fúngica. Las bacterias patógenas *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli c*, fueron conservadas por los métodos de: Liofilización, tubos inclinados de agar nutritivo, glicerol y leche estéril, respectivamente.

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos etanólicos y acuosos y extractos libres de células se utilizaron los métodos de agar en difusión y discos de papel filtro. Los resultados permitieron determinar que los extractos etanólicos de cáscara, ruezno y tallo y el extracto acuoso de ruezno, respectivamente, a una concentración del 5%, por el método de agar en difusión fueron los más efectivos, estos tuvieron los porcentajes de inhibición más altos frente a las cepas de *E. coli*, *E. aerogenes* y *P. mirabilis*, mientras que las bacterias *S. typhi* y *K. pneumoniae* fueron las cepas más resistentes.

La utilización de extractos etanólicos obtenidos de los residuos del nogal pecanero es efectiva a elevadas concentraciones contra las cepas *E. coli*, *P. mirabilis*, y *E. aerogenes* por lo que en sinergia con otros compuestos nos podría dar a futuro un producto para el control de dichos microorganismos.

Palabras clave: bacterias patógenas, extracto, extracto libre de células, nogal pecanero.

Abstract

This research evaluated the antibacterial activity of extracts obtained from Pecan Walnut tree residues (*Carya illinoensis*) by infusion, microwave, and ultrasound methods, using water and ethanol as solvents, as well as cell free extracts obtained through fungal fermentation. The pathogenic bacteria *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli c* were preserved by methods of: lyophilization, inclined tubes of nutrient agar, glycerol, and sterile milk.

In order to evaluate the inhibitory activity of the ethanol and aqueous extracts and cell free extracts, agar diffusion methods and filter paper discs were used. Results allowed to determine that ethanol extracts of husk, pod, and stem, and the aqueous extract from pod, respectively, at a 5% agar method concentration in diffusion were the most effective, thus having the highest inhibition percentages against the strains of *E. coli*, *E. aerogenes*, and *P. mirabilis*, while *S. typhi* and *K. pneumoniae* bacteria were the most resistant strains.

The use of ethanol extracts obtained from the Pecan Walnut tree residues at high concentrations is effective against *E. coli*, *P. mirabilis*, and *E. aerogenes* strains therefore, in synergy with other compounds, in the future it could provide us with a product for controlling these microorganisms.

Key words: pathogenic bacteria, extract, cell free extract, Pecan Walnut tree.

1. Introducción

Desde tiempos muy remotos las plantas han cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a múltiples propiedades que ellas poseen. Por esta razón en las últimas décadas ha ido tomando cada día mayor importancia su estudio y el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la determinación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales.

Los materiales vegetales son recursos invaluableles y útiles diariamente, los cuales proveen un recurso interminable de materia prima a las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos (Vinatoru, 2001).

Los alimentos vegetales son ricos en fibras, vitaminas, fitoesteroles, compuestos sulfurados, carotenoides y ácidos orgánicos, quienes contribuyen a cuidar la salud, pero también contienen una gran variedad de compuestos fenólicos, estos últimos son bien conocidos por ser agentes protectores, puesto que en las plantas estos metabolitos secundarios son un mecanismo de defensa contra el ataque de patógenos y el estrés ambiental como lo es la exposición a los rayos ultravioleta (UV) y la deshidratación (Méndez, 2010).

En los últimos años, la importancia sobre el estudio de polifenoles ha tomado gran auge, dado a que tienen efectos positivos en la salud humana, ya que poseen propiedades cicatrizantes, antimicrobianas, antidiabéticas, antioxidantes, antitumorales y anticancerígenas, entre otras.

Las enfermedades infecciosas son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y

en el mundo. Por ello, se les considera un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social (León-Ramírez, 2002).

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío para la medicina (López Brea y col., 2003).

La tendencia actual es la creación de productos amigables con el medio ambiente, por lo tanto, el empleo de extractos vegetales obtenidos de forma orgánica y que presenten potencial de inhibir la actividad microbiana de ciertas bacterias patógenas en alimentos, representa una alternativa para sustituir los químicos sintéticos que se usan actualmente en el control de estas.

El nogal pecanero (*Carya illinoensis*, Koch) pertenece a la familia *Juglandaceae* del cual obtenemos la nuez más común en México. El árbol de pecan es el único nogal de origen americano, nativo del norte de México y el sur de Estados Unidos; su cosecha es entre octubre y diciembre (Ramos 2012).

Dependiendo de la parte analizada de la planta se pueden encontrar diferentes principios activos por ejemplo; Hojas: Naftoquinonas (juglona,plumbagina, beta-hidroplumbagina), Pericarpio: ácidos orgánicos, taninos y naftoquinonas , Cotiledones: ácidos grasos insaturados, Tegumento: polifenoles y taninos, Nuez: Vitamina A, B, C y E, sales minerales y yodo (Raissouni 2005).

1.2 Justificación

Actualmente México es el segundo productor de nuez en el mundo debido a que es el centro de origen de esta planta. Los principales estados productores son: Chihuahua y Coahuila que juntos abarcan el 80% de la producción nacional. A la fecha los residuos del nogal no son aprovechados por los productores nogaleros e industriales de nuestro país, desaprovechando una oportunidad de ingresos que se estima como significativa. Además es bien sabido que tradicionalmente los productores solo explotan la nuez en cáscara y existen muy pocos procesadores para la obtención en almendra, todos los demás componentes de los subproductos del proceso han sido ignorados, subestimados o desechados por los productores e industriales mexicanos, por lo que han dejado a un lado la posibilidad de su aprovechamiento integral de esta especie de gran importancia económica para la generación de nuevos y mayores ingresos tanto en años de alta como baja producción en la zona norte de nuestro país.

La obtención de extractos vegetales ricos en metabolitos secundarios es importante para determinar la actividad antimicrobiana contra ciertas bacterias patógenas en alimentos debido a que estas causan serios problemas de salud pública (Méndez, 2010).

El desarrollo del presente trabajo tiene un papel muy importante en el desarrollo de nuevos productos para el control de microorganismos patógenos de importancia alimentaria. Además nos permite poner a prueba la acción bactericida de diversos extractos obtenidos mediante técnicas tradicionales

como lo es la infusión y tecnología emergentes, como lo son el ultrasonido y el microondas y los extractos libres de células.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad biológica *in-vitro* de los extractos obtenidos a partir de los residuos de Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*) sobre bacterias patógenas a humanos.

1.3.2 Objetivos específicos

-Evaluar la actividad biológica *in-vitro* de los extractos obtenidos a diferentes concentraciones sobre *E. coli*, *S. typhi*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* y *E. aerogenes*.

-Seleccionar el extracto que tenga mayor actividad inhibidora sobre las bacterias patógenas en estudio.

1.4 Hipótesis

Al menos un extracto de los residuos del Nogal Pecanero, tendrá la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas a humanos.

Revisión de Literatura

2. Revisión de Literatura

Las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud pública en México. Se transmiten, ya sea por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Afectan principalmente a la población infantil, y tanto su incidencia como su prevalencia dependen del nivel socioeconómico de los pacientes (Vila y col, 2001).

Mundialmente, las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de mortalidad entre los lactantes y niños. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años puede llegar a 50%, aunque esto depende de factores socioeconómicos y nutricionales (Vila y col., 2001).

Las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes. Los cuadros gastrointestinales pueden presentarse en cualquier época del año, pero el riesgo de sufrir estas enfermedades se incrementa en la temporada de calor (Vila y col., 2001).

2.1 Descripción del las bacterias patógenas

2.1.1 *Salmonella typhi*

Se trata de una Enterobacteria que puede llegar a contaminar el agua y los alimentos de origen animal especialmente huevos, aves y cárnicos, y que al

multiplicarse en condiciones adecuadas de crecimiento durante el tiempo suficiente alcanza una dosis tal que al ingerirse produce una patología llamada salmonelosis. Sólo a través del control de alimentos en origen y de unas buenas prácticas de manipulación en toda la cadena se puede reducir la incidencia y llegar a su erradicación (Consumer, 2007).

Los estados en los que se ha reportado el mayor número de casos son: Tabasco, Chiapas, Coahuila, Sinaloa, y Veracruz (Vargas, 2009).

2.1.2 *Escherichia coli*

E. coli agrupa diversas cepas que causan padecimientos extraintestinales, y otras que destacan entre los principales agentes etiológicos del síndrome diarreico. La infección en los niños en edad escolar y en adultos puede cursar de manera asintomática y poco frecuente, así como producir la diarrea del viajero (Rodríguez, 2002).

Dentro de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de salud de México, se ha reportado que *E. coli* enteropatógena (EPEC) se presenta de manera endémica hasta en 6% de la población, cifra muy parecida a la que presentan países industrializados como Alemania y Australia (Vidal, 2007).

2.1.3 *Enterobacter aerogenes*

La *Enterobacter aerogenes* es un bacilo, anaerobio facultativo, prefiere los ambientes con poco o nada de oxígeno, tales como las heces, las plantas de

desecho y el suelo. Sin embargo, también puede sobrevivir e incluso crecer donde el oxígeno es abundante (Romero, 2007).

La *Enterobacter aerogenes* provoca un amplio rango de patologías. Estas patologías incluyen bacteremia, osteomielitis, y artritis séptica, así como infecciones del tracto urinario, gastrointestinales, del tracto respiratorio y la piel. Es un patógeno oportunista nosocomial. Esto es, que causa patología después de que su huésped ha estado ya debilitado, y comúnmente recide en los hospitales. Ocurre más frecuentemente entre niños pequeños y los ancianos, especialmente entre los hombres (Romero, 2007).

2.1.4 *Proteus mirabilis*

P. mirabilis se caracterizan por ser bacilos gram (-), extraordinariamente móviles, su hábitat natural es el intestino del hombre puede originar infecciones en diversas regiones y sistemas del organismo: infección urinaria, enteritis, y sinusitis (Chow A W y col., 1979)

2.1.5 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae es una bacteria de forma bacilar, gram negativa, anaerobia facultativa, inmóvil y usualmente encapsulada, ampliamente esparcida en el ambiente, y presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos; en los seres humanos coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal (Romero, 2007).

2.2 Descripción del material vegetal

2.2.1 Nogal pecanero

El Nogal Pecanero del cual obtenemos la nuez encarcelada pertenece a la familia *Juglandaceae* (Nombre científico es *Carya illinoensis*) que comprenden plantas arbóreas que producen una drupa, en el cual durante la fase de maduración el pericarpio y el mesocarpio se secan y el endocarpio (cáscara) y la semilla (almendra) son consideradas como la nuez. Los géneros más importantes de esta familia son *Junglans* y *Carya* destacando en el primero el nogal de Castilla y en el segundo el nogal pecanero (Méndez, 2010).

La nuez es la fruta del Nogal y se considera una drupa (fruto carnoso que contiene una sola semilla), la cual consta de pericarpio, mesocarpio y semilla (almendra). El Pericarpio y el Mesocarpio es una estructura segmentada en 4 partes que al deshidratarse se abre dejando libre al endocarpio y a la semilla. A la porción del mesocarpio y endocarpio se le conoce como ruezno. Las nueces compuestas por el endocarpio y la semilla normalmente miden de 2 a 6 cm. de largo y pesan de 4 a 12 gramos cada una (SAGARPA, 2007)

2.2.2 Características del cultivo

El Nogal Pecanero es un árbol que puede superar los 30 metros de altura, muy vigoroso y longevo, el cual inicia su vida productiva entre los 6 a 10 años de edad y continúa produciendo en niveles óptimos y comerciales durante poco más de 50 años, aun y cuando con un buen manejo técnico

adecuado se puede alargar su vida productiva teniendo casos de árboles que duran hasta 100 años (SAGARPA, 2007).

El Nogal de la nuez pecanera crece comúnmente en suelos arcillo-arenosos bien drenados no sujetos a inundaciones prolongadas. Sin embargo, aparece en suelos de textura pesada, donde se limita a suelos aluviales de origen reciente. Rara vez crece en suelos planos mal drenados. En su área de origen crece en clima húmedo; con precipitaciones medias anuales de 760 mm y un máximo de 2,010 mm. Las temperaturas promedio en el verano que oscilen entre los 27° C, con extremas de 41 a 46° C, las temperaturas promedio en invierno adecuadas son entre 10 y -1° C, con extremas de -18 a 29° C (COMENUEZ, 2012).

2.2.3 Características nutrimentales de la nuez.

La nuez pecanera es rica en ácidos grasos mono y poli insaturados, como los omega 3 y omega 6, además contribuyen en el desarrollo normal del sistema nervioso, la nuez pecanera, al mismo tiempo, es fuente de proteína rica en arginina, fitoesteroles y compuestos fitoquímicos contiene vitamina E , vitaminas del complejo B y Hierro (Moreno, 2012).

2.2.4 Cáscara

La cáscara representa aproximadamente el 50% de la nuez y tiene poco o nulo valor actualmente. Tiene usos tales como: material para jardinería, abrasivo, carbón activado y como fuente de pigmentos y taninos, entre otros (Ramos 2012).

La cáscara de nuez es una fuente excepcional de taninos y pueden ser obtenidos con altos rendimientos (cerca del 40 % en base al peso seco) y son más reactivos que aquellos provenientes de la Mimosa, el estándar industrial para taninos condensados. Esta ventaja puede ser aprovechada en mercados de especialidad química (Ramos, 2012).

2.2.5 Ruezno

Del pericarpio y mesocarpio (Ruezno), se obtiene un colorante denominado *nogalina*, es un aceite que se utiliza como base de distintos colorantes y tintes (Parra, 2008). Por otro lado estas dos capas externas del fruto, junto con las hojas, contienen abundantes taninos que le confieren una propiedad fuertemente astringente; así como también, derivados quinónicos, de donde la glucona es la más importante. Esta sustancia es amarga lo que le permite tener propiedades antisépticas, cicatrizantes, tonificantes, vermífugas e hipoglucemiantes (Pamplona, 2006)

2.2.6 Tallo

Otro subproducto que se obtiene del nogal es su madera. Ya que ésta, toma tonalidades marrones veteadas de negro según el árbol va envejeciendo; estas características le dan valor a la madera, pero esto se consigue hasta los 60 a 80 años de vida del árbol (Luna, 1990).

2.3 Métodos de Extracción

Para obtener un extracto, primero que todo es importante identificar la planta deseada y la parte que contiene los constituyentes útiles.

Adicionalmente, la determinación de una técnica precisa de cosecha y métodos de preservación de la planta por utilizar es de crucial importancia. El mecanismo de extracción involucra dos fenómenos físicos: difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto (Vinatoru, 2001).

2.3.1 Extracción asistida por ultrasonido

La primera aplicación comercial del ultrasonido fue en 1917; desde entonces, el tema se ha desarrollado y expandido a un gran número de aplicaciones. La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Gao y Liu, 2005).

El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos (Vinatoru, 2001).

2.3.2 Extracción asistida por microondas.

El uso de la tecnología del microondas se basa en la transferencia de ondas electromagnéticas en determinadas frecuencias a algún material con el fin de calentarlo, el funcionamiento de la radiación electromagnética por medio de microondas depende de muchos parámetros entre los que se

encuentran el estado físico del material, la composición química del material, la temperatura, la potencia, el tiempo de incidencia, entre otros (Shen, G. y Lee H. K, 2003). La irradiación de microondas causa movimiento moléculas por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a una rápida transferencia de energía al solvente y materia vegetal.

2.3.3 Extracción por infusión.

Se basa en la selección de solventes, temperatura o agitación con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa (Gao y Liu, 1997)

2.4 Fermentación

El proceso conocido como fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica catalizada por enzimas. Los productos comercialmente importantes de las fermentaciones industriales pertenecen a cuatro categorías principales: células microbianas, moléculas grandes como enzimas y polisacáridos, productos básicos y metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento celular. Las células utilizadas para obtener estos productos tienen una gran variedad de propiedades bioquímicas y fisiológicas. La producción comercial de productos de fermentación ha empleado principalmente diversas especies de bacterias, levaduras y hongos (Ward, 1989).

Para que un proceso de fermentación se desarrolle adecuadamente se debe establecer inicialmente el medio óptimo para el crecimiento de microorganismos. Esto incluye la determinación de parámetros tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto y nutrientes, entre otros; con el fin de que el microorganismo, ya sea hongo, bacteria o levadura, desarrolle apropiadamente su metabolismo y obtener de esta manera la base de un producto de interés comercial (Forero, 2002).

2.4.1 Fermentación Líquida o Sumergida.

La fermentación líquida o sumergida es definida como la técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas, este es el método más usado por la industria biotecnológica. En comparación con la fermentación sólida, presenta las siguientes ventajas: se obtiene un producto más homogéneo, es más sencillo el control de los factores de fermentación como la temperatura, aireación, agitación y pH, presenta mejor distribución del oxígeno y del calor suministrado al sistema, y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa. La fermentación sumergida se realiza principalmente usando tres métodos de alimentación del sustrato: fermentación en lote, fermentación en lote alimentado, y fermentación en cultivo continuo (Crueger, 1989).

2.4.2 Biodegradación de taninos

Las investigaciones se han enfocado en cómo obtener pequeñas moléculas de taninos con alta actividad biológica que puedan ser utilizados en diversas aplicaciones; por lo que la biodegradación es uno de los caminos más eficientes para lograr degradar moléculas grandes de taninos en pequeñas moléculas con bio-actividades de alto valor por medio del uso de algunos microorganismos o ciertas enzimas (Saxena y col; 1995).

2.4.3 Degradación fúngica

La degradación de taninos hidrolizables, particularmente galotaninos, es mejor conocida en sistemas fúngicos (Ventura-Sobrevilla, 2007).

Reacciones de hidrólisis y oxidación ocurren durante la degradación de taninos, catalizadas por diferentes enzimas producidas por microorganismos. Estas enzimas hacen referencia a la tanasa, polifenoloxidasas y descarboxilasas. Los galotaninos son fácilmente degradados por bacterias, hongos y levaduras, mientras que los elagitaninos son más difíciles de degradar debido a que su estructura es más compleja (Ramos, 2012).

2.5 Compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos

2.5.1 Polifenoles

Los polifenoles son moléculas complejas que tienen dos o más anillos aromáticos enlazados, se forman a partir de la ruta del ácido shiquímico

(Swain, 1979), en el retículo endoplásmico liso y rugoso y se depositan dentro de las vacuolas celulares. Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura química en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos estos son los compuestos fenólicos más comunes en el reino Plantae,; sin embargo, los flavonoides representan el 60%, mientras que los ácidos fenólicos representan el 30 % de los fenoles ingeridos en la dieta humana diaria (Strack, 1997).

2.5.2 Taninos

Los taninos son compuestos no nitrogenados con un peso molecular entre 300 y 20,000 Da (Khanbabaee y Ree, 2001), amorfos, de sabor astringente, débilmente ácidos la mayoría de ellos solubles en agua que se encuentran presentes en el citoplasma y las vacuolas de las células como metabolitos secundarios (Sora, 1984; Esau, 1974). Después de las ligninas, los taninos son el segundo grupo más abundante en compuestos fenólicos presentes en las plantas y se encuentran distribuidos principalmente en cortezas, maderas, hojas, frutos, raíces y semillas (Haslam, 1989, 1998).

Pertenecen al grupo de los antioxidantes, los cuales pueden retardar o inhibir la oxidación de lípidos o de otras moléculas inhibiendo la iniciación o propagación de cadenas reactivas de oxidación. Se encuentran abundantemente en nuestra dieta y existe evidencia de que juegan un rol importante en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Ramos, 2012)

2.5.3 Clasificación de los taninos:

2.5.3.1 Taninos hidrolizables (TH)

Este grupo involucra un alcohol polihídrico esterificado con ácido gálico o alguno de sus derivados. Compuestos por ésteres de glucosa u otros polioles, como pueden ser el ácido gálico, digálico, m-digálico, hexahidroxi-difénico o sus derivados. Los hidroxilos de estos carbohidratos están parcial o totalmente esterificados con grupos fenólicos como el ácido gálico o el ácido elágico, y por hidrólisis con ácidos, bases o enzimas se rompe el enlace glucosídico para liberarse azúcar y otros compuestos fenólicos que lo integran (López, 1989)

Los taninos hidrolizables se pueden dividir en los siguientes subgrupos:

- *Galotaninos*: son compuestos que consisten de una molécula de glucosa, la cual se encuentra rodeada por unidades de ácido gálico. La fuente más famosa de galotaninos es el ácido tánico de origen vegetal, el cual tiene una molécula de D-glucosa y de 5 a 9 unidades de galoilos ligados a uno de los centros del núcleo de azúcar. Es fácilmente hidrolizable por la acción de la enzima tanasa (Sánchez, 2001).
- *Elagitaninos*: En una molécula de elagitanino un grupo hexahidroxi-difenoilo (HHDP) se encuentra unido por un enlace éster a los grupos hidroxilo de una glucosa. Los elagitaninos pueden liberar ácido elágico y gálico por hidrólisis ácida o básica (Hong, 1995).

2.5.3.2 Taninos condensados (TC)

Los taninos condensados también llamados proantocianidinas corresponden a un grupo muy particular de oligómeros y polímeros de polihidroflavan-3-ol ligados por enlaces covalentes carbono-carbono entre las diversas subunidades flavonoides. Su elevado número de grupos fenólicos hidroxilados le dan una elevada capacidad de formar compuestos complejos o quelatos con proteínas (Hagerman y col. 1998) con iones metálicos (Van Acker y col. 1998) y con otras moléculas como los polisacáridos (Mueller-Harvey y McAllan, 1992).

Los taninos condensados son más abundantes en cortezas y maderas que los elagitaninos y los galotaninos, y son más resistentes al ataque microbiano (Ventura Sobrevilla y col., 2008). Los taninos condensados incluyen los flavonoides; que a su vez se subdividen en antocianidinas y leucoantocianidinas y la catequina (Sánchez, 2001).

2.5.4 Taninos Complejos

Son aquellos compuestos que se forman por el resultado de la unión de catequinas o epicatequinas con ácido gálico o elágico, debido a las reacciones catalizadas con luz, oxígeno y calor (Aguilera Carbó y col., 2008).

2.5.5 Usos de los Taninos

Los taninos, debido a sus propiedades, tienen mucha utilidad en medicina y en la industria. Los taninos cumplen con una función cicatrizante al acelerar la curación de las heridas, entre numerosas aplicaciones médicas

también se utiliza para el control de la diarrea, como antimicrobiano, como antídoto contra venenos y como antiinflamatorio; también los taninos son utilizados en la industria en el procesamiento de alimentos, tanto de comidas como de bebidas y en la industria de pinturas y tintas (Villanueva, 2007). Además es importante mencionar que por su actividad antimicrobiana son utilizados como inhibidores del crecimiento de microorganismos (Alnicolsa del Perú, 2010; Akiyama y col., 2001).

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Obtención de cepas bacterianas

Las cepas patógenas *K. pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae*), *P. mirabilis* (*Proteus mirabilis*) y *E. aerogenes* (*Enterobacter aerogenes*), fueron donadas por el Hospital Universitario, y las cepas *S. typhi* (*Salmonella typhi*), *E. coli* (*Escherichia coli*) y *E. coli c*, (*Escherichia coli c*) fueron proporcionadas por el Centro de Microbiología Aplicada (CEMAP).

3.2 Conservación de las cepas bacterianas

3.2.1 Conservación de las cepas en tubos de Agar Nutritivo

Se prepararon 8 tubos de ensaye con tapón de rosca, previamente etiquetados para cada una de las bacterias en estudio, respectivamente. A cada uno de los tubos se le agregó 10 mL de Agar Nutritivo, se esterilizaron y se dejaron solidificar inclinados.

Posteriormente se inocularon, tomando una asada de la bacteria, se sembró con la técnica de estría y se llevaron a incubar por 21 h a 35 °C. Una vez que se verificó que la bacteria estaba en condiciones óptimas, se llevo a conservación en una solución de glicerol, agregando glicerol previamente estéril en el tubo hasta que cubrió por completo a la bacteria.

3.2.2 Conservación de las Cepas en Tubos Eppendorf

Se prepararon 12 matraces de 125 mL, con 50 mL de caldo nutritivo. También se preparó solución salina (9 g de NaCl /1,000mL de agua destilada), solución de leche descremada (2g de leche /100 mL de agua destilada), glicerol al 30%, tubos de centrifuga de 50 mL, tubos eppendorf, todo el material se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente se inocularon los matraces de caldo nutritivo con una asada de la bacteria, se colocaron en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific Innova 43) por 21 h, a 35 °C y 180 rpm. Los tubos de centrifuga de 50 mL estériles, se colocan sobre una balanza y se les agregan de 35-40 mL de la solución que contiene la bacteria, se cierra perfectamente. Se centrifugó por 15 minutos a 4500 rpm a 5°C, posteriormente se decanto el sobrenadante, se le agregó 20 mL de solución salina estéril y se agitó en vortex hasta deshacer el botón. Nuevamente se centrifugó por 15 min a 4500 rpm, manteniendo la temperatura a 5°C. Después de decantar se agregaron 20 mL de solución salina estéril, se agitó en vortex, y se volvió a centrifugar y a decantar.

Una vez decantado se marcaron los tubos ya que uno se utilizó para la conservación en leche estéril y otro para la conservación en glicerol.

3.2.3 Conservación con Leche Estéril (Congelación)

Con ayuda de una micropipeta se agregaron 5 mL de leche estéril al tubo que contenía la bacteria, se agitó en vortex hasta homogeneizar, con otra micropipeta se colocaron 500 µL de la mezcla (suspensión de células) en los

viales previamente identificados de la suspensión de células, y se ultracongelaron a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ congelar. Esto se realizó por triplicado.

3.2.4 Conservación con Glicerol (Refrigeración)

Con ayuda de una micropipeta se agregaron 10 mL de la solución salina al tubo de centrifuga que contenía la bacteria, se agitó en vortex hasta homogeneizar, con otra micropipeta se le agregaron 0.25 mL de la suspensión de células, y con otra micropipeta se le agregaron 0.75 mL de glicerol estéril en los viales previamente identificados, se agitó en vortex hasta homogeneizar y se refrigeraron a 4°C , esto se realizó por triplicado.

3.2.5 Conservación por Liofilización

Para esto, se llevó a cabo el mismo procedimiento que el de conservación en leche, pero después de la ultracongelación $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, se colocaron en una liofilizadora (LABCONCO DE 6 L), hasta secar la leche por completo, se liofilizaron 8 viales de cada bacteria.

3.2.6 Prueba de viabilidad

Después de la conservación se realizó la prueba de viabilidad, la cual consistió en tomar una alícuota de la suspensión bacteriana, (en el caso de las cepas conservadas por el método de leche estéril y glicerol), y colocarla en un matraz con caldo nutritivo, se incubo por 21 h a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una incubadora con agitación, transcurrido ese tiempo se tomo una asada del concentrado celular

y se sembró en medios selectivos, esto con el fin de verificar la pureza y viabilidad de las cepas.

3.3 Obtención de extractos

3.3.1 Método de infusión

Para la extracción de los polifenoles los agentes extractantes usados fueron agua y etanol. Se colocaron 150 g de materia prima (ruezno, tallos o cascara), en un vaso de precipitado de 2 L forrado con papel aluminio, a este se le agregaron 600 mL de agua destilada. Se mantuvieron a una temperatura de 60°C por un tiempo de 7 h, en una parrilla de calentamiento con agitación. Una vez transcurrido ese tiempo se filtró con manta.

Para la obtención del extracto etanólico se utilizó residuo de la extracción con agua, al cual se le agregaron 600 mL de etanol, a una temperatura de 60 °C por un tiempo de 7 h. Para la evaporación del etanol, se colocó nuevamente el extracto a una temperatura de 50 °C. Se manejó una temperatura de 60° C para evitar la pérdida de los compuestos fenólicos que se deseaban obtener. Los extractos obtenidos se dejaron enfriar y se guardaron en frascos forrados y etiquetados en el congelador a -4° C (Méndez, 2010).

3.3.2 Método de ultrasonido y método de microondas

Los extractos de Ruezno en etanol por ultrasonido (REU 15), Tallo en agua por microondas (TAM 30) Y Cáscara en agua por ultrasonido (CAU 15),

fueron proporcionados por el departamento de Investigación en Alimentos, de la UAdeC (Moreno, 2012).

3.4 Obtención del extracto libre de células

3.4.1 Preparación del medio líquido

Para preparar el medio líquido se siguió la formulación del medio Czapek Dox sustituyendo la fuente de glucosa por el residuo de nogal (Cuadro 1) eliminando el agar bacteriológico (Ramos, 2012).

Cuadro 1. Formulación del medio líquido Czapek Dox-Residuo de Nogal.

Sustancia	Cantidad (g/L)
Residuo de nogal	30
Nitrato de sodio	3
Fosfato dipotásico	1
Sulfato de magnesio	0.50
Cloruro de potasio	0.50
Sulfato ferroso	0.01

Se prepararon 500 mL del medio de cultivo de residuo (Cuadro 1) en 4 matraces Erlenmeyer de 1,000 mL. Los matraces se taparon con tapones de gasa y algodón y se sometieron a esterilización en autoclave a 121^oC por 15 minutos. Una vez enfriado el medio, se inocularon con 1x10⁶ esporas/mL del hongo *Aspergillus niger* y *Trichoderma asperellum* (T-25), y se colocaron en una incubadora con agitación a 180 rpm con una temperatura de 30^oC durante 4 días. Transcurrido ese tiempo se filtró el fermentado con ayuda de un matraz Kitazato, primero usando papel filtro de poro abierto, el segundo filtrado fue

usando papel filtro poro cerrado, finalmente con papel filtro Millipore de 045 μm .

3.5 Determinación del contenido de polifenoles.

A los extractos obtenidos con los diferentes agentes extractantes se les cuantificó el contenido de polifenoles. Las técnicas utilizadas fueron las siguientes: Folin-Ciocalteu (Waterman y Mole, 1994): para cuantificar los taninos hidrolizables (TH) de los extractos y HCl/butanol (Swann y Hillis, 1959) para taninos condensados.

3.5.1 Determinación de Taninos Hidrolizables (Waterman y Mole, 1994)

Se colocaron 400 μL de la muestra en tubo de ensaye al mismo tubo se le adicionaron 400 μL del reactivo comercial Folin - Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar por 5 minutos. Después se adicionaron 400 μL de carbonato de sodio 0.01M, se agitó y se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente se diluyó con 2.5 mL de agua destilada y se realizó la lectura en un espectro UV/Visible a 725 nm, para determinar taninos hidrolizables.

3.5.1.1 Preparación de la curva patrón de TH

Se preparó una curva patrón utilizando una solución estándar de ácido gálico a una concentración de 200 ppm. En tubos etiquetados del 0 al 5 se agregaron 0, 80, 160, 240, 320 y 400 μL de solución madre de ácido gálico respectivamente, y del tubo 0 al 5 400, 320, 240, 160, 80 y 80 μL de agua destilada hasta tener un volumen final de 400 μL . Después se les añadieron 400 μL de reactivo de

Folin–Ciocalteu, se agitaron los tubos y se dejaron reposar 5 min.; luego se agregaron 400 μL de Na_2CO_3 0.01 M, se agitaron los tubos y reposaron 5 min. Posteriormente a cada tubo se les agregó 2.5 mL de agua destilada para después leer a 725 nm de longitud de onda. El ensayo se realizó por triplicado, posteriormente las lecturas fueron analizadas y la ecuación obtenida fue utilizada para la cuantificación de equivalentes de ácido gálico.

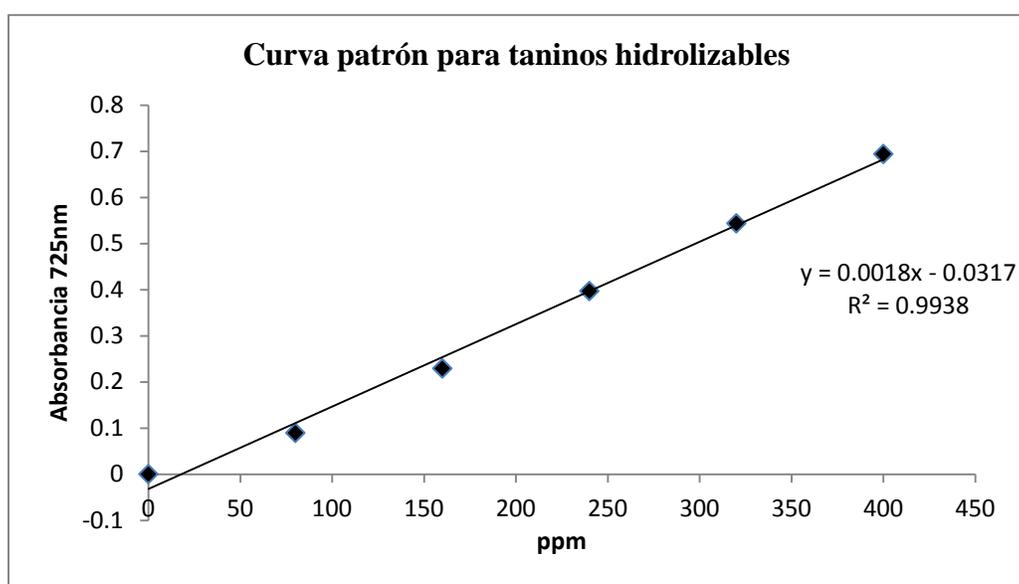


Figura 1. Curva patrón para la determinación de taninos hidrolizables

3.5.2 Determinación de Taninos Condensados (Swann y Hillis 1959)

En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 mL de la muestra o el estándar, sobre este se agregaron 3 mL de HCl/butanol (1:9) y 0.1 mL de reactivo férrico. Los tubos se taparon, dentro de los tapones se colocaron empaques, para evitar la evaporación del butanol. Todos los tubos se calentaron por 1 hora en un baño María a 100 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se dejaron

enfriar y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible (Thermo Scientific Biomate 3) a 460 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

3.5.2.1 Preparación de la curva patrón de TC

Se preparó una curva patrón con una solución estándar de catequina a una concentración de 1.0 g/L (figura 2). Se etiquetaron 5 tubos del 0 al 4, agregándole a cada tubo 0, 125, 250, 375 y 500 μL respectivamente de solución madre de catequina; se agregó a cada tubo 500, 375, 250, 25 y 0 μL de agua destilada para completar el volumen que indica la técnica. Después se le añadió 3 mL de HCl/Butanol (1:9) y 0.1 mL de reactivo férrico. Los tubos se taparon, dentro de los tapones se colocaron empaques, para evitar la evaporación del butanol y fueron sometidos a baño María a 100°C durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible a 460 nm.

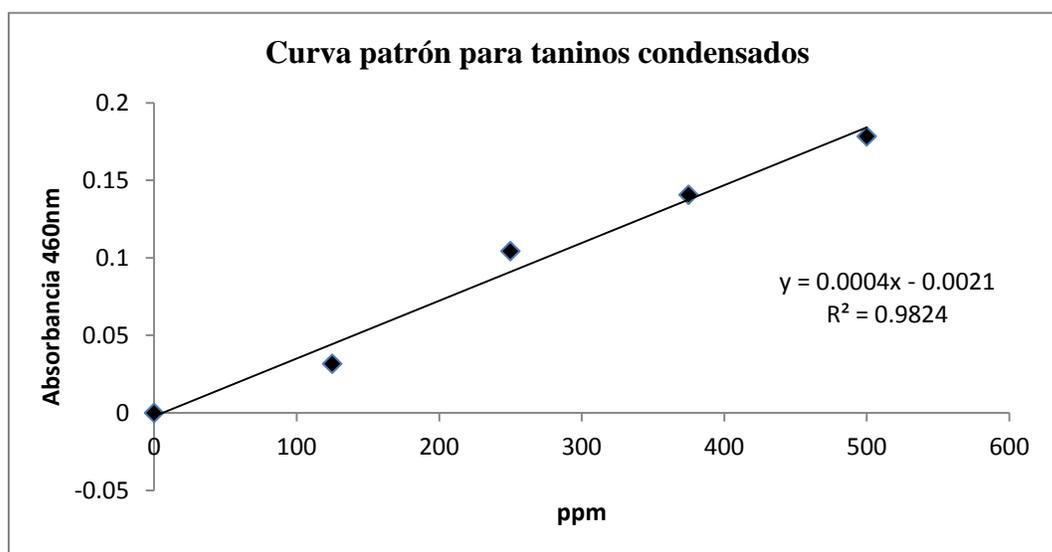


Figura 2. Curva patrón para la determinación de taninos condensados

3.6 Evaluación de la actividad antibacteriana

3.6.1 Evaluación por el método Difusión en Agar

Inicialmente se prepararon matraces con agar nutritivo, se esterilizaron y una vez que se enfriaron se les agregó la concentración del extracto a 0.5 %, 1 %, 2 % y 5 %, respectivamente, se homogeneizo y posteriormente se vaciaron en cajas Petri con aproximadamente 30 mL de la mezcla, se emplearon cajas de agar nutritivo como testigo negativo, al testigo positivo se le agregó un antibiótico de amplio espectro (Gentamicina), en la misma concentración que los extractos.

Se preparó un matraz de caldo nutritivo para cada bacteria, se inoculó con una asada, se colocó en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific Innova 43) por 21h a 35°C, una vez que se verificó el crecimiento de la bacteria se tomó 1 mL del concentrado celular y se hicieron diluciones de 1×10^{-1} a 1×10^{-7} . Para la dilución se prepararon previamente los tubos de ensaye con 9 mL de solución salina al 0.9%.

Para inocular las cajas Petri que contenían el medio de cultivo más el extracto se agregaron 50 μ L de la dilución de la bacteria patógena 1×10^{-7} , y se realizó un barrido con una varilla de vidrio, se incubaron por 21h a 35°C. Transcurrido ese tiempo se realizó el conteo de colonias y se calculó el porcentaje de inhibición, considerando el número de colonias del testigo (UFC) como el 0% de inhibición y el testigo comercial (Gentamicina) como el 100% de inhibición.

3.6.2 Evaluación por el método de Sensi-discos.

Se preparó un matraz de caldo nutritivo para cada bacteria, se inoculó con una asada de la bacteria, luego se colocó en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific Innova 43) por 21h a 35°C, una vez que se verificó el crecimiento de la bacteria se tomó 1 mL del concentrado celular y se prepararon las diluciones de la bacteria de 1×10^{-1} a 1×10^{-2} , se tomó la dilución 1×10^{-2} para realizar la evaluación.

En cajas de agar nutritivo, se colocaron 50 μ L de la dilución 1×10^{-2} de la bacteria se barrió con una varilla de vidrio y posteriormente se colocaron cuatro discos de papel filtro, de manera equidistante. Una vez que fueron colocados, los discos se humedecieron con 10 μ L del extracto concentrado. En el caso del testigo a los discos se les agregó gentamicina (antibiótico de amplio espectro), las cajas se etiquetaron, se sellaron y se incubaron a 35 °C por 21h. Transcurrido ese tiempo se realizó la medición del halo de inhibición con ayuda de un vernier digital SR44.

Resultados y Discusión

4. Resultados y discusión

4.1 Conservación de las cepas bacterianas.

Las cepas evaluadas (Cuadro 2) fueron sometidas a proceso de conservación. Para esto se utilizaron 4 métodos; Leche Estéril, Glicerol, Tubos inclinados de Agar Nutritivo y Liofilización.

Cuadro 2. Cepas patógenas conservadas.

Cepas Bacterianas
Salmonella typhi
Klebsiella pneumoniae
Enterobacter aerogenes
Proteus mirabilis
Escherichia coli
Escherichia coli c

4.2 Obtención de los extractos y extractos libres de células.

4.2.1 Extractos Acuósos y Etanólicos

Se detectaron diferencias significativas en la concentración de taninos totales entre las especies vegetales evaluadas, lo que sugiere que unas partes de la planta (ruezo, cascara y tallo) muestran un mayor contenido de taninos totales que otras. La composición fisicoquímica puede variar según el grado de desarrollo de la planta o de la estación o temporada en la que es recolectada (Moreno 2012).

Se pudo observar que la concentración de taninos totales se ve influenciada por el tipo de solvente empleado, además de la interacción de la planta por solvente (Moreno, 2012). El figura 3 se observa la concentración de taninos hidrolizables, condensados y taninos complejos en las diferentes muestras analizadas.

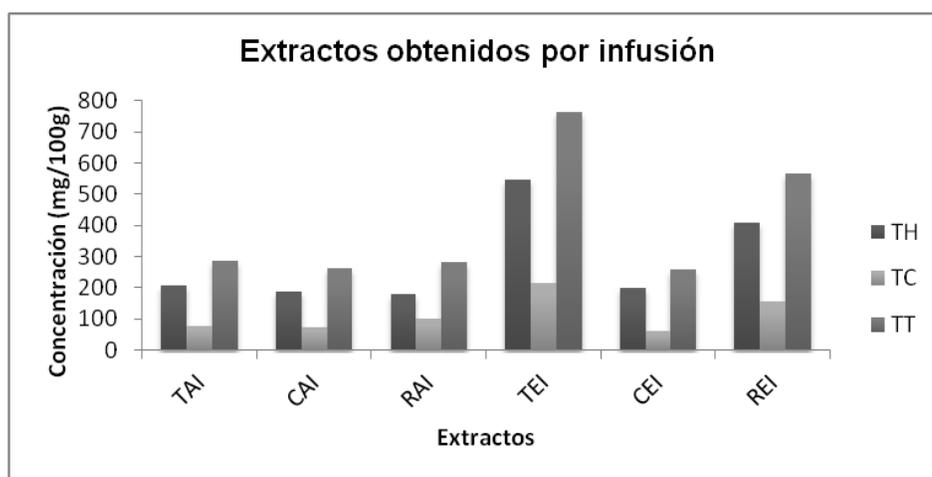


Figura 3. Contenido de TH, TC y TT en extractos obtenidos por infusión. Codificación de los tratamientos primera letra el material vegetal (T= tallo, C= cascara, R= ruezno), A=agua, E= etanol, I=infusión.

4.2.2 Extractos libres de células

En la figura 4, se puede observar que la concentración de taninos hidrolizables es mayor en el residuo de cáscara y que usando la cepa de *Aspergillus niger* se obtiene la mayor producción de estas fitomoléculas a las 24 horas de la fermentación. En menor cantidad se encuentran TH en las fermentaciones de tallos y ruezno, ya que como se aprecia en la figura 5, la mayor producción de TH en tallos se obtiene a las 48 horas con una cantidad

de 322.63 ppm, mientras que en la fermentación usando el ruezno, se obtiene 216.80 ppm de TH a las 96 horas (Ramos, 2012)

Estos resultados se deben principalmente a que la cáscara de nuez es una fuente excepcional de taninos y pueden ser obtenidos con altos rendimientos (cerca del 40% en base a su peso seco).

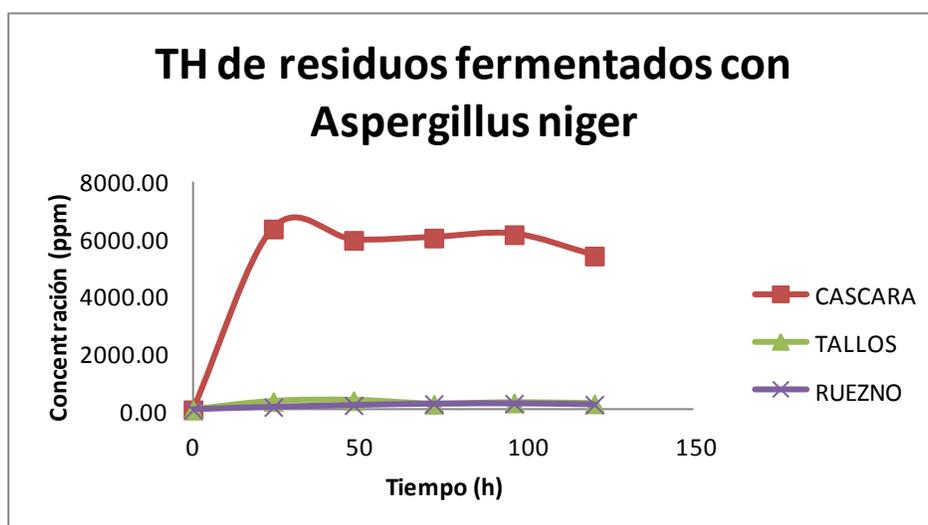


Figura 4. Taninos Hidrolizables (TH) de residuos fermentados con *Aspergillus niger*

En la fermentación usando la cepa de T25 (figura 5), la concentración de TH fue significativa, ya que como se observa en la figura 6, a las 24 horas de iniciada la fermentación hubo una producción de 5746.67 ppm de TH, mientras que en el residuo de cáscara la mayor producción se logró a las 72 horas con 5496.67 ppm de TH. La cantidad de TH en la fermentación de ruezno no fue significativa en comparación con la cáscara y los tallos (Ramos, 2012)

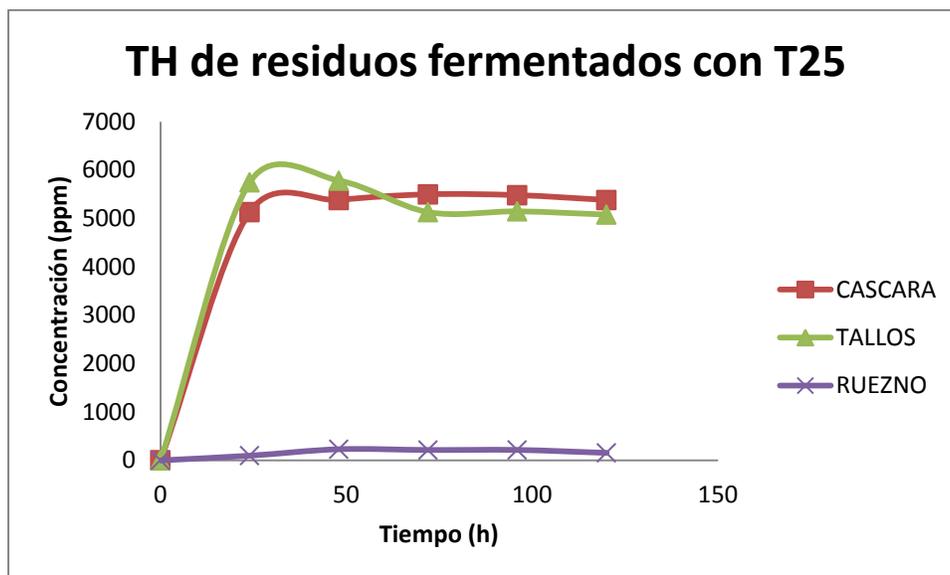


Figura 5. Taninos Hidrolizables (TH) de residuos fermentados con T25

En la figura 6 se puede observar que la concentración de TC en el residuo de cáscara usando una fermentación con *Aspergillus niger* es muy alta, ya que se producen 20,163.64 ppm de estas fitomoléculas al alcanzar las 96 horas. En segundo lugar de producción de estos taninos se encuentra el medio de tallos, ya que su máxima producción es de 11,496.97 ppm a las 120 horas de la fermentación (Ramos, 2012)

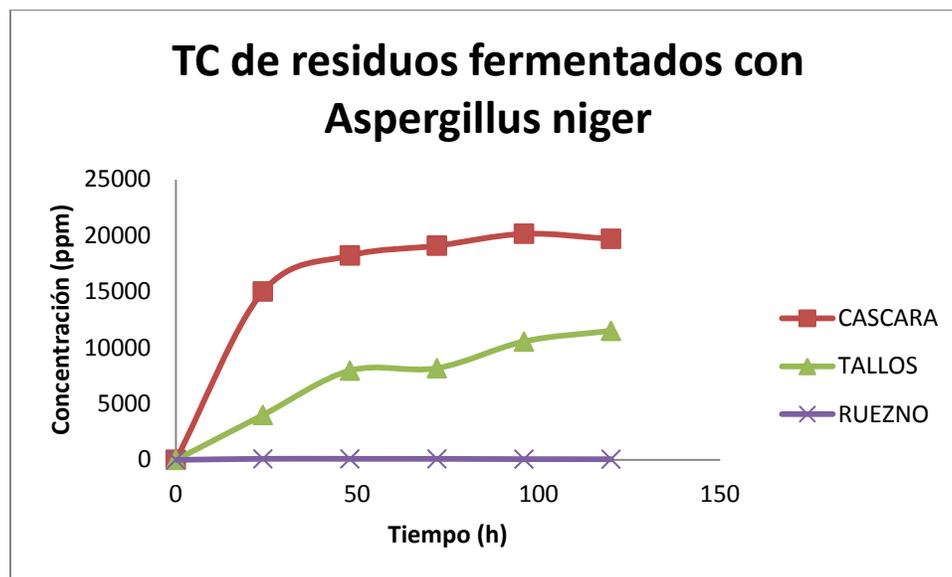


Figura 6. Taninos Condensados (TC) de residuos fermentados con *Aspergillus niger*

En la figura 7 se observan los resultados de la concentración de TC usando una fermentación con la cepa de *T25*. La máxima producción de TC se da en el medio de cáscara, seguido del medio de tallos, con una cantidad de 8390.91 y 5027.27 ppm respectivamente. El medio de cáscara sigue siendo el mejor para la producción de TC, ya que no solamente tuvo una producción mayor, sino que también lo hizo en el menor tiempo, con tan solo 96 horas de fermentación. El medio de Ruezno, alcanzó 180.27 lo cual muestra una diferencia significativa en comparación con los demás materiales (Ramos, 2012)

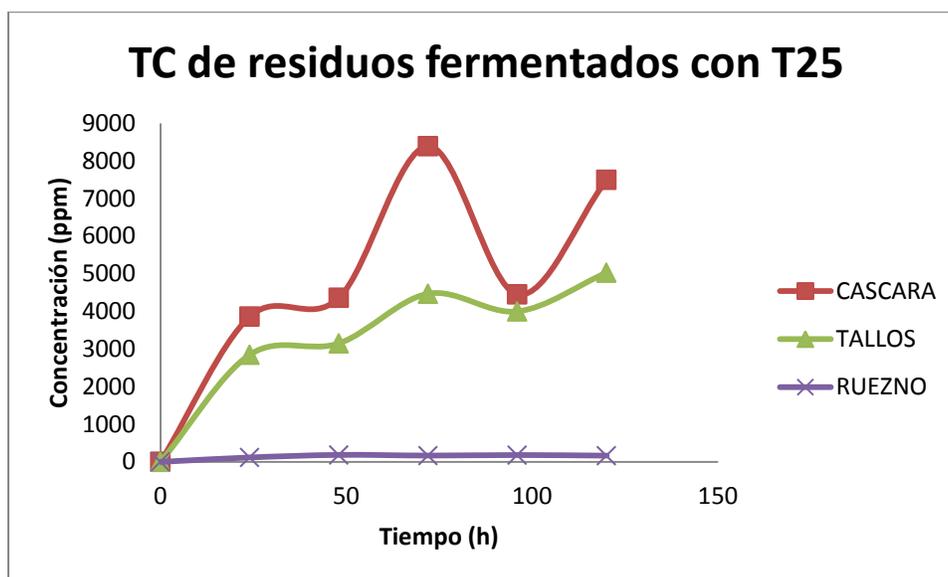


Figura 7. Taninos Condensados (TC) de residuos fermentados con T25

4.3 Evaluación de los extractos etanólicos y acuosos contra las bacterias patógenas a humanos.

4.3.1 Evaluación de los extractos usando la técnica de Difusión en Agar

A continuación se presentan los resultados obtenidos con los extractos, excepto los de microondas y ultrasonido (cuadro 4) y los fermentados (cuadro 5) usando la técnica de agar en difusión; estos fueron evaluados a concentraciones de 0.5%, 1%, 2%, y 5% contra las bacterias patógenas en humanos; *E. coli*, *S. typhi*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* y *E. coli* c.

Cuadro 3. Extractos evaluados contra las bacterias patógenas.

Material Vegetal	Método de Extracción	Agente Extractante	Clave de Identificación
Ruezno	Infusión	Agua	RAI
		Etanol	REI
	Ultrasonido	Etanol	RAU 15'
Cáscara	Infusión	Agua	CAI
		Etanol	CEI
	Ultrasonido	Agua	CAU 15'
Tallo	Infusión	Agua	TAI
		Etanol	TEI
	Microondas	Agua	TAM 30''

Cuadro 4. Extractos libres de células evaluados contra las bacterias patógenas

Material Vegetal	Cepa Fúngica	Clave de Identificación
Ruezno	Aspergillus niger	Asp Rz
	Trichoderma 25	T25 Rz
Cáscara	Aspergillus niger	Asp Cas
	Trichoderma 25	T25 Cas

En la figura 8 se puede observar la acción del extracto TAI el cual presento efecto inhibitorio frente a las bacterias *E. coli* y *E. aerogenes* en un 14.8% y 1.2% respectivamente.

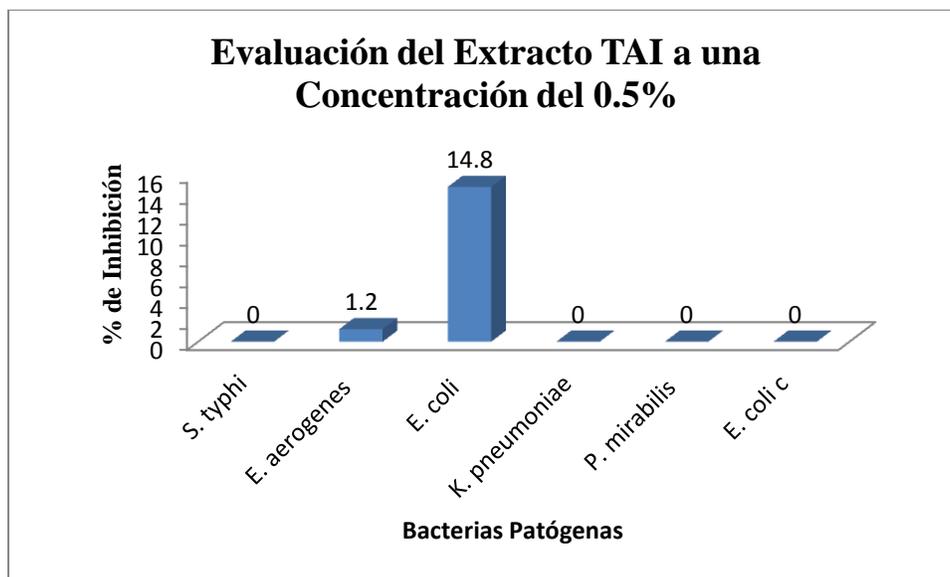


Figura 8. Porcentaje de inhibición de bacterias patógenas, con el extracto de TAI a la concentración de 0.5%

La figura 9 muestra el efecto del extracto Ruezno en Agua por Infusión a una concentración del 0.5%, éste presenta actividad inhibitoria frente a *E. aerogenes* con un 11% y *E. coli* 6.3%.

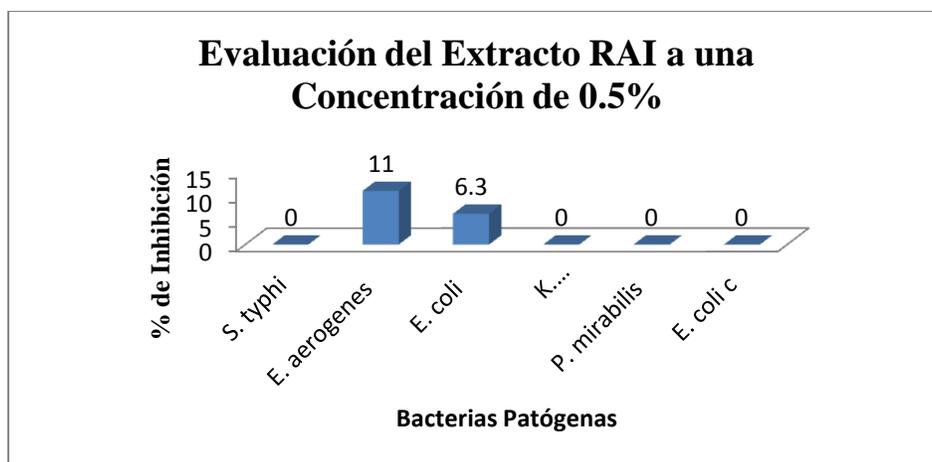


Figura 9. Porcentaje de inhibición de bacterias patógenas a la concentración de 0.5% del extracto RAI.

La figura 10 muestra la actividad inhibitoria del extracto CAI, en la cual se observa la acción de este extracto sobre las bacterias *E. aerogenes* 29.3% y *E. coli c* 12% de inhibición.

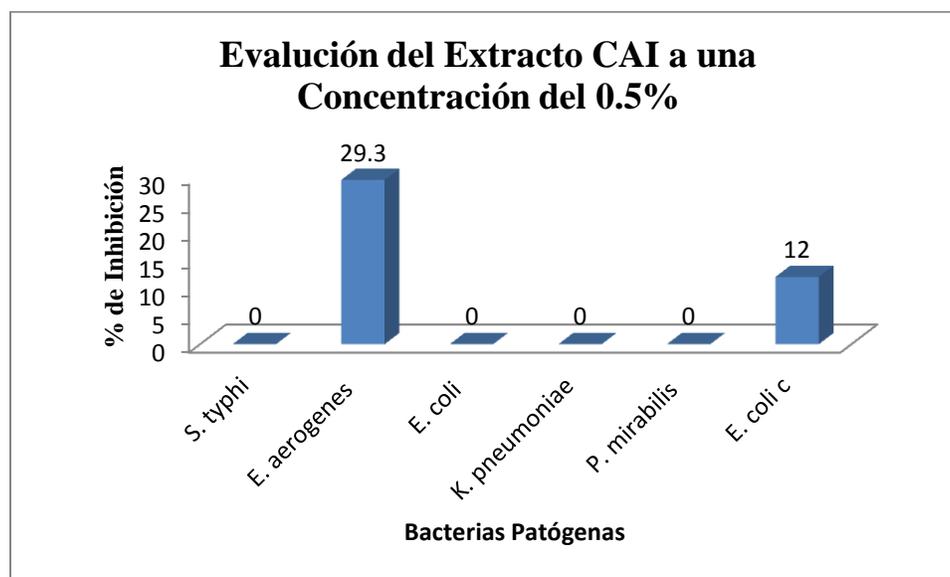


Figura 10. Porcentaje de Inhibición del extracto CAI a una concentración del 0.5% contra bacterias patógenas.

Como se puede observar en la figura 11 el extracto TEI presento actividad antibacteriana contra las bacterias; *E. coli c* 19.2%, *K. pneumoniae* 42.3%, *S. typhi* 25% y *E. coli* 13.5%.

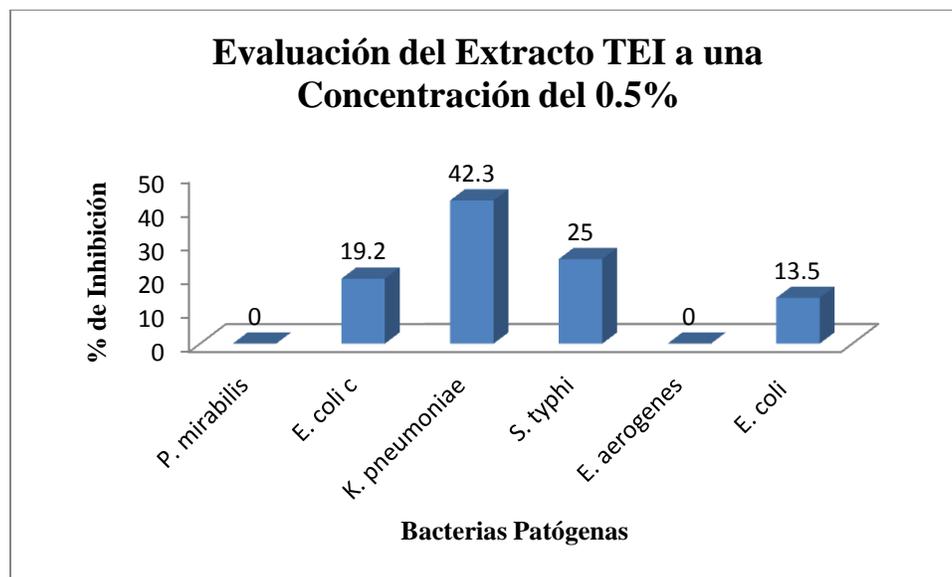


Figura 11. Porcentaje de inhibición del extracto TEI a una concentración de 0.5%, contra bacterias patógenas.

En la siguiente figura se puede observar la acción antibacteriana del extracto REI al 0.5% el cual posee mayor actividad frente a *E. coli c* con un 33.3% mientras que en *K. pneumoniae* hay apenas un 3.8% de inhibición.

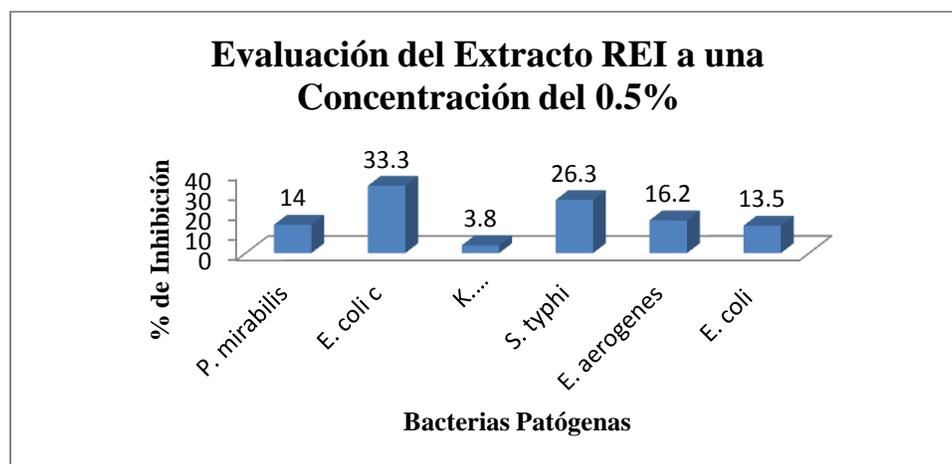


Figura 12. Porcentaje de inhibición del extracto REI a una concentración del 0.5% contra bacterias patógenas.

La figura 13 muestra el efecto antibacteriano del extracto Cáscara en Etanol por Infusión, el cual presentó actividad antibacteriana frente a *P. mirabilis* 11.8%, *E. coli c* 15.4%, *Salmonella* 3.9% y *E. coli* 18.9%.

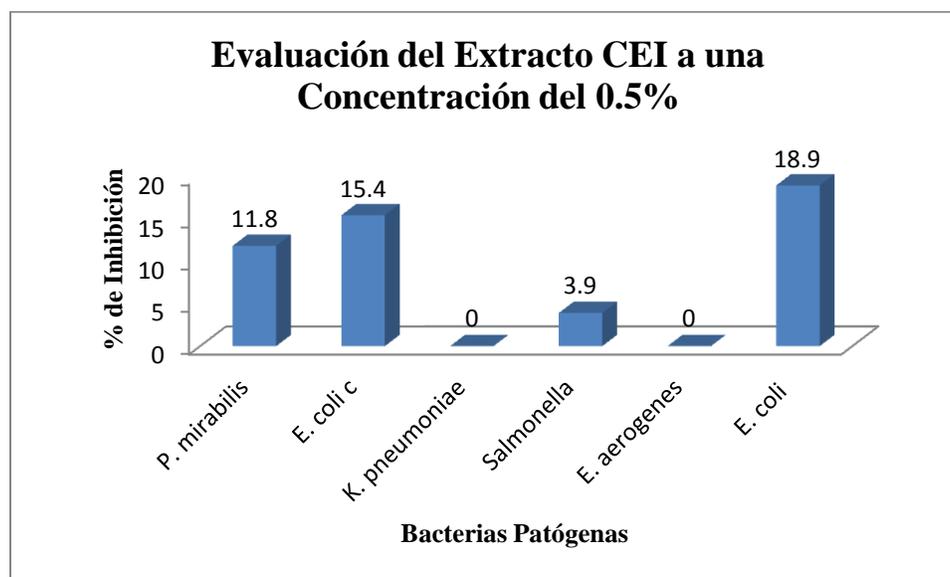


Figura 13. Porcentaje de inhibición del extracto CEI a una concentración del 0.5% contra bacterias patógenas.

El la figura 14 se observa el efecto del extracto TEI a una concentración del 1%, como indica la efectividad fue mínima y solo contra la bacteria *E. coli* 6.3%. Caso similar a lo ocurrido con los extractos de ruezno y cascara evaluados a la misma concentración, los cuales presentaron efecto inhibitorio frente a *E. coli* en un 18.3%(figura 15) y con el extracto CEI un 7.7% (figura 16).

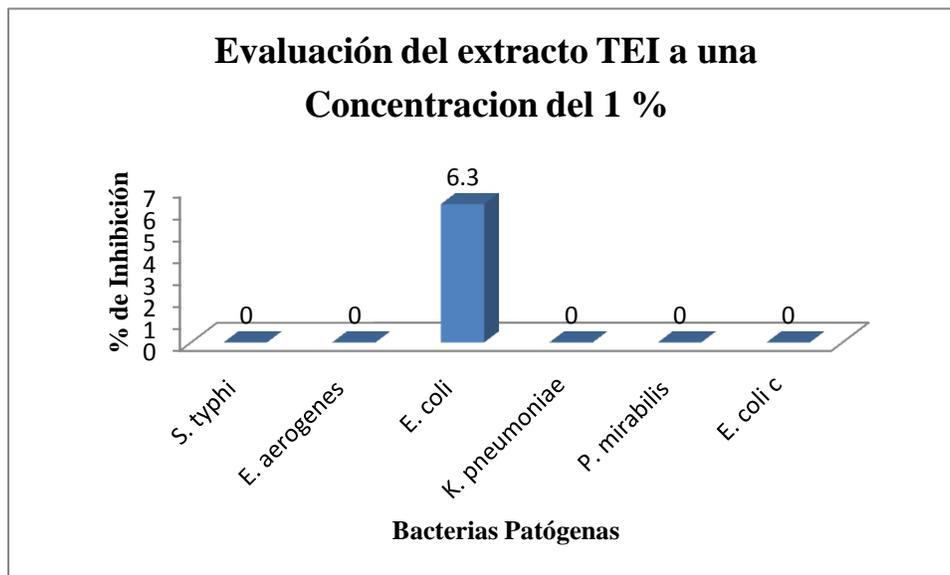


Figura 14. Porcentaje de inhibición del extracto TEI contra bacterias patógenas.

Se ha reportado la eficacia del aceite de ajo para bacterias Gram positivas: *Citrobacter sp*, *Enterobacter sp*, *Escherichia sp*, *Proteus sp*, *Pseudomona sp*, *Salmonella sp*, *Serratia sp*, *Shigella sp*. Puede prevenir el crecimiento de *S. aureus*, *B. cereus*; con una eficacia comparada con la de la ampicilina a diferentes concentraciones. Aunque resulta ineficaz para *C. botulinum* (Davidson y Parish, 1989).

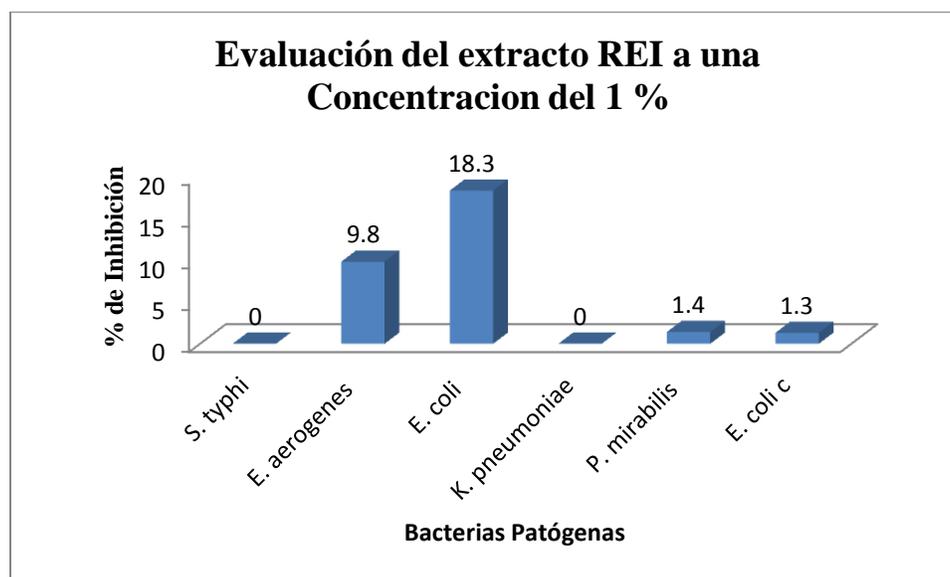


Figura 15. Porcentaje de inhibición del extracto REI contra bacterias patógenas

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Aligiannis, 2001).

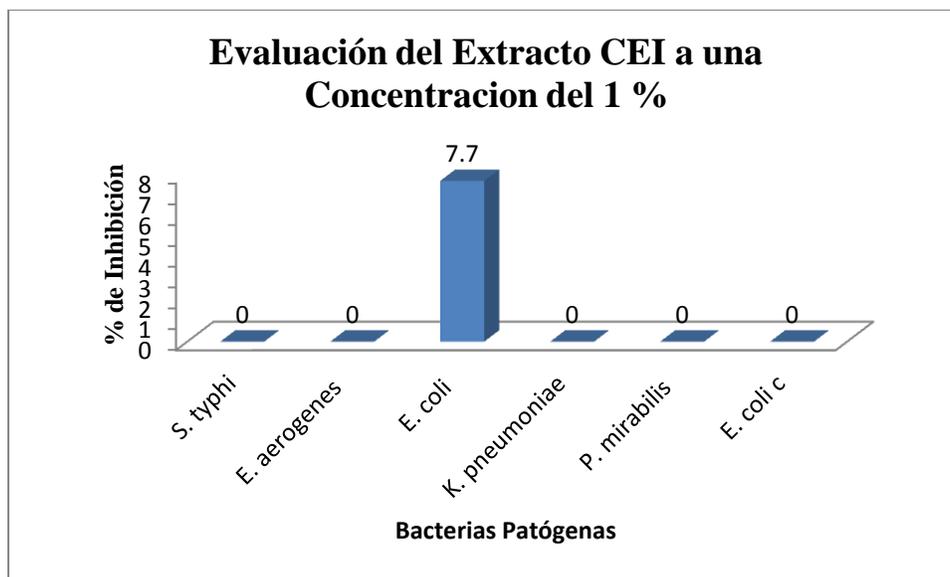


Figura 16. Porcentaje de inhibición del extracto Cáscara en Etanol por Infusión a una concentración del 1%, contra las bacterias patógenas.

En la figura 17 se puede observar la actividad antibacteriana del extracto TEI, contra las bacterias *P. mirabilis* 21.6% y *K. pneumoniae* 10.5%.

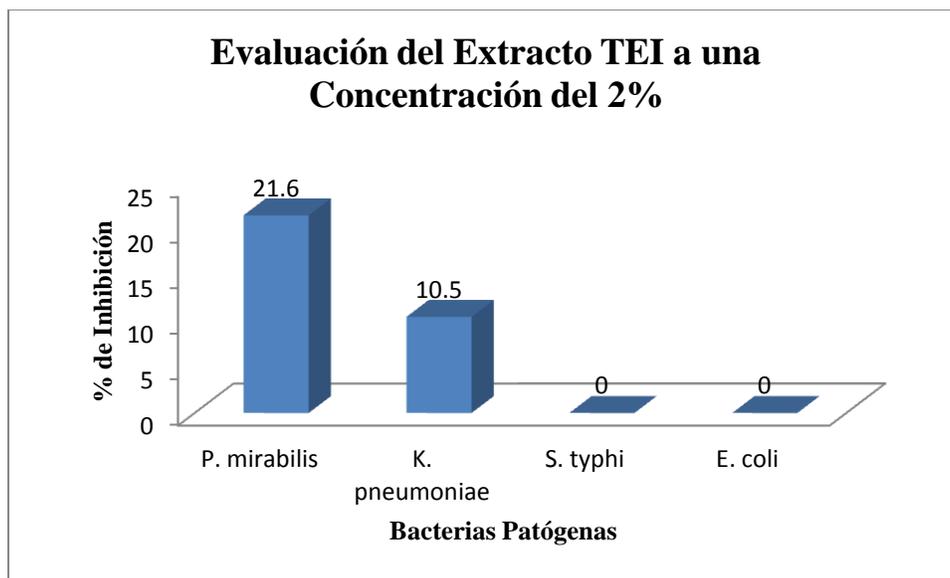


Figura 17. Porcentaje de inhibición del extracto TEI a una concentración del 2% contra las bacterias patógenas.

En la figura 18 se observa la actividad inhibitoria del extracto REI contra la bacteria *P. mirabilis* 6.5%. Mientras que el extracto CEI presento un 13 % de inhibición frente a *P. mirabilis* y 31.6 % de efectividad frente a *K. pneumoniae* (Figura 19).

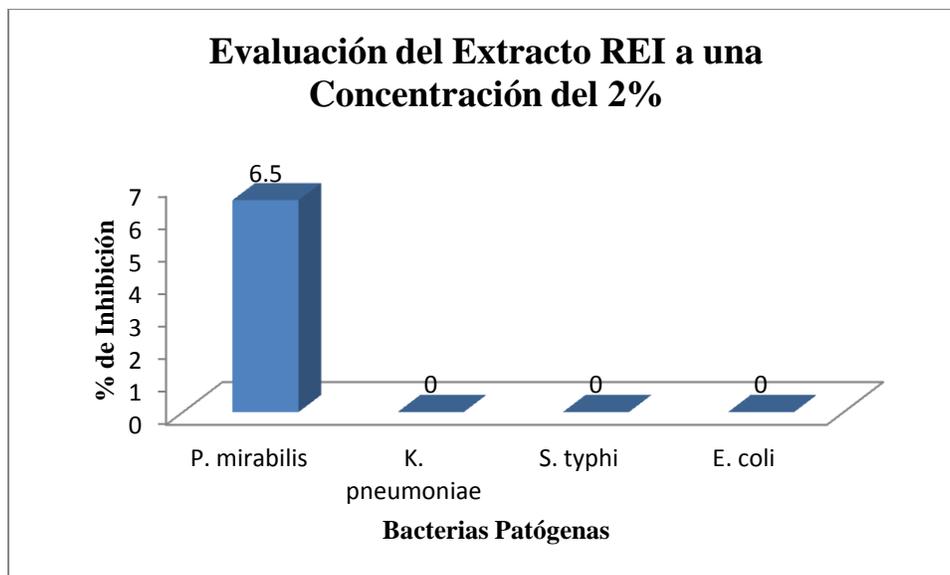


Figura 18. Porcentaje de inhibición del extracto REI contra bacterias patógenas.

Stoilova y col., (2005) realizaron estudios de la corteza de los extractos acuosos y etanólicos de *Mangifera indica* L., encontrando que poseen actividad antibacteriana en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella thyphimurium*.

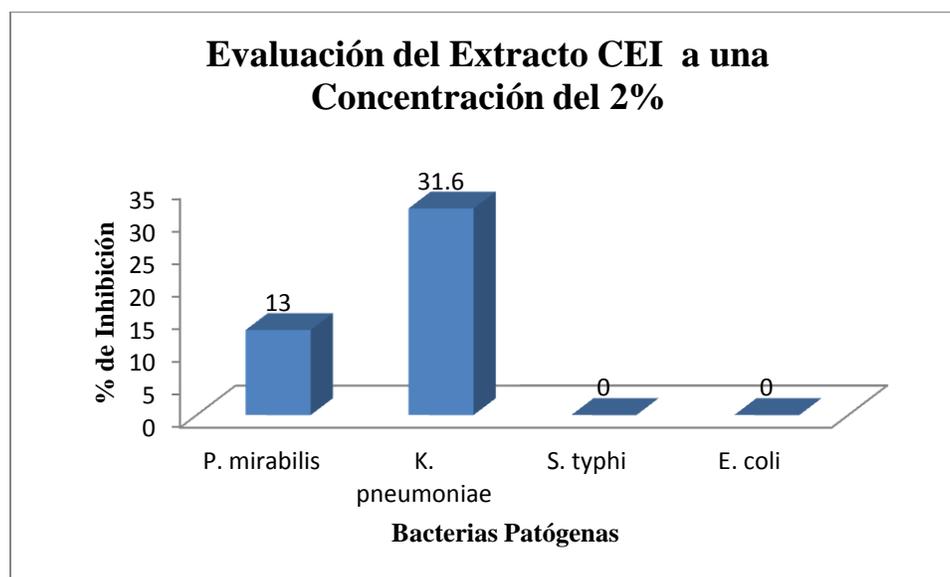


Figura 19. Porcentaje de inhibición del extracto CEI al 2% contra bacterias patógenas.

La figura 20 muestra el porcentaje de inhibición del extracto TAI el cual fue de 19.6% contra *P. mirabilis* y 21.1% en *K. pneumoniae*. Mientras que el extracto de RAI presento actividad solo frente a *K. pneumoniae*, con un 10.5% de inhibición (Figura 21).

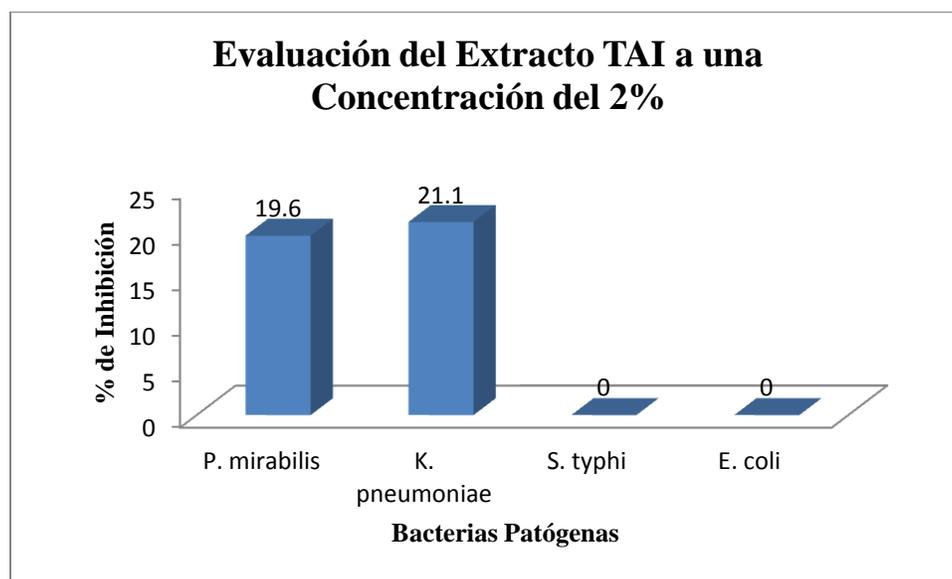


Figura 20. Porcentaje de inhibición del extracto TAI al 2% contra bacterias patógenas.

Scalbert y Williamson (2000) mencionan que las propiedades antimicrobianas de los taninos pueden ser debido a que: los taninos pueden formar complejos con enzimas y otras proteínas microbianas inhibiendo sus funciones; los taninos también pueden inhibir el transporte de electrones a través de las membranas y adicionalmente; los taninos pueden acomplejar iones como hierro y cobre inhibiendo así la actividad de algunas enzimas que pueden ser esenciales para la vida microbiana.

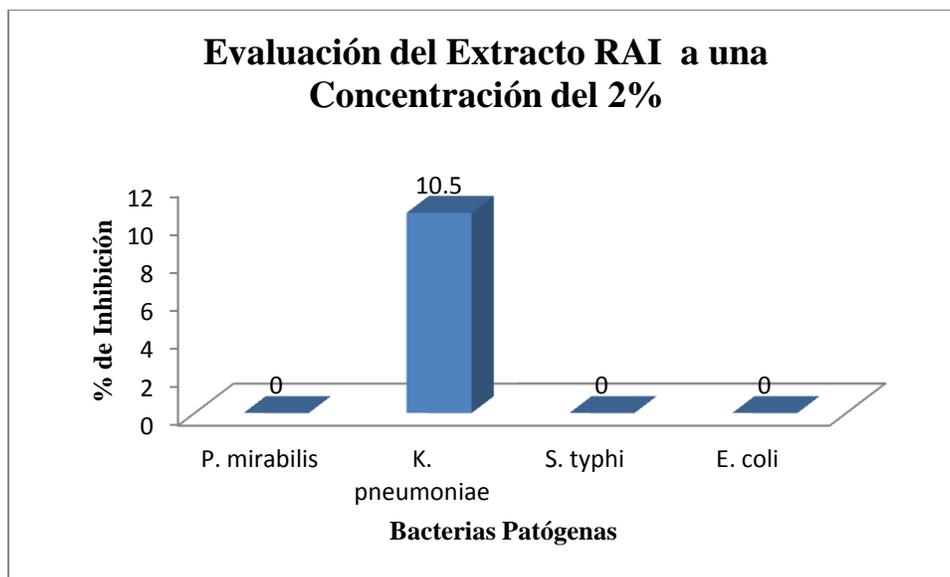


Figura 21. Efecto inhibitorio del extracto RAI al 2% contra bacterias patógenas.

Los metabolitos secundarios son importantes en la fisiología de las plantas porque contribuyen en la resistencia hacia los microorganismos. Se ha demostrado que los polifenoles de diferentes orígenes vegetales presentan propiedades interesantes para el control de microorganismos patógenos con importancia para el hombre (Guevara-González, y col., 2005).

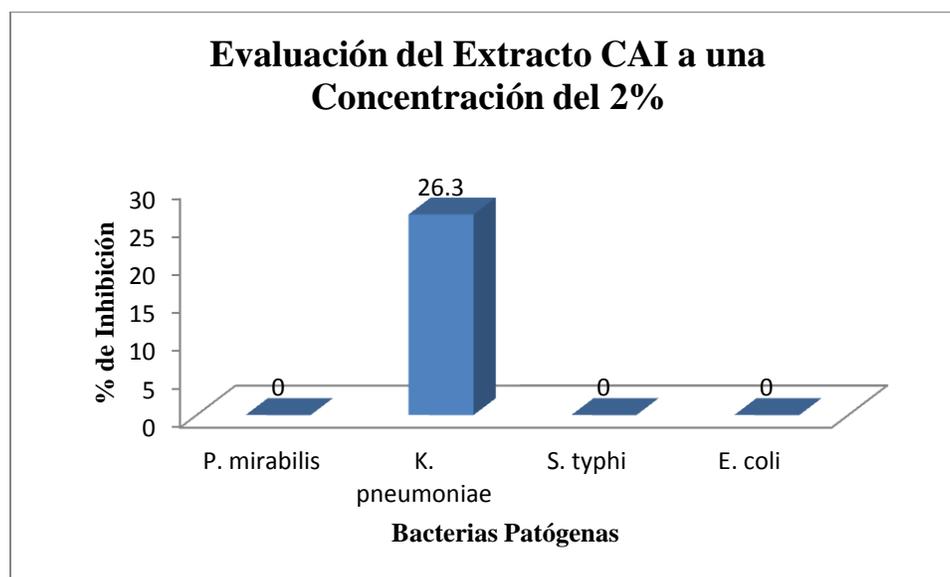


Figura 22. Porcentaje de inhibición del extracto CAI contra bacterias patógenas.

En la figura 23, se muestra el porcentaje de inhibición del extracto TEI, contra las cepas bacterianas patógenas a humanos, como se puede observar el extracto es 100% eficaz contra *P. mirabilis*, mientras que en la cepa *K. pneumoniae* el efecto no es significativo pues fue del 4.5%. Méndez (2010) evaluó el efecto antibacteriano de los extractos de gobernadora, yuca, orégano, lechuguilla, nopal, ruezno, hojasen, demostrando que los extractos etanolicos fueron más eficaces para la inhibición del crecimiento de las bacterias, también reporto que los extractos obtenidos a partir de gobernadora fueron los más eficientes. Los mejores resultados encontrados fueron contra *S. aureus* y *E. coli*, mientras que el efecto fue menor en *Enterobacter*.

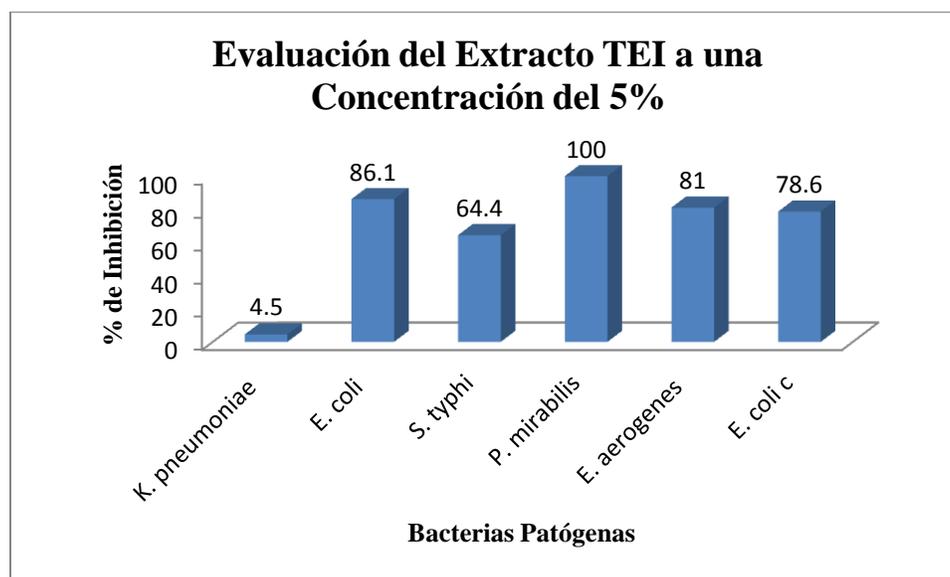


Figura 23. Porcentaje de inhibición del extracto TEI a una concentración del 5% contra las diferentes bacterias patógenas.

En la figura 24, extracto REI, y Figura 25, extracto CEI se observan comportamientos similares de las bacterias, ya que ambas presentan inhibición en las cepas de *E. coli* y *E. coli c*, mientras que en *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* los extractos no tuvieron ningún efecto. Benitez y col. (2010) reportaron que el extracto etanólico de mango presento un efecto inhibitorio visible frente a *E. coli* pero no hubo inhibición frente a *S. typhi*.

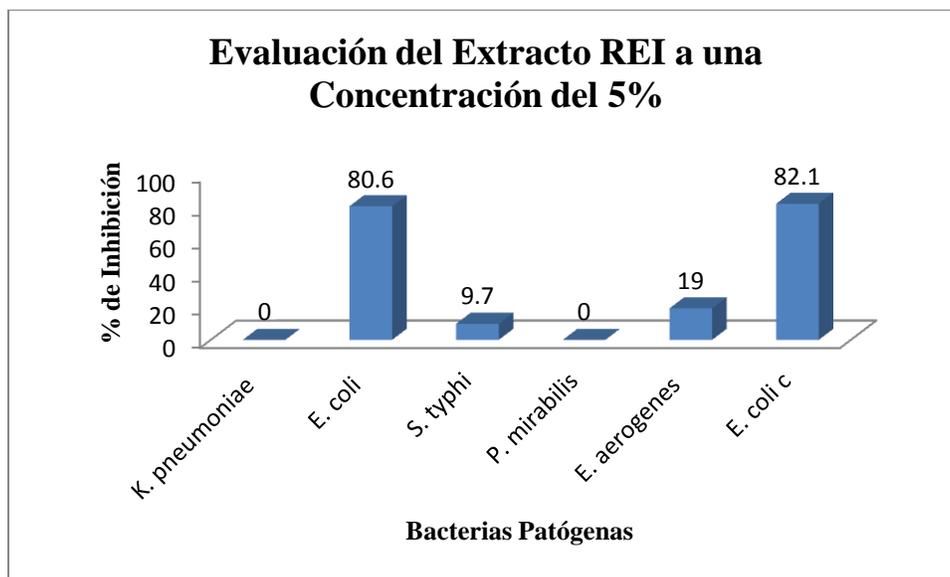


Figura 24. Porcentaje de inhibición del extracto REI a una concentración del 5%, contra bacterias patógenas.

Los extractos de polifenoles obtenidos en estado puro presentan propiedades antibacterianas, afectando la porción lipídica de la membrana citoplasmática de los microorganismos patogénicos, provocando una disminución del consumo de oxígeno y la alteración de la cadena respiratoria.

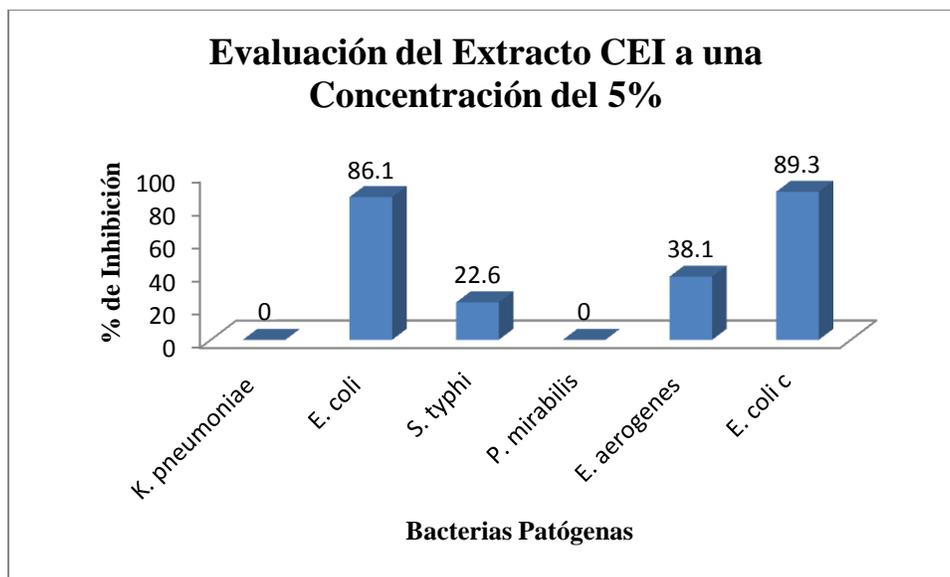


Figura 25. Porcentaje de inhibición del extracto CEI a una concentración del 5%, contra bacterias patógenas en humanos.

Se puede observar una gran diferencia entre los extractos acuosos de tallo cascara y ruezno evaluados a una concentración del 5%, ya que el extracto de tallo presento la más alta actividad inhibitoria frente a *E. aerogenes* 33.3% (figura 26), mientras que el extracto de ruezno presento 90.5 % de inhibición frente a la misma cepa bacteriana (figura 27) y fue 100 % contra *P. mirabilis*.

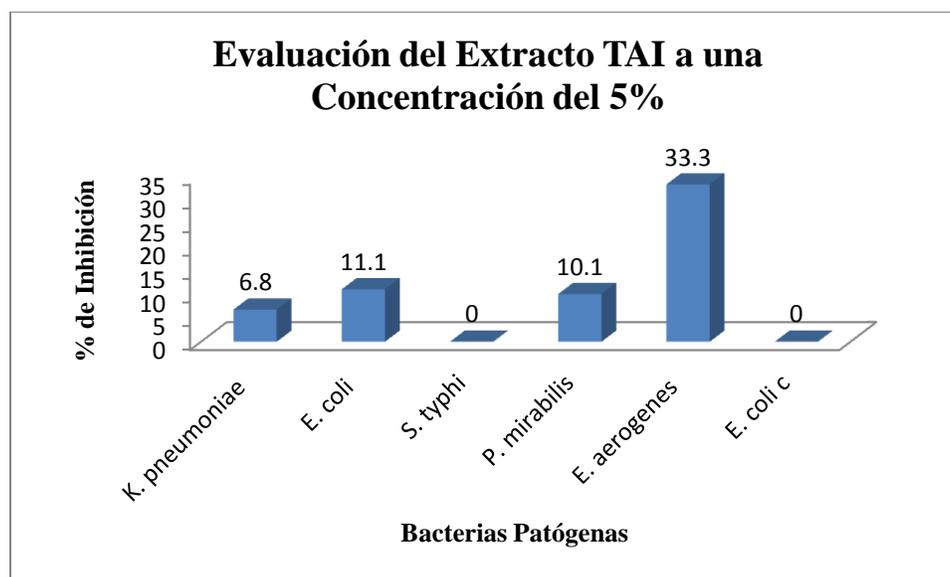


Figura 26. Porcentaje de inhibición del extracto Tallo en Agua por Infusión a una concentración del 5% contra bacterias patógenas.

Los aceites esenciales de clavo y canela están siendo estudiados como sustancias antimicrobianas para la conservación de alimentos, el extracto de canela fue estudiado en jugo de manzana pasteurizado, en combinación con otras sustancias, con el fin de inactivar el crecimiento de *Salmonella* y *E. coli*; Yuste y Fung (2004) encontraron que la combinación de Nicina y extracto de canela aceleran la destrucción de estas bacterias aumentando así la seguridad de este producto.

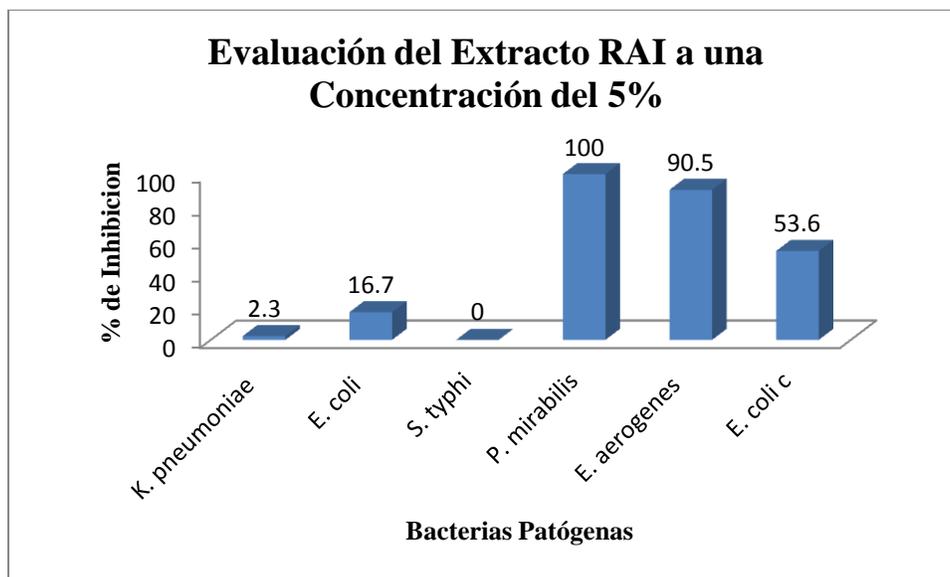


Figura 27. Porcentaje de Inhibición del extracto Ruezno en Agua por Infusión a una concentración del 5% contra bacterias patógenas en humanos.

En la figura 28 se puede apreciar el efecto del extracto CAI a una concentración del 5%, el cual presenta actividad frente a *E. coli* 22.2%, *P. mirabilis* y *E. aerogenes* en un 5.1 y 9.5 % respectivamente.

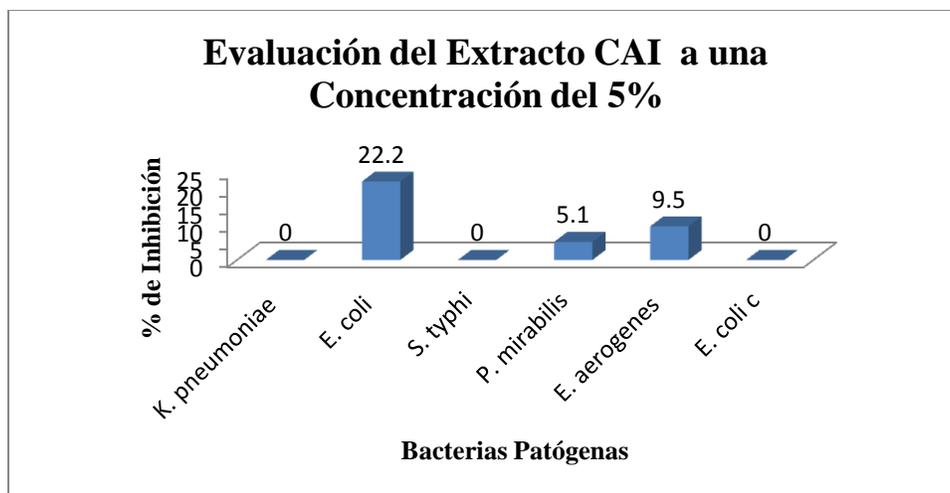


Figura 28. Porcentaje de inhibición del extracto Cáscara en Agua por Infusión a una concentración del 5% contra bacterias patógenas a humanos.

Como se puede observar en la figura 29, el extracto ruezno mas cáscara en etanol por infusión presento efectividad inhibitoria frente a *E. coli c* 51%, así como también inhibió el crecimiento de *E. aerogenes*, *P. mirabilis* y *S. typhi* aun que en menor porcentaje.

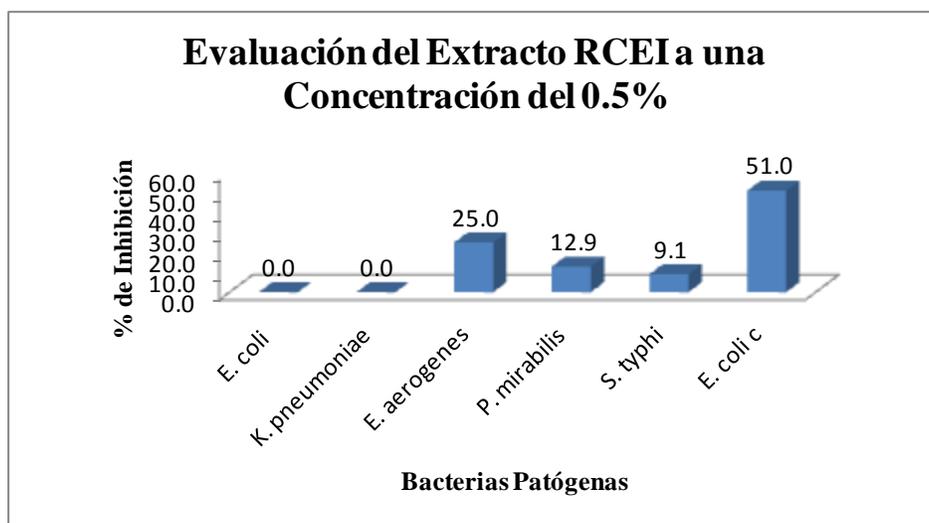


Figura 29. Porcentaje de inhibición usando la mezcla del extracto ruezno mas cáscara en etanol por infusión al 0.5%.

La figura 30 muestra el efecto inhibitorio de la mezcla de extractos RCEI la cual presento inhibición frente a *E. aerogenes* y *E. coli c* en un 75 y 67.3% respectivamente. Castillo Godina (2008) reportó que extractos de gobernadora, damiana, sangre de drago, hojasén y cascara de nuez inducen una inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerógenes*, hasta de 60 y 50 % respectivamente.

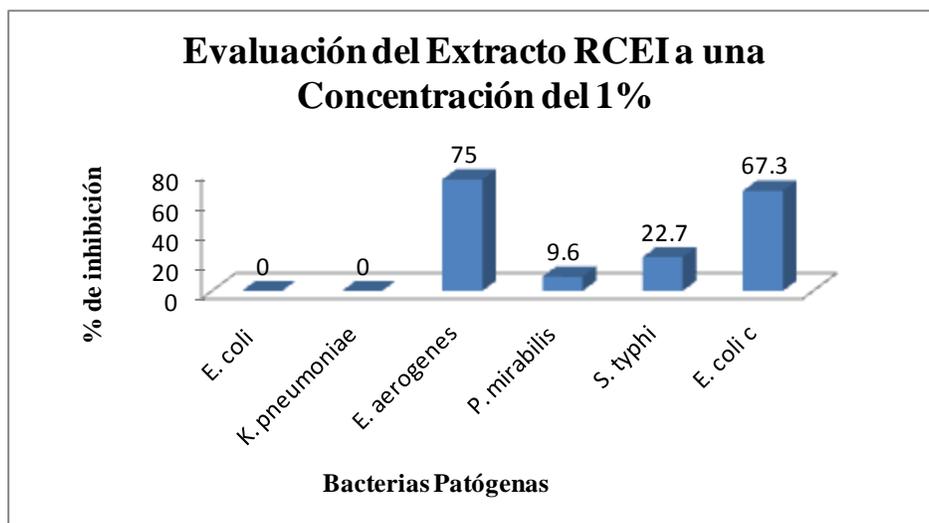


Figura 30. Porcentaje de inhibición de la mezcla del extracto ruezno mas cáscara en etanol por infusión.

En la figura 31 se muestra el efecto del extracto ruezno mas cáscara en agua por infusión en la cual se observa que solo hubo inhibición frente a la bacteria *K. pneumoniae*.

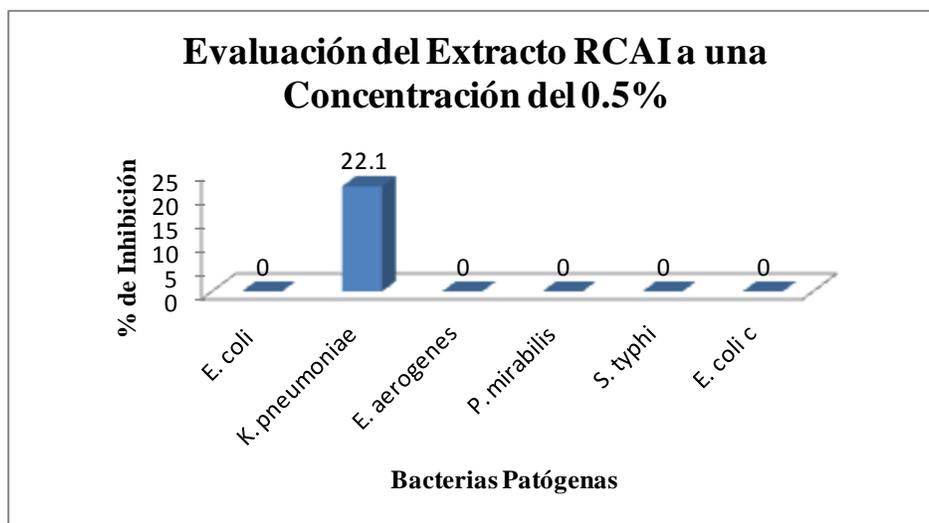


Figura 31. Porcentaje de inhibición de la mezcla de extractos ruezno y cáscara en agua por infusión contra las bacterias patógenas.

En la figura 32 se observa el efecto antimicrobiano del extracto ruezno más cáscara en agua por infusión el cual presentó inhibición frente a tres de las cepas bacterianas evaluadas.

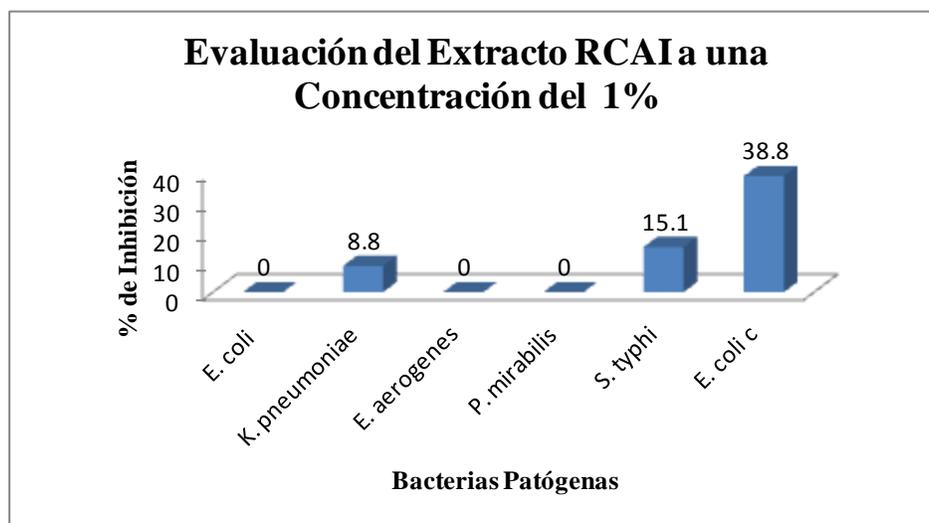


Figura 32. Porcentaje de inhibición de la mezcla de extractos ruezno y cáscara en agua por infusión al 1% contra las bacterias patógenas.

4.3.2 Evaluación de los extractos usando la técnica de Sensi-discos

Para la realización de esta prueba se utilizaron los extractos (cuadro 4) y fermentados (cuadro 5) concentrados, sin embargo no se obtuvieron resultados satisfactorios, como se observa en la figura 33 el extracto REU 15 fue el único que tuvo un efecto inhibitorio contra las cepas bacterianas siendo más eficaz frente a *P. mirabilis* 21.4%.

Herrera y col. (2006) reportaron el efecto inhibitorio de extractos acuosos de clavo principalmente efectivo contra *S. aureus* pero no contra *Salmonella*,

canela y tomillo presentaron efecto inhibitorio frente a *Salmonella* y laurel contra *E. coli*.

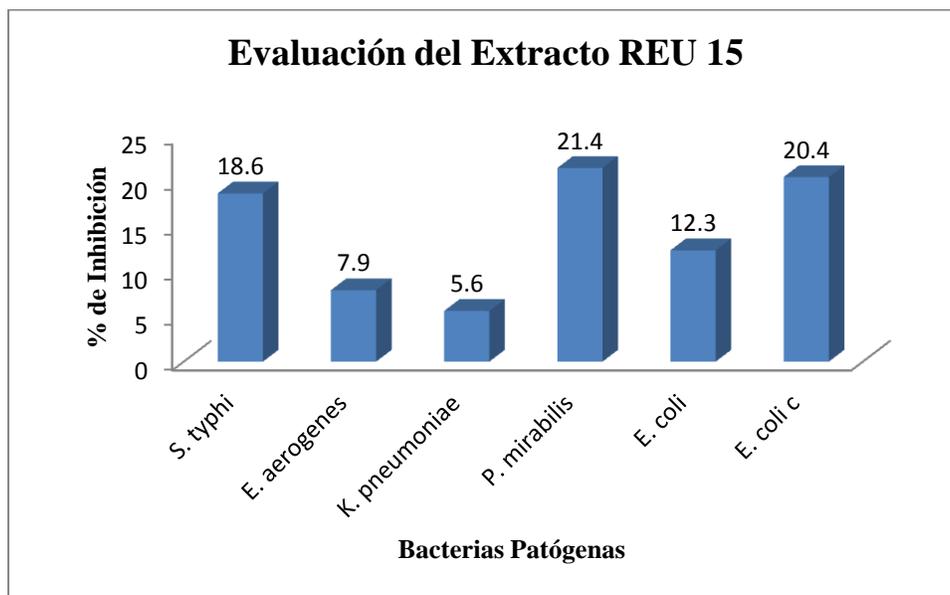


Figura 33. Porcentaje de inhibición del extracto REU 15' contra las bacterias patógenas.

Conclusiones

- Se logro conservar las cepas bacterianas mediante los métodos de leche descremada, glicerol, tubos de agar nutritivo y liofilización.
- Los mejores resultados de la evaluación por el método de agar en difusión fueron con los extractos etanólicos de tallo, cáscara y ruezno con mayor concentración. Mientras que de los extractos acuosos el que presento mayor inhibición fue el extracto de ruezno.
- Los extractos TEI, CAI, RAI Y TAI mostraron mayor efectividad contra las cepas de *Escherichia coli*, *Escherichia coli c*, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter aerogenes*, mientras que *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* fueron las cepas más resistentes a los extractos.
- En evaluación por el método de sensi-discos el único extracto que presento actividad inhibitoria fue el de REU 15' contra todas las bacterias pero en diferentes porcentajes.
- La utilización de extractos etanólicos obtenidos de los residuos del nogal pecanero son efectivos a altas concentraciones contra tres cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter aerogenes*, por lo tanto representan una alternativa para futura la elaboración de productos que inhiban el crecimiento de estos microorganismos.

Referencias bibliográficas

- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragán L., A., Favela-Torres, E., Aguilar, C., N., 2008, Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitanins. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:189-199.
- Aguilar, C.N.; Rodríguez-Herrera, R.; Saucedo-Pompa, S.; Jasso-Cantú, D., (2006) Fitoquímicos sobresalientes del semidesierto mexicano. Departamento de Investigación en Alimentos de la UAdeC.
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., Iwatsuki, K., 2001, “Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 487.
- Alnicolsa del Perú, 2010, “Todo sobre la tara”, <http://www.taninos.tripod.com> (marzo, 2010).
- Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 4168-4170.
- Belmares, R., 2008, Compuestos polifenólicos presentes en plantas del Semidesierto de México, su transformación microbiana y aplicaciones industriales. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Coahuila unidad Saltillo. México.

- Castillo-Godina, R., 2008, Actividad antibacteriana y antifúngica de compuestos polifenólicos de plantas típicas del semidesierto mexicano. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila unidad Saltillo. México p.60
- Comité Mexicano del Sistema Productor de Nuez, A.C., 2012, COMENUEZ en línea, Disponible en: (<http://www.comenuetz.org/xoo/modules/tinycontent/index.php?id=77>).
- Field, J. A. and Lettinga, G., 1987. The methanogenic toxicity and anaerobic degradability of a hydrolysable tannin. *Water Res.* 21: 367-374.
- Forero, M. 2002. Producción masiva de microorganismos biocontroladores. Programa de Manejo Integrado de Plagas MIP. Centro de Investigación Tibaitatá. Corpoica. Publicación.
- GAO, M., LIU, C. 2005. "Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa* Maxim". *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 21: 1461-1463.
- Hagerman, A.E., Rice, M.E., Ritchard, N.T., 1998. Mechanism of protein precipitation of two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin 16(4-8) catechin (procyanin). *J Agric. Food Chem.* 46, 2590-2595.

- Haslam, E., 1974. Polyphenol-protein interactions. *Biochem. J.* 139, 285-288.
- Hong CY, Wang CP, Huang SS, Hsu FL. 1995 *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 47(138-142).
- Khanbabaee K. and van Reet: Tannins 2001: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* (18) 641-649.
- León-Ramírez S. “Shigelosis (disentería bacilar)”. *Sal en Tab* 2002; 8: 22-25.
- López, 1989. La Nuez Pecanera, Banco Agropecuario del norte, BANAGRO.
- Luna L.F. 1990. EL NOGAL Producción de fruto y de madera. 2ª edición. España. Ediciones Mundi-prensa. 155 p ISSN: 84-7114-239-2.
- Méndez Salazar M. 2010. Obtención de extractos de plantas del semidesierto mexicano y su efecto contra bacterias patógenas de alimentos. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de ciencias Químicas.
- Moreno Sifuentes B. 2012. Obtención y caracterización de extractos bioactivos del nogal pecanero (*carya illinoensis* k.) por tecnologías

emergentes Tesis licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila.
Facultad de Ciencias Químicas.

- Morgan CA, Herman N, White PA & Vesey G (2006) Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J. Microbiol. Methods* 66: 183-193.
- Mueller-Harvey I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91:3-20.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol.* 1, 151-217.
- Pamplona R.J.D. 2006. Salud por las plantas medicinales. España. Safeliz S. L. p. 397. Colección Nuevo Estilo de Vida. ISBN:84-7208-106-0.
- Raissouni,T 2005. Estudio comparativo de la eficacia de varios tratamientos tópicos de la estomatitis aftosa recurrente. Universidad Autónoma de Granada ,Facultad de Odontología, p 1-46
- Ramos Peralta L. 2012. Obtención de fitomoléculas bioactivas mediante procesos de fermentación fúngica utilizando como fuente de carbono

residuos de nogal pecanero (*Carya Illinoensis*). Universidad autónoma agraria Antonio Narro.

- Rodríguez Ángeles G. “Principales características y diagnósticos de los grupos patógenos de *Escherichia coli*”. *Sal Pub Mex* 2002; 44: 464-475.
- Rodríguez Herrera Raúl, Soto Cruz Oscar, Martínez José Luís, Aguilar Cristóbal Noé. 2008. Proteomas y Genomas en el siglo XXI: Biotecnología Ambiental.
- SAGARPA, 2007. Pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México calidad suprema en nuez pecanera.. (Rev. 070307). PC-076-2007. Pág. 1-39
- Shen, G. y Lee, H.K., 2003. Determination of triazines in soil by microwave-assisted extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 985:167.
- Saxena, R. K., Sharmila, P., Singh, V. P. (1995). Microbial degradation of tannins. In Singh, V. P. (ed) *Biotransformations: Microbial degradation of health risk compounds. Process in industrial microbiology*. Vol 32. Pp. 259-270. Elsevier Science Publisher BV. Amstredam.

- Stoilova I, Gargova S, Stoyanova A, Ho L. Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. *Herb Polonica*. 2005; 51:37-44.
- Strack, D., 1997, Phenolic metabolism., In: Dey, P.M., and Harbourne, Eds., *Plants Biochemistry*. Academic, San Diego, CA. pp. 387-416.
- Swain, R., G. (1979) Tannins and Lignins in herbivores their interaction with secondary plant metabolites (ed) G.A. Rosenthal and D.H. Jasen Academic, Press, New York.
- Vargas MMR. “Paratifoidea y otras salmonelosis”. *Vigilancia epidemiológica* 2009; 40: 1-3.
- Ventura, J., Belmares-Cerda, R., Aguilera-Carbo, A., Contreras-Esquivel, J. C., Rodriguez-Herrera, R., Aguilar, C. N.. 2007. Fungal biodegradation of tannins from Creosote bush (*Larrea tridentata* Cov.) and tar bush (*Flourenzia cernua*) for gallic and ellagic production. *Food Technology and Biotechnology*.
- Ventura Sobrevilla, J. 2006. Biodegradación de taninos presentes en extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* Cov) y Hojasen (*Flourenzia cernus* D. C. mediante fermentación en estado sólido usando *Aspergillus niger* PSH. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. 34-43.

- Vidal JE, Canizález Román A, Gutiérrez Jiménez J, Navarro García F. “Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena”. *Sal Pub Mex* 2007; 49: 376-386.
- Vila J, Álvarez-Martínez MJ, Buesa J, Castillo J. “Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales”. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27: 406-411.
- Villanueva, C., 2007.”La tara el oro verde de los incas para el mundo”. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú, pp.1-45.
- Vinatoru, M. 2001. “An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs”. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8: 303-313.
- Ward, O. 1989. *Biotechnology de las fermentaciones*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España. Pp 173-185.

