

CAPITULO III

Evaluación de mezclas de agentes antimicrobianos en sistemas modelo líquidos.

1.1 Introducción

Las tecnologías para preservar alimentos pueden ser clasificadas de la siguiente manera: aquellas que actúan para prevenir o disminuir el crecimiento microbiano (bajas temperaturas, reducción de la actividad de agua, pérdida de oxígeno, acidificación, fermentación, atmósferas modificadas, adición de antimicrobianos), aquellas que actúan para inactivar microorganismos (pasteurización, esterilización, radiación, altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos) y, aquellas que previenen o minimizan la entrada de microorganismos al interior del alimento o los remueven (empacada aséptico, centrifugación, filtración) (López-Malo, et al, 2000).

El uso de agentes con actividad antimicrobiana, es una de las técnicas más antiguas; los agentes antimicrobianos pueden ser compuestos sintéticos adicionados de manera intencional o que están presentes de manera natural en el alimento (López-Malo, et al, 2000).

Plantas, hierbas y especies, así como sus aceites esenciales y compuestos aislados, contienen un gran número de sustancias que pueden inhibir varias actividades metabólicas de bacterias, levaduras y mohos (López-Malo, et al, 2000) Wilkins y Board (1989), reportaron que más de 1340 plantas son conocidas por ser fuentes potenciales de compuestos antimicrobianos; estos compuestos están comúnmente contenidos en los aceites esenciales, en flores y brotes de flores, rizomas y frutos. Los agentes antimicrobianos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente inhibir la producción de algún metabolito (Beuchat, 1994).

Los componentes con mayor actividad antimicrobiana son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas e isoflavonoides; la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende de la estructura química de sus componentes y de su concentración (López-Malo, et al, 2000).

3.1.1. Métodos utilizados para probar la eficacia de agentes antimicrobianos

Un número importante de publicaciones acerca de la actividad antimicrobiana de extractos, aceites, especias y hierbas han sido reportadas; sin embargo, es difícil hacer una comparación cuantitativa de los efectos, debido a la gran variedad de métodos utilizados para evaluar su eficiencia (Zaika, 1988). La clasificación de algunos métodos usados para evaluar la eficiente acción antimicrobiana en alimentos es mostrada en la tabla 3.1.1. Las pruebas *in vitro* (generalmente hechas en medios de laboratorio o en sistemas modelo), proporcionan información preliminar acerca de la actividad antimicrobiana; dentro de éstas, se encuentra la prueba de punto final, en la cuál los microorganismos son puestos a prueba por un periodo arbitrario de tiempo de incubación, dando información cualitativa acerca de la concentración efectiva aproximada. Otro tipo de pruebas son las descriptivas, en las cuales el crecimiento del microorganismo es analizado a través del tiempo, dando información acerca de la dinámica del crecimiento. Finalmente, en las pruebas aplicadas, el agente antimicrobiano es puesto en un alimento, y los resultados de la evaluación señalan algunos factores que pueden afectar la eficiencia del antimicrobiano natural (López-Malo, et al., 2000).

Para este trabajo, la técnica empleada es el ensayo de dilución en caldo, la cuál es usada cuando se desean datos cuantitativos para determinar si un agente antimicrobiano es letal para los microorganismos de prueba, para microorganismos con una velocidad de crecimiento variable y para microorganismos anaerobios o microaerofílicos (Barry, 1986). La concentración mínima inhibitoria (MIC) es definida por la más baja concentración de un antimicrobiano que previene el crecimiento de un microorganismo después de un período específico de incubación. En los ensayos de dilución en caldo, un agente antimicrobiano es añadido a un tubo de ensaye que contiene caldo no selectivo. Los tubos son inoculados con el microorganismo de prueba y son incubados de 16 a 24 horas a una temperatura óptima para el microorganismo. El no crecimiento ocurre cuando hay ausencia de turbidez. Después de la incubación, los tubos en donde no hubo crecimiento son sembrados en agar no selectivo, para determinar la concentración mínima bactericida (Thrupp, 1986; Piddock, 1990; NCCLS, 1999).

Jorgensen et al., (1985) comparó el método turbidimétrico con el método convencional de conteo en placa en la determinación de la carga microbiana de carne molida, y estableció un coeficiente de correlación entre ambos métodos de 0.98.

La turbidimetría es un método conveniente y barato para determinar el crecimiento microbiano, sin embargo, es afectado por el tamaño y forma de la célula, así como no es efectivo para suspensiones con menos de 10^7 células /ml (Perry and Staley, 1997).

Las mediciones de las interacciones –aditividad, sinergismo, o antagonismo– cuando hay combinación de agentes antimicrobianos, son hechas por difusión en agar y pruebas de dilución o por la determinación de curvas de inhibición; los resultados son visualizados por medio de isobogramas contruidos usando las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) o las concentraciones fraccionales inhibitorias (FICs) (López-Malo, et al, 2000).

Davidson y Parish (1989) señalan que para la aplicación de cualquiera de los métodos señalados, deben controlarse los demás factores que puedan intervenir en la respuesta del microorganismo, tales como, temperatura, pH, actividad de agua y nutrientes; así mismo, uno de los factores importantes es el propio microorganismo, y por lo tanto la actividad de un agente antimicrobiano depende también del tipo, género, especie y cepa de microorganismo de prueba.

Tabla 3.1.1. Métodos para probar la eficacia de agentes antimicrobianos en alimentos

Pruebas exploratorias o *in Vitro*

Métodos de monitoreo de punto final

- Difusión en agar
- Dilución en agar o caldo
- Gradiente en placa
- Pruebas sanitizantes y desinfectantes

Métodos descriptivos de monitoreo

- Ensayos turbidimétricos
- Curvas de inhibición

Pruebas aplicadas

Métodos del punto final

Curvas de inhibición

Pruebas para antimicrobianos en combinación o mezcla

Difusión en agar

Ensayos de dilución

Curvas de inhibición

Adaptada de López-Malo, et al., 2000.

3.1.2. Aspectos toxicológicos

Las sustancias fenólicas están naturalmente presentes en los productos de origen vegetal y algunas veces en cantidades apreciables. Pocos de los compuestos fenólicos son realmente tóxicos, sólo algunos han causado reacciones alérgicas en animales; en ocasiones en que se han observado efectos nocivos en humanos, es debido al consumo anormal de fenoles de origen vegetal o a un consumo de fenoles anormal para la dieta (Singleton, 1981).

Se ha reportado que el consumo de compuestos fenólicos pueden afectar aspectos tanto nutricionales como de salud en humanos y animales; sin embargo, se ha encontrado que muchos fenoles exhiben efectos benéficos en contra de algunos trastornos como el cáncer (Nychas, 1995). El consumo de frutas y vegetales así como de otras fuentes de compuestos fenólicos como el té, reducen el riesgo de diversas formas de cáncer en humanos y de otras enfermedades como cirrosis, enfisema, y arterioesclerosis (Weisburger, 1992; Newmark, 1992).

1.2 PLAN DE INVESTIGACION

A partir de los objetivos planteados se establece el siguiente plan de investigación:

1.2.1 Formulación de medios de cultivo

Formular medios líquidos (caldos) nutritivos y no selectivos para el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con un nivel de a_w de 0.99 utilizando como agente depresor cloruro de sodio y con un nivel de pH de 5.5.

Formular medios sólidos (agares) nutritivos y no selectivos para el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, para determinar el efecto de los agentes antimicrobianos sobre los microorganismos.

1.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias del crecimiento de *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* utilizando agentes antimicrobianos de origen natural (timol y carvacrol) y de origen sintético (sorbato de potasio) en cada uno de los medios líquidos, bajo condiciones de pH 5.5 y a_w 0.99. La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias se lleva a cabo por turbidimetría y recuento en placa.

3.2.3 Evaluación de las mezclas.

Formular y evaluar mezclas que incluyan diferentes agentes antimicrobianos de origen natural y/o sintético en diferentes concentraciones. Evaluar los efectos en medios de laboratorio líquidos sobre el crecimiento de los microorganismos mencionados y determinar efecto bactericida o bacteriostático en medios sólidos de laboratorio.

Determinar las concentraciones fraccionales inhibitorias del crecimiento de cada uno de los microorganismos en estudio, así como, determinar si las combinaciones de los agentes antimicrobianos presentan sinergismo, antagonismo o aditividad.

3.3.4 Cinética de crecimiento

Determinar el comportamiento de crecimiento de *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en presencia de sorbato de potasio a diferentes concentraciones en medios de laboratorio líquidos.

1.3 MATERIALES Y METODOS

1.3.1 Microorganismos

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria innocua* ATCC 51742, *Salmonella thyphimurium* ATCC 35218, obtenidas del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla, las cuales se hicieron crecer en cuñas de agar soya caseína (CASOY) (Merck, Merck México) a 35°C por 48 horas para después mantenerlas en refrigeración a 4°C; se resembraron continuamente (López-Malo, 1995).

1.3.2 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se tomó una asada de las cepas mantenidas en cuñas de agar CASOY y se hicieron crecer en caldo soya tripticaseína (CASOY) (Merck, Merck México) a las condiciones óptimas de temperatura (35°C). Los inóculos se resembraron cada 24 horas para mantener la fase exponencial de crecimiento.

1.3.3 Preparación de los sistemas modelo

Se prepararon sistemas modelo líquidos en tubos de vidrio de fondo plano con una capacidad de 7 ml utilizando como base caldo soya tripticaseína (CASOY); se les adicionó la cantidad requerida de cloruro de sodio para ajustar la actividad de agua a un valor de 0.99. La cantidad de soluto adicionada se determinó utilizando las ecuaciones de Ross (1975) y Norrish (1980) (Apéndice A).

Se ajustó el pH a un valor de 5.5 adicionando ácido clorhídrico 0.1N esterilizado por filtración en membrana de 0.45 micras (Micro Filtration Systems, Dublín, CA). La cantidad necesaria de HCl para ajustar el pH se determinó previamente

mediante una curva de titulación. Los sistemas modelo se esterilizaron a 121°C por 15 min.

Para la adición de los diferentes antimicrobianos, se preparó una solución acuosa al 0.5% p/v de sorbato de potasio (Merck, Merck, México), y soluciones alcohólicas al 0.5% p/v de timol y carvacrol. Estas soluciones se esterilizaron por filtración en membrana de celulosa con tamaño de poro de 0.45 micras (Micro Filtration Systems, Dublín, CA); se almacenaron en refrigeración (4°C) en frascos forrados con papel estaño. Los antimicrobianos se añadieron a los sistemas previamente esterilizados.

Se evaluó el efecto de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio, a diferentes concentraciones de cada uno de los agentes siguiendo un diseño tipo tablero de ajedrez (Davidson y Parish, 1989). Las diferentes combinaciones de concentraciones de los agentes antimicrobianos se muestran en las tablas 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4, 3.3.5.

Tabla 3.3.1. Combinación de concentraciones de agentes antimicrobianos utilizados en la formulación de caldo soya tripticaseína, para evaluar la capacidad antibacteriana de las mezclas.

Sorbato de potasio 100 ppm						
Carvacrol (ppm)						
		100	50	25	12.5	0
Timol (ppm)	100	100/100	100/50	100/25	100/12.5	100/0
	50	50/100	50/50	50/25	50/12.5	50/0
	25	25/100	25/50	25/25	25/12.5	25/0
	12.5	12.5/100	12.5/50	12.5/25	12.5/12.5	12.5/0
	0	0/100	0/50	0/25	0/12.5	0/0

Tabla 3.3.2. Combinación de concentraciones de agentes antimicrobianos utilizados en la formulación de caldo soya tripticaseína, para evaluar la capacidad antibacteriana de las mezclas.

Sorbato de potasio 50 ppm						
Carvacrol (ppm)						
Timol (ppm)		100	50	25	12.5	0
	100	100/100	100/50	100/25	100/12.5	100/0
	50	50/100	50/50	50/25	50/12.5	50/0
	25	25/100	25/50	25/25	25/12.5	25/0
	12.5	12.5/100	12.5/50	12.5/25	12.5/12.5	12.5/0
	0	0/100	0/50	0/25	0/12.5	0/0

Tabla 3.3.3. Combinación de concentraciones de agentes antimicrobianos utilizados en la formulación de caldo soya tripticaseína, para evaluar la capacidad antibacteriana de las mezclas.

Sorbato de potasio 25 ppm						
Carvacrol (ppm)						
Timol (ppm)		100	50	25	12.5	0
	100	100/100	100/50	100/25	100/12.5	100/0
	50	50/100	50/50	50/25	50/12.5	50/0
	25	25/100	25/50	25/25	25/12.5	25/0
	12.5	12.5/100	12.5/50	12.5/25	12.5/12.5	12.5/0
	0	0/100	0/50	0/25	0/12.5	0/0

Tabla 3.3.4. Combinación de concentraciones de agentes antimicrobianos utilizados en la formulación de caldo soya tripticaseína, para evaluar la capacidad antibacteriana de las mezclas.

Sorbato de potasio 12.5 ppm						
Carvacrol (ppm)						
Timol (ppm)		100	50	25	12.5	0
	100	100/100	100/50	100/25	100/12.5	100/0
	50	50/100	50/50	50/25	50/12.5	50/0
	25	25/100	25/50	25/25	25/12.5	25/0
	12.5	12.5/100	12.5/50	12.5/25	12.5/12.5	12.5/0
	0	0/100	0/50	0/25	0/12.5	0/0

Tabla 3.3.5. Combinación de concentraciones de agentes antimicrobianos utilizados en la formulación de caldo soya tripticaseína, para evaluar la capacidad antibacteriana de las mezclas.

Sorbato de potasio 0 ppm						
Carvacrol (ppm)						
Timol (ppm)		100	50	25	12.5	0
	100	100/100	100/50	100/25	100/12.5	100/0
	50	50/100	50/50	50/25	50/12.5	50/0
	25	25/100	25/50	25/25	25/12.5	25/0
	12.5	12.5/100	12.5/50	12.5/25	12.5/12.5	12.5/0
	0	0/100	0/50	0/25	0/12.5	0/0

3.3.4. Inoculación del sistema modelo

Los sistemas modelo líquidos con la cantidad de antimicrobianos correspondientes, se inocularon por duplicado con una población representativa de 10^7 UFC/ml de las bacterias en estudio (*Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*); se determinó la turbidez inicial. Los sistemas se incubaron por 24 horas a 35°C. Una vez concluido este tiempo, se midió turbidez a cada uno de ellos con el colorímetro DR/890 (HACH), para determinar crecimiento o inhibición de los microorganismos por parte de las mezclas de antimicrobianos. Esta medición se realizó diariamente durante siete días.

3.3.5. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI)

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en aquellos sistemas en donde no se detectó crecimiento al final de los siete días, considerando que un sistema en donde hubo crecimiento fue aquél en donde se presentó un cambio significativo en turbidez; con estos datos se obtuvieron las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) utilizando la fórmula reportada por Davidson y Parish (1989), con el objeto de establecer la existencia de sinergismo, aditividad o antagonismo al utilizar las mezclas.

$$\text{CFI A} = (\text{CMI de A en presencia de B y C}) / (\text{CMI de A individualmente})$$

$$\text{CFI B} = (\text{CMI de B en presencia de A y C}) / (\text{CMI de B individualmente})$$

$$\text{CFI C} = (\text{CMI de C en presencia de A y B}) / (\text{CMI de C individualmente})$$

Mediante estas concentraciones fraccionales se calcularon los índices CFI (Davidson y Parrish, 1989):

$$\text{Índice CFI} = \text{CFI A} + \text{CFI B} + \text{CFI C}$$

El cálculo del CFI produce un solo número el cual indica la existencia de efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos. Teóricamente un índice CFI igual o próximo a 1 indica aditividad, menor a 1 indica sinergismo y mayor a uno antagonismo (Berembaum, 1980).

Para observar si el efecto de la mezcla antimicrobiana fue bactericida o bacteriostático, se sembró un mililitro de cada sistema en cajas petri de 100x15 por la técnica de vertido en placa; se incubaron a 35°C por 48 horas, se observó y se realizó el recuento.

3.3.6. Cinética de crecimiento en presencia de sorbato de potasio

Se determinó la cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en presencia de sorbato de potasio a diferentes concentraciones (2000, 5000, 10000 y 20000 ppm), tomando un mililitro de muestra de los sistemas modelo líquidos con una actividad de agua 0.99 y un pH 5.5 adicionados con las cantidades señaladas de antimicrobiano. La muestra fue tomada cada hora durante siete horas y luego cada 24 horas por 2 días. La muestra tomada se sembró en cajas petri de 10 ml por la técnica de vertido en placa utilizando como base agar nutritivo (Merck, Merck, México); estas cajas se incubaron por 48 horas a 35°C y se realizó el recuento.

1.4 RESULTADOS Y DISCUSION

El pH y la actividad de agua del caldo soya-tripticaseína (CASOY) determinados al inicio y al final de los 7 días de incubación a 35°C, mostraron que los valores requeridos de 5.5 y 0.99 respectivamente, permanecieron constantes al lo largo del experimento. La adición del sorbato de potasio en todas sus concentraciones (100 a 2000ppm), no afectó el pH ni la actividad de agua de los sistemas estudiados.

3.4.1. Establecimiento de las concentraciones mínimas inhibitorias individuales de los antimicrobianos probados.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es definida como el nivel mínimo de la concentración del aceite esencial que produce el 90% de reducción en el crecimiento microbiano (Skandamis et al., 2001); en este trabajo, el criterio utilizado consistió en que aquellos tubos que no presentaban turbidez a lo largo de 7 días consecutivos, se consideraban sin crecimiento microbiano y se sembraban en cajas petri con agar nutritivo para corroborar la inhibición microbiana.

En la tabla 3.4.1 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias de los antimicrobianos probados para cada microorganismo. En esta tabla, se observa que las concentraciones mínimas inhibitorias de los agentes naturales son menores que los reportados por Santiesteban (2002) que eran del orden de 150 a 250 ppm, esto debido a que en medios líquidos las bacterias tienen la capacidad de movilizarse y estar en contacto directo con los agentes antimicrobianos (Pelczar, 1995); sin embargo, la CMI para el sorbato de potasio reportada por Santiesteban (2002) (del orden de 600 a 800 ppm), es significativamente menor que la obtenida en este trabajo; esto se debe a que el sorbato de potasio es relativamente inestable en soluciones acuosas y tiende a degradarse más rápidamente en comparación con los sistemas modelo sólidos, además de que la presencia de ácidos en el medio incrementan la velocidad de oxidación (Sofos,

1989); y no hay que olvidarse que el medio líquido tenía ácido Clorhídrico 0.1N para ajustar el pH a un valor de 5.5. Por lo que en sistemas modelo líquidos se requiere de mayor cantidad de sorbato de potasio para lograr la inhibición de los microorganismos.

Así mismo, Gianuzzi et al., (1998), al trabajar con sorbato de potasio como agente antimicrobiano y con *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, señala que las concentraciones necesarias para inactivar este microorganismo son elevadas (2500 ppm) debido a la alta resistencia del mismo.

Tabla 3.4.1 Concentraciones mínimas inhibitorias individuales (ppm) de los antimicrobianos en estudio para *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

	Carvacrol (ppm)	Timol (ppm)	Sorbato de potasio (ppm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	112.5	112.5	2000
<i>Listeria innocua</i>	150	162.5	2000
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	112.5	2000
<i>Escherichia coli</i>	112.5	100	2000

En tabla 3.4.1 se observa que los agentes antimicrobianos carvacrol y timol son igualmente efectivos contra *Staphylococcus aureus*; mientras que para *Listeria innocua* y *Salmonella typhimurium*, carvacrol es más efectivo que timol requiriéndose menor cantidad para inhibir a los microorganismos. Para *Escherichia coli* el agente antimicrobiano más efectivo es timol seguido de carvacrol.

Helander et al. (1998) al probar el efecto del carvacrol y el timol sobre *E. coli* 0157:H7 y *S. typhimurium*; notaron que la manera de actuar de estos agentes antimicrobianos era disminuyendo el contenido de ATP intracelular de las células

de los microorganismos, al mismo tiempo que incrementaban el ATP extracelular, lo que provocaba el rompimiento de la membrana plasmática.

Los agentes antimicrobianos naturales (Carvacrol y Timol) tienen una fuerte actividad antibacteriana sobre bacterias gram positivas y negativas (Farang, et al., 1989); sin embargo al compararlas, se observa que las bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*), tienden a ser más resistentes que las bacterias gram negativas (*Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*).

La resistencia por parte de los microorganismos a la acción de los agentes antimicrobianos, se debe a varios factores (Brul et al., 1999):

1. A la secreción de enzimas proteolíticas por parte de los microorganismos, que logran degradar a las proteínas y péptidos con acción antimicrobiana.
2. Las células pueden alterar la composición de su membrana por el estrés al que está expuesto por la acción de los agentes antimicrobianos.

3.4.2. Efecto de las mezclas ternarias carvacrol-timol-sorbato de potasio sobre la respuesta de crecimiento (G) y no crecimiento (NG) de los diferentes microorganismos.

En las tablas 3.4.2. a la 3.4.5 se muestra la respuesta de crecimiento o no crecimiento de los microorganismos estudiados (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*) en las diferentes combinaciones generadas de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio. (NOTA: Para propósitos de continuidad del texto, estas tablas se anexan al final de este apartado). Cabe señalar que se consideraron sistemas en donde no hubo crecimiento, aquellos tubos traslúcidos cuya turbidez era muy baja (menos de 50 NTU) o cercana a cero. Mientras que aquellos tubos con turbidez aparente y valores mayores a 50 NTU eran considerados sistemas con

crecimiento microbiano. En la figura 3.4.1 se muestra un ejemplo de un sistema turbio y uno transparente. El tubo transparente presentaba un valor de turbidez de 13 NTU mientras que el tubo turbio presentaba un valor de 276 NTU.

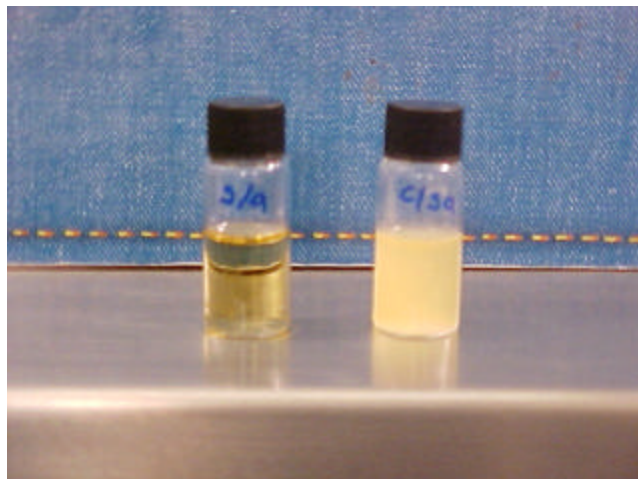


Figura 3.4.1. Ejemplo de un sistema turbio considerado con crecimiento microbiano y un sistema sin turbidez considerado sin crecimiento microbiano.

En la tabla 3.4.2 referente a *Staphylococcus aureus* se observa que de las 125 combinaciones probadas, solamente 17 fueron efectivas para la inhibición del crecimiento del microorganismo durante 7 días a 35°C. Esto quiere decir que únicamente el 13.6% de las combinaciones de la mezcla carvacrol-timol-sorbato de potasio son efectivas para la inhibición de *Staphylococcus aureus*.

Al analizar los resultados presentados en la tabla 3.4.3 referente a *Listeria innocua*, se observa que solamente 40 combinaciones de 125 probadas son efectivas para la inhibición del microorganismo. Esto quiere decir, que el 32% de las combinaciones son efectivas para inhibir a *Listeria innocua*.

Comparando las dos bacterias gram positivas estudiadas (*Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*), se observa que *Staphylococcus aureus* es más resistente que *Listeria innocua*. Esto coincide con lo reportado por Santiesteban (2002), que señala a *Staphylococcus aureus* como el microorganismo más resistente en mezclas binarias de carvacrol-sorbato de potasio y timol-sorbato de potasio.

En la tabla 3.4.4 se puede observar el efecto de las combinaciones de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio contra *Salmonella typhimurium*. De las 125 combinaciones estudiadas, solamente 54 son efectivas contra dicho microorganismo; esto indica que el 43.2% de las combinaciones son efectivas para inhibir a *Salmonella thyphimurium*.

Finalmente en la tabla 3.4.5 se encuentran los resultados obtenidos de las 125 combinaciones probadas contra *Escherichia coli*; se observa que 69 combinaciones son efectivas para inactivar al microorganismo; lo que nos refleja que el 55.2% de las combinaciones analizadas de la mezcla carvacrol-timol-sorbato de potasio, son efectivas contra dicha bacteria.

Analizando las dos bacterias gram negativas, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, la primera es más resistente a las combinaciones de la mezcla ternaria estudiada.

En referencia a las mezclas ternarias analizadas, se observa que las mezclas efectivas para inhibir a los microorganismos de estudio dependen básicamente de la concentración de los agentes antimicrobianos carvacrol y timol, ya que se observa que en términos generales, a medida que disminuye la concentración de sorbato de potasio, la efectividad de las mezclas permanece constante en tanto se mantengan las concentraciones de timol y carvacrol; sin embargo el cambio de concentración de los agentes antimicrobianos naturales si afectan la efectividad de la mezcla aunque la concentración del sorbato de potasio permanezca constante.

Comparando las mezclas ternarias y binarias, se observa que existen un mayor número de mezclas ternarias efectivas para inhibir a los microorganismos de estudio que mezclas binarias.

Con lo que respecta a las mezclas binarias, se observa que para *Staphylococcus aureus* solamente una mezcla de carvacrol-timol en 100 ppm de cada uno de los agentes, es efectiva para inhibir al microorganismo, situación que no era la esperada, ya que Santiesteban (2002), reporta que la mezcla binaria carvacrol-sorbato de potasio a una concentración de 50 y 100 ppm respectivamente, es efectiva para inhibir a la bacteria.

En el caso de *Listeria innocua*, se observan 8 mezclas binarias efectivas para inhibir al microorganismo. Cuatro de ellas estaban formadas por carvacrol y sorbato de potasio. La concentración más baja efectiva para inhibir a la bacteria es de 100 ppm de carvacrol y 25 ppm de sorbato de potasio; en éstas, se observa que el agente antimicrobiano limitante es el carvacrol, ya que si se disminuye la cantidad de este agente a concentraciones menores de 100 ppm, la mezcla pierde su efectividad para inhibir a la bacteria. Esto coincide con lo reportado por Santiesteban (2002), en dónde la mezcla carvacrol-sorbato de potasio es efectiva para inhibir a *Listeria innocua* en concentraciones de hasta 50 ppm para cada uno de los agentes antimicrobianos.

Así mismo, las otras cuatro mezclas efectivas para inhibir a *Listeria innocua*, estaban formadas por los agentes antimicrobianos naturales carvacrol-timol. En ellas se observa, que las concentraciones mínimas requeridas para inhibir a la bacteria son 100 ppm de carvacrol y 25 ppm de timol; así como 50 ppm de carvacrol y 100 ppm de timol.

El caso de *Salmonella typhimurim* se observan 13 mezclas binarias efectivas para inhibir a la bacteria; de éstas, 3 corresponden a la mezcla binaria carvacrol-sorbato de potasio, 1 a la mezcla timol-sorbato de potasio y 6 a la mezcla timol-

carvacrol. Santiesteban (2002) reporta que la mezcla binaria timol-sorbato de potasio en concentraciones de hasta 200 y 100 ppm, así como 50 y 150 ppm respectivamente, son efectivas para inhibir al microorganismo. De la misma manera reporta que la mezcla binaria carvacrol-sorbato de potasio en concentraciones de hasta 50 y 100 ppm respectivamente, son efectivas para inhibir a *S. typhimurium*.

Con lo que respecta a *Escherichia coli*, de las mezclas binarias analizadas 17 fueron efectivas para inhibir al microorganismo. De éstas, 4 corresponden a la mezcla carvacrol-sorbato de potasio, 4 a la mezcla timol-sorbato de potasio y 9 a la mezcla carvacrol-timol. Esto es semejante a lo reportado por Santiesteban (2002), en donde la mezcla binaria carvacrol-sorbato de potasio en concentraciones de hasta 150 y 50 ppm respectivamente, así como la mezcla timol-sorbato de potasio en concentraciones de hasta 50 ppm de carvacrol y 200 ppm de timol, y 150 ppm para ambos agentes, es efectiva para inhibir a la bacteria.

El hecho de que las bacterias gram positivas sean más resistentes que las gram negativas a la acción de los agentes antimicrobianos, se debe a la estructura y composición de la pared celular. Las paredes celulares de las bacterias gram negativas son delgadas y ricas en lípidos mientras que las gram positivas contienen una pared celular con ácidos teicoicos que las hacen más resistentes (Pelczar, 1995).

En general, se observa que se logra la inhibición microbiana al aumentar la concentración de los agentes antimicrobianos en las mezclas.

Tabla 3.4.2. Respuesta de crecimiento (G) o no crecimiento (NG) de *S. aureus* después de 7 días de incubación, en caldo CASOY formulado con diversas concentraciones de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio a un pH de 5.5 y a_w 0.99.

<i>Staphylococcus aureus</i>					
Sorbato de potasio 100 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	G	G
50	NG	G	G	G	G
25	G	G	G	G	G
12.5	G	G	G	G	G
0	G	G	G	G	G
Sorbato de potasio 50 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	G	G
50	NG	G	G	G	G
25	G	G	G	G	G
12.5	G	G	G	G	G
0	G	G	G	G	G
Sorbato de potasio 25 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	G	G
50	NG	G	G	G	G
25	G	G	G	G	G
12.5	G	G	G	G	G
0	G	G	G	G	G
Sorbato de potasio 12.5 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	G	G
50	NG	G	G	G	G
25	G	G	G	G	G
12.5	G	G	G	G	G
0	G	G	G	G	G
Sorbato de potasio 0 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	G	G	G	G
50	G	G	G	G	G
25	G	G	G	G	G
12.5	G	G	G	G	G
0	G	G	G	G	G

Tabla 3.4.3. Respuesta de crecimiento (G) o no crecimiento (NG) de *L. innocua* después de 7 días de incubación, en caldo CASOY formulado con diversas concentraciones de la mezcla ternaria carvacrol-timol -sorbato de potasio a un pH de 5.5 y a_w 0.99.

<i>Listeria innocua</i>					
Sorbato de potasio 100 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	G	G	G	G	G
Sorbato de potasio 50 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	G	G	G	G	G
0	G	G	G	G	G
Sorbato de potasio 25 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	G	G	G	G
12.5	G	G	G	G	G
0	G	G	G	G	G
Sorbato de potasio 12.5 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	G	G	G	G
12.5	G	G	G	G	G
0	G	G	G	G	G
Sorbato de potasio 0 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	G	G
50	NG	G	G	G	G
25	G	G	G	G	G
12.5	G	G	G	G	G
0	G	G	G	G	G

Tabla 3.4.4. Respuesta de crecimiento (G) o no crecimiento (NG) de *Salmonella typhimurium* después de 7 días de incubación, en caldo CASOY formulado con diversas concentraciones de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio a un pH de 5.5 y a_w 0.99.

<i>Salmonella typhimurium</i>					
Sorbato de potasio 100 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	NG	NG	G
25	NG	NG	NG	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 50 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	NG	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 25 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	NG	G	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 12.5 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	G
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	G	G	G	G
12.5	NG	G	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 0 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	G	G
50	NG	G	G	G	G
25	NG	G	G	G	G
12.5	NG	G	G	G	G

Tabla 3.4.5. Respuesta de crecimiento (G) o no crecimiento (NG) de *Escherichia coli* después de 7 días de incubación, en caldo CASOY formulado con diversas concentraciones de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio a un pH de 5.5 y a_w 0.99.

<i>Escherichia coli</i>					
Sorbato de potasio 100 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	NG	NG	G
25	NG	NG	NG	NG	G
12.5	NG	NG	NG	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 50 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	NG	NG	G
25	NG	NG	NG	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 25 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	NG	NG	G
25	NG	NG	NG	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 12.5 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 0 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	G
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	NG	G	G	G	G
0	NG	G	G	G	G

3.4.3. Efecto bactericida y bacteriostático de las combinaciones estudiadas de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio.

Una vez que en las muestras no se observó turbidez, se sembraron en cajas petri con agar nutritivo para observar si el efecto de las combinaciones de la mezcla ternaria era bactericida o bacteriostático.

Efecto bactericida, se refiere a la muerte de bacterias, mientras que efecto bacteriostático se refiere a la supresión del desarrollo de las mismas (Pelczar, 1995). Esto indica que si el efecto es bactericida, el crecimiento de microorganismos es nulo y no habrá presencia microbiana en la caja petri; mientras que si el efecto es bacteriostático, en la caja petri habrá crecimiento de bacterias debido a que la mezcla de agentes antimicrobianos únicamente evitó el crecimiento de las mismas pero no les provocó la lisis celular. Esto se puede observar mejor en la figura 3.4.2 y 3.4.3.

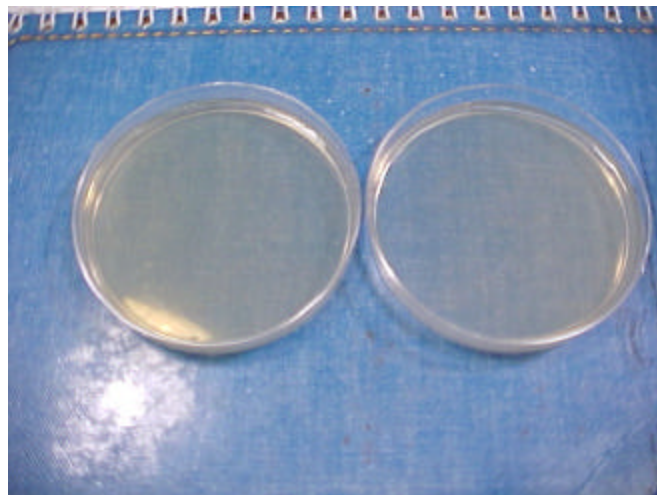


Figura 3.4.2. Efecto bactericida de las combinaciones efectivas inhibitorias de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio

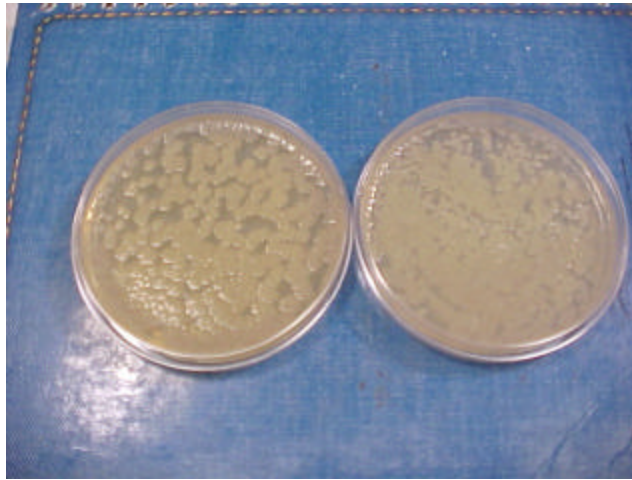


Figura 3.4.3. Efecto bacteriostático de las combinaciones efectivas inhibitorias de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio

En las tablas 3.4.6 a la 3.4.9 se muestran el tipo de efecto que causaron las diferentes combinaciones inhibitorias de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio. (NOTA: Para propósitos de continuidad del texto, estas tablas se anexan al final de este apartado).

En la tabla 3.4.6 se observa que de las 17 combinaciones que inhibieron a *Staphylococcus aureus*, 15 presentaron efecto bactericida mientras que dos presentaron efecto bacteriostático. De igual manera en la tabla 3.4.7 se aprecia que de 40 combinaciones efectivas para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua*, 29 presentan efecto bactericida y 11 efecto bacteriostático.

En lo que respecta a las bacterias gram negativas, en la tabla 3.4.8 se muestra que para *Salmonella typhimurium* 47 combinaciones presentan efecto bactericida y solamente 7 efecto bacteriostático de un total de 54 combinaciones efectivas para inactivar dicha bacteria; de la misma manera, en la tabla 3.4.9 se observa que para *Escherichia coli*, 56 combinaciones presentan efecto bactericida y 13 efecto bacteriostático de un total de 69 combinaciones efectivas para inhibir al microorganismo.

De las combinaciones efectivas inhibitorias para cada microorganismo, el 81% presentaron efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus*, 88% contra *Listeria*



innocua, 72.5% contra *Salmonella typhimurium* y 87% contra *Escherichia coli*; lo que nos indica que el efecto predominante de las combinaciones efectivas de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio es bactericida sin importar si son gram positivas o negativas.

En términos generales, se puede observar que al disminuir la concentración de algunos de los agentes antimicrobianos naturales (carvacrol y/o timol) se modifica el efecto de la mezcla sobre los microorganismos, pudiendo pasar de un efecto bactericida a un efecto bacteriostático cuando se disminuye la concentración de alguno de ellos; es necesario destacar, que el cambio en la concentración de carvacrol, tiene una mayor influencia sobre el tipo de efecto que la mezcla ejerce sobre los microorganismos en comparación con el timol. De igual manera, se observa que al modificar la concentración de sorbato de potasio, el efecto de la mezcla en la mayoría de los casos no se ve afectado.

Es importante señalar que el uso de aceites esenciales debe ser limitado al sabor; ya que en ocasiones las concentraciones necesarias para que produzca un efecto bactericida exceden los niveles aceptables desde el punto de vista organoléptico (Ponce, et al., 2003).



3.4.6. Efecto bactericida o bacteriostático de las combinaciones inhibitorias de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio para de *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>			
Sorbato de potasio 100 ppm			
Timol (ppm)			
Carvacrol (ppm)	100	50	25
100	NG	NG	NG
50	NG	G	G
Sorbato de potasio 50 ppm			
Timol (ppm)			
Carvacrol (ppm)	100	50	25
100	NG	NG	NG
50	NG	G	G
Sorbato de potasio 25 ppm			
Timol (ppm)			
Carvacrol (ppm)	100	50	25
100	NG	NG	NG
50	NG	G	G
Sorbato de potasio 12.5 ppm			
Timol (ppm)			
Carvacrol (ppm)	100	50	25
100	NG	NG	NG
50	NG	G	G
Sorbato de potasio 0 ppm			
Timol (ppm)			
Carvacrol (ppm)	100	50	25
100	NG	G	G

 Efecto bactericida
 Efecto bacteriostático



3.4.7. Efecto bactericida o bacteriostático de las combinaciones inhibitorias de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio para de *Listeria innocua*.

<i>Listeria innocua</i>					
Sorbato de potasio 100 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
Sorbato de potasio 50 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	NG	G	G	G
Sorbato de potasio 25 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 12.5 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 0 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	G	G
50	NG	G	G	G	G

 Efecto bactericida
 Efecto bacteriostático

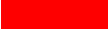

3.4.8. Efecto bactericida o bacteriostático de las combinaciones inhibitorias de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio para de *Salmonella typhimurium*.

<i>Salmonella typhimurium</i>					
Sorbato de potasio 100 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	NG	NG	G
25	NG	NG	NG	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 50 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	NG	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 25 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	NG	G	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 12.5 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	G
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	G	G	G	G
12.5	NG	G	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 0 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	G	G
50	NG	G	G	G	G
25	NG	G	G	G	G
12.5	NG	G	G	G	G

 Efecto bactericida
 Efecto bacteriostático

3.4.9. Efecto bactericida o bacteriostático de las combinaciones inhibitorias de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio para de *Escherichia coli*.

<i>Escherichia coli</i>					
Sorbato de potasio 100 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	NG	NG	G
25	NG	NG	NG	NG	G
12.5	NG	NG	NG	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 50 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	NG	NG	G
25	NG	NG	NG	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 25 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	NG	NG	G
25	NG	NG	NG	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 12.5 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	NG
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	NG	NG	G	G	G
0	NG	G	G	G	G
Sorbato de potasio 0 ppm					
Timol (ppm)					
Carvacrol (ppm)	100	50	25	12.5	0
100	NG	NG	NG	NG	G
50	NG	NG	G	G	G
25	NG	NG	G	G	G
12.5	NG	G	G	G	G
0	NG	G	G	G	G

 Efecto bactericida
 Efecto bacteriostático

3.4.4. Establecimiento de efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos utilizando las combinaciones estudiadas de la mezcla carvacrol-timol-sorbato de potasio.

De todas las combinaciones efectivas para inhibir el crecimiento de los microorganismos en estudio, se determinaron las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) y el índice de las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI índice) con la finalidad de observar el tipo de efecto que presenta la mezcla; éste puede ser antagónico, aditivo o sinérgico. Teóricamente, un índice CFI igual o próximo a 1 indica un efecto aditivo, < 1 indica un efecto sinérgico y > 1 indica un efecto antagónico (Davidson y Parish, 1989). Si el efecto es aditivo, indica que la actividad antimicrobiana de un compuesto no aumenta ni disminuye con la presencia de otro agente antimicrobiano; si el efecto es antagónico, indica que la actividad antimicrobiana de un compuesto es reducida con la presencia de los otros agentes antimicrobianos y si el efecto es sinérgico indica que la actividad antimicrobiana de un compuesto se ve incrementada con la presencia de otro agente antimicrobiano (Barry, 1976).

En las tablas 3.4.10 a la 3.4.13 se muestran los CFI, los índices CFI y el tipo de efecto que generaron las diferentes combinaciones efectivas para inhibir a cada uno de los microorganismos de estudio (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*). (NOTA: Para propósitos de continuidad del texto, estas tablas se anexan al final de este apartado).

En la tabla 3.4.10 se observa que para *Staphylococcus aureus* ninguna mezcla presentó efecto sinérgico, solamente presentaron efecto antagónico o aditivo. Esta situación no era la esperada, ya que León (2002), reporta 4 combinaciones sinérgicas de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio efectivas contra *S. aureus* a concentraciones menores a las estudiadas en este trabajo; por ejemplo, León (2002) señala que una combinación altamente sinérgica es aquella formada por 64 ppm de sorbato de potasio, 15 ppm de carvacrol y 45 ppm

de timol, mientras que en este trabajo, una combinación con los mismos agentes antimicrobianos en una concentración de 100 ppm cada uno, no presentó efecto sinérgico; por lo que se cumple lo reportado por Monzon et al., (2001), que señala que “no necesariamente los agentes que son buenos inhibidores en forma individual o mezclados en ciertas concentraciones, lo son mezclados con otros agentes o favorecen situaciones sinérgicas.”

En lo que respecta a *Listeria innocua* (Tabla 3.4.11), de todas las combinaciones estudiadas, solamente una presentó efecto aditivo y las 12 restantes presentaron efecto sinérgico. Santiesteban (2002) que señala que a una a_w de 0.99 y pH de 5.5 las mezclas binarias carvacrol-sorbato de potasio y timol-sorbato de potasio son sinérgicas contra dicho microorganismo. Por lo que en esta ocasión, las mezclas binaria sinérgicas, favorecieron que la mezcla ternaria estudiada en este trabajo fuera también sinérgica.

En la tabla 3.4.12 se observa que para *Salmonella typhimurim*, el efecto predominante es sinérgico (en 8 combinaciones), seguido por el efecto aditivo (en 6 combinaciones) y finalmente el efecto antagónico (en 3 combinaciones). Las mezclas binarias sinérgica reportadas por Santiesteban (2002) para una a_w de 0.99 y un pH de 5.5 para dicho microorganismo, son carvacrol-sorbato de potasio y timol-sorbato de potasio entre otras. En este caso, la mezcla ternaria resultado de las mezclas binarias sinérgicas, presentan el mismo efecto en la mayoría de las combinaciones.

Finalmente la tabla 3.4.13 muestra el CFI, el índice CFI y el efecto de las diferentes combinaciones inhibitorias para *Escherichia coli* de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio. En esta tabla se puede apreciar que el efecto predominante de las combinaciones es sinérgico, seguido por un efecto aditivo y finalmente un efecto antagónico. Esto coincide con lo reportado por León (2002), que señala que la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio en

concentraciones un poco menores a las estudiadas en este trabajo, son altamente sinérgicas para *Escherichia coli*.

Con los resultados obtenidos para los microorganismos en estudio, se observa que la mayoría de las combinaciones sinérgicas de la mezcla ternaria, son producto de mezclas binarias sinérgicas; así mismo, también se observa una vez más, que las bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* son más resistentes a la acción de agentes antimicrobianos que las bacterias gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurim*.

Es importante señalar, que los resultados mostrados en este trabajo, no pueden ser similares con los reportados por Santiesteban (2002) y León (2002), debido a que las metodologías empleadas para dichos trabajos fueron diferentes a la técnica empleada en el presente trabajo; aunado a esto, no hay que olvidar que los microorganismos se comportan diferente en medios sólidos y líquidos aunque las condiciones de a_w y pH sean las mismas.

3.4.10. Concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) de las combinaciones efectivas para inhibir a *Staphylococcus aureus* de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio.

<i>Staphylococcus aureus</i>							
EFFECTO BACTERICIDA							
Mezclas ternarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC(KS)	FIC index	Efecto
100	25	25	0.889	0.222	0.013	1.124	Aditivo
100	100	25	0.889	0.889	0.013	1.790	Antagónico
100	50	12.5	0.889	0.444	0.006	1.340	Antagónico
Mezcla binaria							
Carvacrol	Timol	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC index	Efecto		
100	100	0.889	0.889	1.778	Antagónico		

EFFECTO BACTERIOSTÁTICO							
Mezclas ternarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (carvacrol)	FIC (Timol)	FIC(KS)	FIC index	Efecto
100	25	12.5	0.889	0.222	0.006	1.117	Aditivo
50	100	12.5	0.444	0.889	0.006	1.340	Antagónico

3.4.11. Concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) de las combinaciones efectivas para inhibir *Listeria innocua* de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio.

<i>Listeria innocua</i>							
EFECTO BACTERICIDA							
Mezclas ternarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC(KS)	FIC index	Efecto
100	12.5	25	0.667	0.077	0.013	0.756	Sinérgico
50	50	12.5	0.333	0.308	0.006	0.647	Sinérgico
12.5	100	100	0.083	0.615	0.050	0.749	Sinérgico

Mezclas binarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC (KS)	FIC index	Efecto
100	50		0.667	0.308		0.974	Aditivo
100		25	0.667	0.000	0.013	0.667	Sinérgico

EFECTO BACTERIOSTÁTICO							
Mezclas ternarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC(KS)	FIC index	Efecto
12.5	50	100	0.083	0.308	0.050	0.441	Sinérgico
25	50	50	0.167	0.308	0.025	0.499	Sinérgico
25	100	12.5	0.167	0.615	0.006	0.788	Sinérgico
100	12.5	12.5	0.667	0.077	0.006	0.750	Sinérgico

Mezclas binarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC (KS)	FIC index	Efecto
100		12.5	0.667	0.000	0.006	0.667	Sinérgico
100	25		0.667	0.154	0.000	0.821	Sinérgico
50	100		0.333	0.615	0.000	0.949	Aditivo

3.4.12. Concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) de las combinaciones efectivas para inhibir *Salmonella typhimurium* de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio.

Salmonella typhimurium							
EFFECTO BACTERICIDA							
Mezclas ternarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC(KS)	FIC index	Efecto
100	12.5	25	1.000	0.111	0.013	1.124	Aditivo
50	25	50	0.500	0.222	0.025	0.747	Sinérgico
25	25	100	0.250	0.222	0.050	0.522	Sinérgico
25	50	50	0.250	0.444	0.025	0.719	Sinérgico
100	25	12.5	1.000	0.222	0.006	1.228	Antagónico
50	50	12.5	0.500	0.444	0.006	0.951	Aditivo
12.5	100	12.5	0.125	0.889	0.006	1.020	Aditivo
Mezclas binarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC (KS)	FIC index	Efecto
100	25		1.000	0.222	0.000	1.222	Antagónico
100		25	1.000	0.000	0.013	1.000	Aditivo
	100	25	0.000	0.889	0.013	0.889	Sinérgico
25	100		0.250	0.889	0.000	1.139	Antagónico
EFFECTO BACTERIOSTÁTICO							
Mezclas ternarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC(KS)	FIC index	Efecto
50	12.5	100	0.500	0.111	0.050	0.661	sinérgico
12.5	50	50	0.125	0.444	0.025	0.594	sinérgico
25	50	25	0.250	0.444	0.013	0.707	sinérgico
100	12.5	12.5	1.000	0.111	0.006	1.117	Aditivo
Mezclas binarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC (KS)	FIC index	Efecto
	100	12.5	0.000	0.889	0.006	0.889	sinérgico
12.5	100		0.125	0.889	0.000	1.014	Aditivo

3.4.13. Concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) de las combinaciones efectivas para inhibir *Escherichia coli* de la mezcla ternaria carvacrol-timol-sorbato de potasio.

<i>Escherichia coli</i>							
EFECTO BACTERICIDA							
Mezclas ternarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC(KS)	FIC index	Efecto
50	12.5	25	0.444	0.125	0.013	0.582	sinérgico
12.5	50	50	0.111	0.500	0.025	0.636	sinérgico
25	25	25	0.222	0.250	0.013	0.485	sinérgico
100	25	12.5	0.889	0.250	0.006	1.145	antagónico
25	50	12.5	0.222	0.500	0.006	0.728	sinérgico
12.5	100	12.5	0.111	1.000	0.006	1.117	antagónico
Mezclas binarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC (KS)	FIC index	Efecto
100		50	0.889	0.000	0.025	0.889	sinérgico
	100	12.5	0.000	1.000	0.006	1.000	aditivo
50	50		0.444	0.500	0.000	0.944	aditivo
EFECTO BACTERIOSTÁTICO							
Mezclas ternarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC(KS)	FIC index	Efecto
25	12.5	100	0.222	0.125	0.050	0.397	sinérgico
12.5	25	100	0.111	0.250	0.050	0.411	sinérgico
100	12.5	12.5	0.889	0.125	0.006	1.020	aditivo
12.5	50	12.5	0.111	0.500	0.006	0.617	sinérgico
Mezclas binarias							
Carvacrol	Timol	KS	FIC (Carvacrol)	FIC (Timol)	FIC (KS)	FIC index	Efecto
100		12.5	0.889	0.000	0.006	0.889	sinérgico
25	50		0.222	0.500	0.000	0.722	sinérgico
100	12.5		0.889	0.125	0.000	1.014	aditivo
12.5	100		0.111	1.000	0.000	1.111	aditivo

3.4.5 Cinética de crecimiento en presencia de sorbato de potasio

Debido a que la técnica turbidimétrica se ve afectada por el tamaño de las células bacterianas, así como por la presencia de células dañadas y la oxidación de aceites esenciales (Skandamis et al., 2001), se determinó una

curva de crecimiento de los microorganismos en estudio (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurim*, *Escherichia coli*) con sorbato de potasio como agente antimicrobiano, debido a que éste en altas concentraciones tiende a oxidarse en soluciones acuosas y formar compuestos de degradación, tales como acetaldehídos y carbonilos que tienden a precipitarse (Arya and Thakur, 1988) y por tanto afectan las mediciones de turbidez.

Con este método descriptivo de ensayo turbidimétrico, se pueden obtener algunas respuestas sobre el comportamiento de los microorganismos en presencia de los agentes antimicrobianos, tales como, supresión en el nivel de crecimiento en la fase estacionaria, incremento de la fase lag, disminución de la velocidad de crecimiento en la fase log y la letalidad (Davidson and Parish, 1989).

Los resultados de estas cinéticas de crecimiento junto con los datos de turbidez para cada microorganismo se observa en las figuras 3.4.4 a la 3.4.11. (NOTA: Para propósitos de continuidad del texto, estas figuras se anexan al final de este apartado).

En las figuras 3.4.4, 3.4.6, 3.4.8, y 3.4.10 se observa el crecimiento de los diferentes microorganismos en presencia de sorbato de potasio como agente antimicrobiano. En todas ellas, se observa una inhibición del microorganismo a partir de 2000 ppm, sin embargo la mayor reducción de ciclos logarítmicos (5 ciclos) se observa a 10 000 ppm. En el caso de *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurim* y *Escherichia coli* se observa que el sorbato de potasio influye en la fase log provocando una disminución en la velocidad de crecimiento y una supresión en el nivel de crecimiento de la fase estacionaria.

Así mismo las figuras 3.4.5, 3.4.7, 3.4.9, y 3.4.11 se observan los valores de turbidez obtenidos del crecimiento de los microorganismos a diferentes concentraciones de sorbato de potasio. En estas figuras se observa que los valores son muy similares sin importar el tipo de microorganismo y la concentración de sorbato de potasio presente; los valores tienden a aumentar

en las primeras horas de incubación para posteriormente permanecer constantes.

El hecho de que las tendencias de las curvas sean muy similares sin importar el tipo de microorganismo, se debe en parte, a que los métodos turbidimétricos son poco sensibles para detectar concentraciones celulares menores a 10^7 (Delgaard et al., 1994); sin embargo, en las figuras se puede observar que para cuando la concentración de células microbianas va en aumento, la técnica turbidimétrica proporciona una buena descripción del incremento total de células durante el crecimiento (Rattanasomboon, et al., 1999).

También es importante destacar, que la técnica turbidimétrica empleada no distingue entre células viables y no viables, por lo que a pesar de que en las curvas de crecimiento se observa una disminución en la población microbiana, la tendencia en los valores de turbidez es a permanecer constante; incluso Rattanasomboon et al., (1999), señala que hacia el final de la fase exponencial, la disminución en el tamaño de las células llega a producir un incremento en la turbidez.

Así mismo, es importante mencionar que el sorbato de potasio en altas concentraciones, tiende a producir un ligero enturbiamiento (Sofos, 1989) que afecta la turbidez.

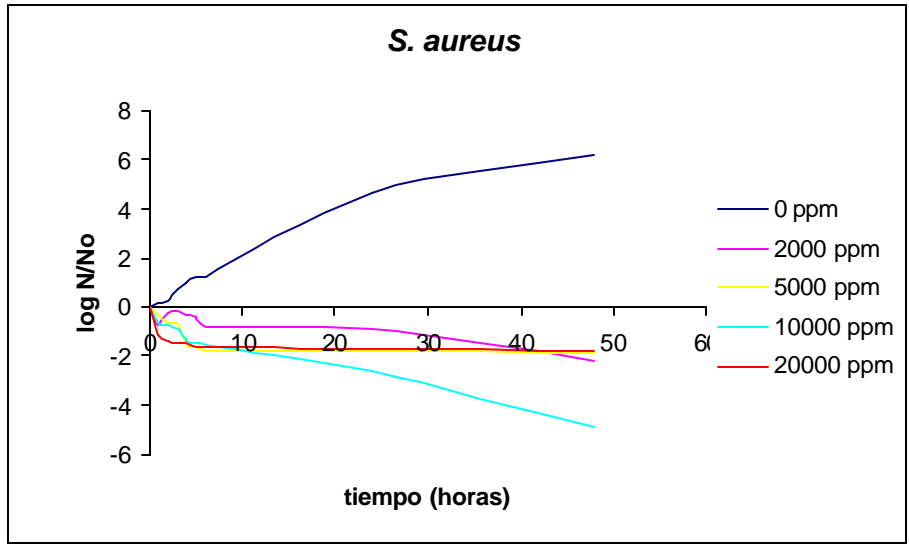


Figura 3.4.4 Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en presencia de sorbato de potasio a diferentes concentraciones.

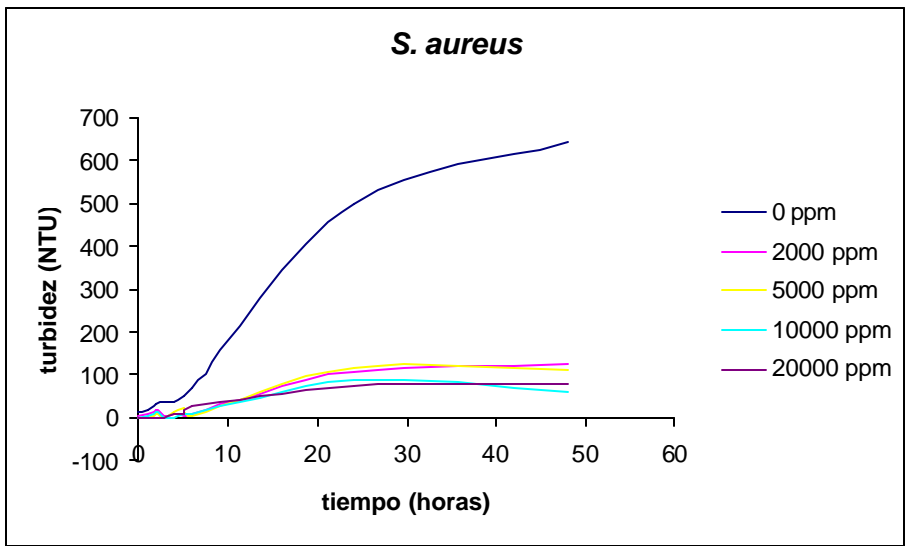


Figura 3.4.5 Valores de turbidez, referentes al crecimiento de *Staphylococcus aureus* en presencia de sorbato de potasio a diferentes concentraciones.

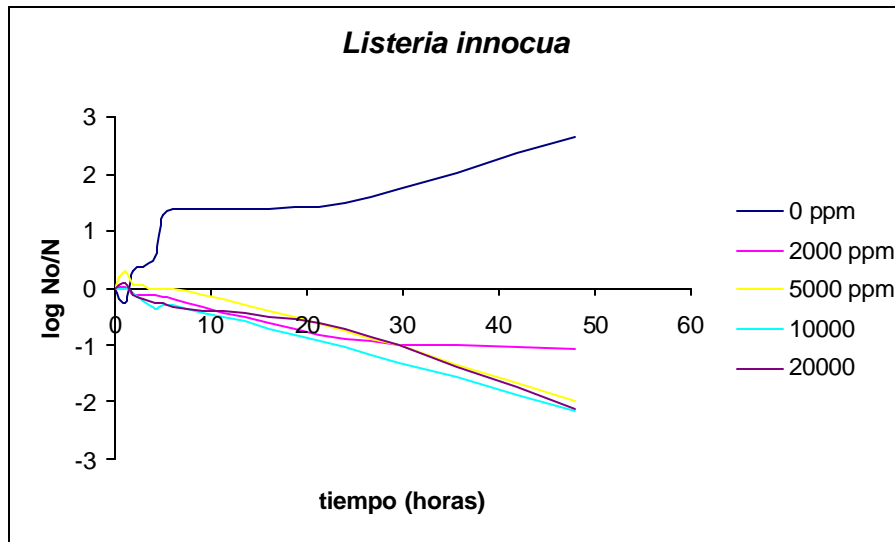


Figura 3.4.6 Cinética de crecimiento de *Listeria innocua* en presencia de sorbato de potasio a diferentes concentraciones.

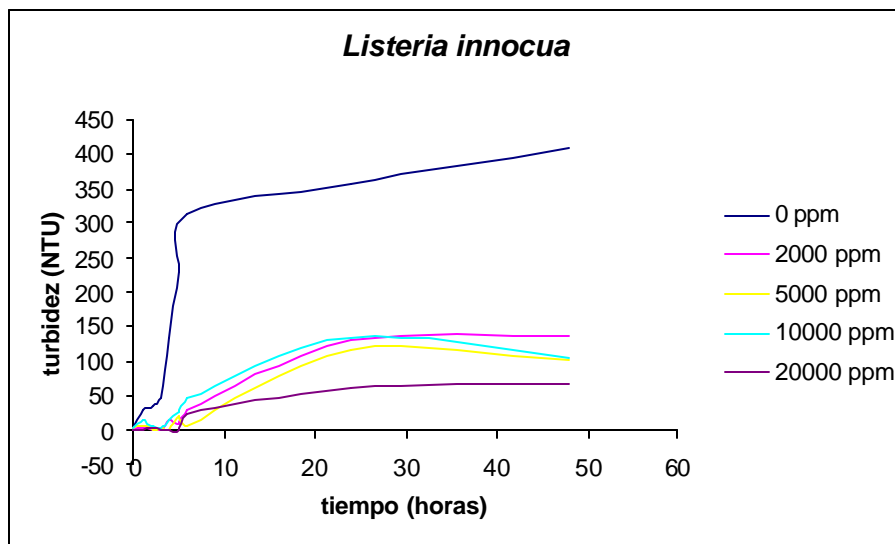


Figura 3.4.7 Valores de turbidez, referentes al crecimiento de *Listeria innocua* en presencia de sorbato de potasio a diferentes concentraciones.

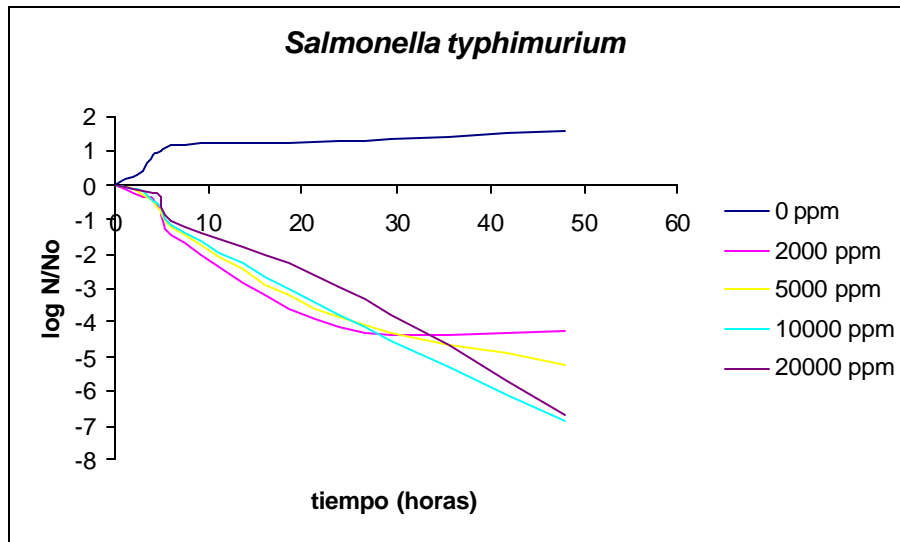


Figura 3.4.8 Cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en presencia de sorbato de potasio a diferentes concentraciones.

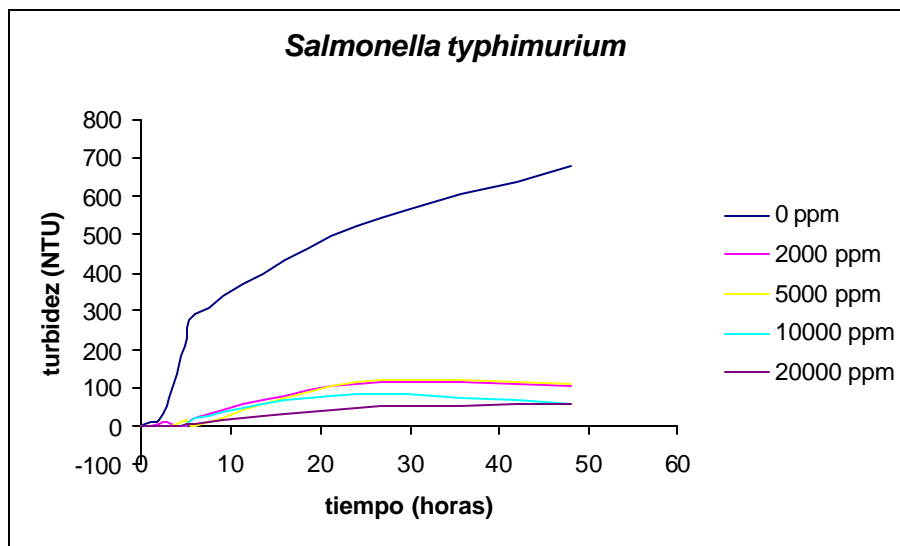


Figura 3.4.9 Valores de turbidez, referentes al crecimiento de *Salmonella typhimurim* en presencia de sorbato de potasio a diferentes concentraciones.

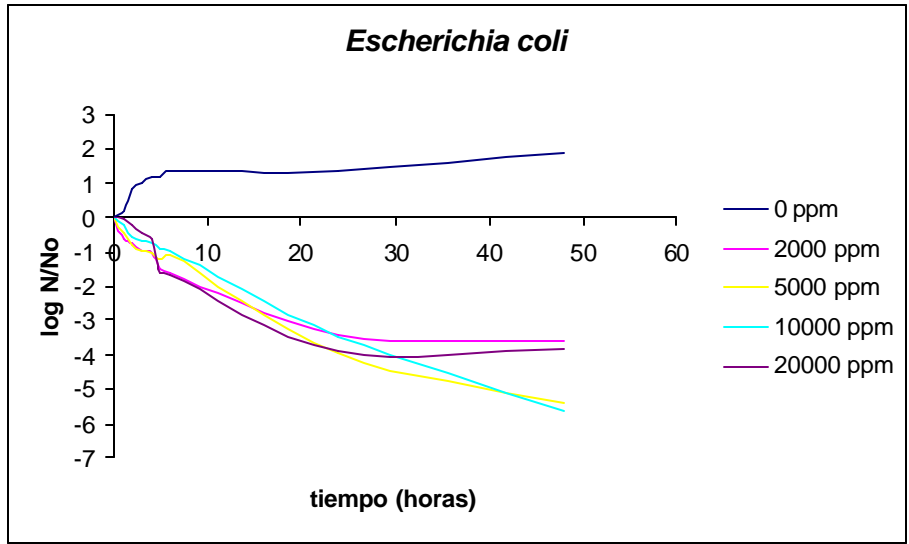


Figura 3.4.10 Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* en presencia de sorbato de potasio a diferentes concentraciones.

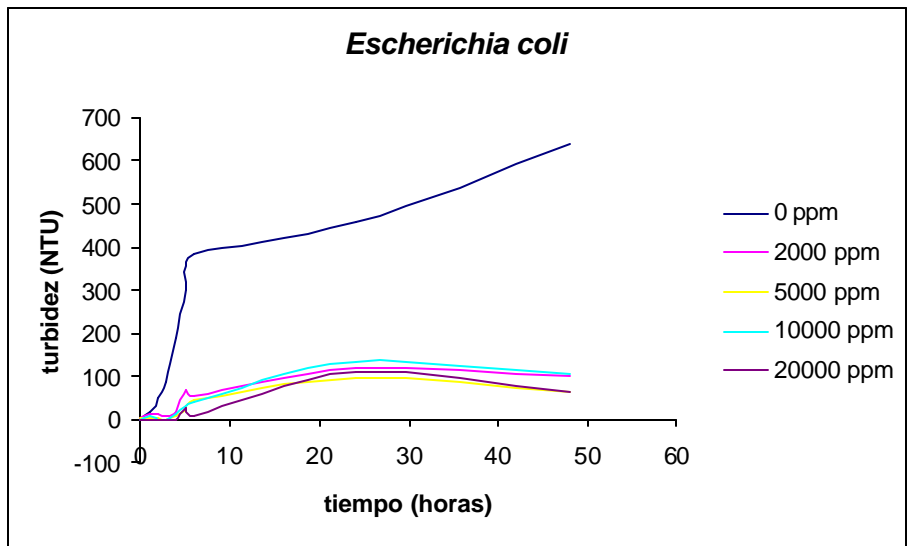


Figura 3.4.11 Valores de turbidez, referentes al crecimiento de *Escherichia coli* en presencia de sorbato de potasio a diferentes concentraciones.

1.5 CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

- Las concentraciones mínimas inhibitorias de las diferentes combinaciones de la mezcla ternaria carvacrol-thymol-sorbato de potasio variaron en el intervalo de 100 a 2000 ppm. Los agentes antimicrobianos naturales (carvacrol y thymol) son más efectivos para inhibir a *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurim* y *Escherichia coli* que el agente antimicrobiano sintético sorbato de potasio.
- Las CMI obtenidas en medio líquido son menores que las reportadas para medio sólido en el caso de los agentes antimicrobianos naturales; en el caso del sorbato de potasio (antimicrobiano sintético) la CMI requerida para los microorganismos en estudio es mayor que la reportada para medios sólidos debido a que el sorbato de potasio tiende a degradarse en soluciones acuosas.
- De las 4 bacterias estudiadas, *Staphylococcus aureus* fue la más resistente a la acción de la mezcla antimicrobiana, siendo *Escherichia coli* la bacteria más sensible.
- En general, el efecto provocado por las diferentes combinaciones de la mezcla antimicrobiana carvacrol-thymol-sorbato de potasio, fue bactericida.
- Al evaluar las combinaciones de la mezcla ternaria, el efecto que predominó fue sinergismo para 3 de los cuatro microorganismos estudiados (*Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*); para *S. aureus*, al ser el microorganismo más resistente, el efecto que prevaleció en las diferentes combinaciones evaluadas fue aditivo y antagónico.
- En general, las bacterias gram positivas son más resistentes que las bacterias gram negativas.
- La técnica turbidimétrica tiene las ventajas de ser un método rápido, no destructivo, fácil y efectivo para estimar el crecimiento de los microorganismos.
- La turbidimetría es una técnica no confiable cuando la población microbiana es menor a 10^7 cel/ml.

- Se recomienda realizar estudios con mezclas de antimicrobianos en alimentos para observar si las concentraciones utilizadas afectan sensorialmente el producto y para observar el comportamiento de los microorganismos.