

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS



**Facultad de
Ciencias**

Universidad Católica de la Santísima Concepción

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE POLIFENOLES DE CORTEZA DE *PINUS
RADIATA*, COMO ADITIVOS FUNCIONALES PARA LA INDUSTRIA AGRÍCOLA,
ALIMENTICIA Y BIOMÉDICA.

por

Fernanda Mariela Hermosilla Barra

Memoria entregada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la
Santísima Concepción para optar al Título profesional de Químico Ambiental

Profesor Guía: Danny E. García Marrero

Concepción

2018

AGRADECIMIENTOS

En esta oportunidad quiero agradecer a todas las personas que han sido parte fundamental de este camino, desde principio a fin.

En primer lugar a mi Madre Lilian Barra Esparza, quien tuvo la fortaleza y la comprensión necesaria para afrontar las dificultades que se nos presentaron a lo largo de esta etapa, sin olvidarse de proporcionarme el apoyo y la contención que tanto necesité en ciertos momentos. Ella, junto a mi hermano Matías, fueron parte esencial de este camino.

A mis abuelos, Margarita, Irma y Enrique, quienes fueron parte de mi vida desde un comienzo, y que a pesar de que dos de ellos ya no están conmigo, me brindaron el cariño necesario para que los recuerde con el sentimiento que solo ellos se merecen.

A mis tíos Hernán y Dafne, quienes me brindaron apoyo, principalmente emocional, siendo Hernán quien cumplió muchas veces el rol de Padre en mi vida, y Dafne, quien cumplió con el rol de tía cómplice y protectora.

A mis amigos y compañeros; A Juan Pablo, quien se merece este y muchos agradecimientos más por estar conmigo en estos últimos años, donde aprendimos a apoyarnos y aconsejarnos mutuamente; A Carolina, quien me acompañó y reconfortó en lo más complejo y que estuvo para alentarme y motivarme cuando lo necesitaba; y a Francisca, quien se sumó a mi grupo cercano en estos dos últimos años y con la que he tenido oportunidad de compartir lo bueno y lo malo.

A las Profesoras Valentina Medina, Elizabeth González, Irene Concha y Paulina Salas, quienes aportaron en mi vida, sólo lo que cada una de ellas en particular pueden aportar positivamente en la vida de un estudiante. Su buen humor, alegría,

empatía y sencillez. A María Inés, quien a pesar de no ser parte del grupo de Docentes, se merece todo el cariño y el aprecio por su buena disposición y carisma.

A mi profesor Guía, Danny García, quien fue parte de este último proceso, y del cual estoy agradecida haber elegido. En este camino, demostró su buena disposición con todos los alumnos que hemos sido parte de este proyecto. Personalmente, me sobraron motivos para haber desistido, pero fue él quien tuvo toda la fe puesta en mí para terminar de la mejor forma, sin dejar de lado el aprendizaje, y la motivación por el tema que escogí. En definitiva, logró superar todas mis expectativas, al ofrecerme la oportunidad de desempeñarme en un área completamente distinta.

Finalmente, quiero agradecer al profesor Carlos Franco, quien dejó en mí un muy grato recuerdo, y quien me hubiera gustado que estuviera presente en esta instancia, para agradecerle personalmente todo lo que me enseñó.

ÍNDICE

Contenido

ACRÓNIMOS Y SIGLAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Historia forestal en Chile	1
1.2 Polifenoles	3
1.3 Infecciones microbianas	5
1.3.1 Bacterias patógenas. Gram + y Gram -	7
1.3.2 Diferencias entre paredes celulares bacterianas	9
1.4 Agentes antimicrobianos. Generalidades	18
1.4.1 Uso de agentes antimicrobianos	19
1.4.2 Ácidos carboxílicos como antimicrobianos	20
1.5 Análisis antimicrobianos	21
1.5.1 Contacto directo	22
1.5.1.1 Dilución en agar	22
1.5.1.2 Dilución y micro dilución en caldo	22
1.5.1.3 Difusión en agar (Método de Kirby-Baüer)	22
1.5.1.4 Sembrado en espiral	22
1.5.2 Medios de cultivo	22
1.5.3 Clasificación de medios de cultivo	23
1.6 Métodos de control de bacterias patógenas	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
3.1.- Objetivo General	27
3.2.- Objetivos Específicos	27
METODOLOGÍA	28
4.1 Características de los poliflavonoides y sus derivados	29

4.2 Extracción de los poliflavonoides	30
4.3 Modificación de los poliflavonoides	30
4.3.1 Maleilación (esterificación)	30
4.3.2 Hidroxipropilación	31
4.4 Preparación de blendas termoplásticas	32
4.5 Preparación de solución patrón de poliflavonoides	33
4.6 Preparación del material	35
4.7 Medio de cultivo líquido.....	36
4.7.1 Preparación del caldo tripticasa (TSB)	36
4.7.2 Preparación del caldo Müller-Hinton (MH).....	36
4.8 Medio del cultivo sólido.....	36
4.8.1 Preparación del agar MacConkey.....	37
4.8.2 Preparación del agar Oxford.....	37
4.8.3 Preparación del agar BHI	37
4.8.4 Preparación del agar Müller-Hinton	37
4.8.5 Consideraciones para uso del agar	37
4.9 Preparación del Estándar de Turbidez (McFarland).....	38
4.9.1 Consideraciones	38
4.10 Preparación de inóculos.....	39
4.11 Medio líquido	40
4.11.1 Dilución en caldo	40
4.11.2 Difusión en agar (Método de Kirby-Baüer)	43
4.12 Medio sólido	45
4.12.1 Micro dilución en caldo	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1 Medio líquido	47
5.1.1 Dilución en caldo	47
5.1.2 Difusión en agar (Método de Kirby-Baüer)	57
5.2 Medio sólido	59
5.2.1 Micro dilución en caldo	59
CONCLUSIÓN	63

REFERENCIAS.....	65
ANEXOS	77

ACRÓNIMOS Y SIGLAS

Abreviatura	Significado
μm	Micrómetro
BaSO_4	Sulfato de Bario
BHI	Infusión cerebro-corazón
C	Poliflavonoide derivado de anhídrido Citracónico
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetil Sulfóxido
G+	Gram positiva
G-	Gram negativa
hr (s)	Hora (s)
HCl	Ácido Clorhídrico
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
I	Poliflavonoide derivado de anhídrido Itacónico
LDPE	Poliétileno de baja densidad
mm	Milímetro
M	Poliflavonoide derivado de anhídrido Maleico
MH	Müller-Hinton
NaOH	Hidróxido de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetro
pka	Constante de disociación
PLA	Ácido poliláctico
PO	Óxido de propileno
ppm	Partes por millón (mg L^{-1})
PS	Poliestireno
RNs	Especies reactivas de Nitrógeno
sp. (sp.)	Especie (s)

SS	Agar Salmonella-Shigella
TI	Tanino Insoluble
TS	Tanino Soluble
TSB	Caldo tripticasa de soya
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VB	Agar Verde brillante
XLD	Agar Xilosa, lisina, desoxicolato

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales bacterias patógenas (Parte I).....	8
Tabla 2.	Principales bacterias patógenas (Parte II).....	9
Tabla 3.	Clasificación de medios de cultivo (Parte I).....	23
Tabla 4.	Clasificación de medios de cultivo (Parte II).....	24
Tabla 5.	Concentraciones de poliflavonoides para dilución en caldo.....	34
Tabla 6.	Concentraciones de poliflavonoides para Kirby-Baüer.....	35
Tabla 7.	CMI y CMB de poliflavonoides sobre <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> y <i>S.aureus</i>	54
Tabla 8.	Propiedades fisicoquímicas y de actividad biológica calculada de ácidos dicarboxílicos.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución de especies madereras en Chile.....	2
Figura 2.	Estructura química de un monómero de tanino condensado.....	5
Figura 3.	Estructura de la pared celular de bacterias G+ y G-.....	10
Figura 4.	Tinción Gram de <i>S. aureus</i>	11
Figura 5.	Crecimiento de <i>S. aureus</i> en agar BHI.....	11
Figura 6.	Tinción Gram de <i>E. coli</i>	12
Figura 7.	Crecimiento de <i>E. coli</i> en agar MacConkey.....	12
Figura 8.	Tinción Gram de <i>L. monocytogenes</i>	13
Figura 9.	Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en agar Oxford.....	13
Figura 10.	Tinción Gram de <i>Shigella</i> sp.	14
Figura 11.	Crecimiento de <i>Shigella</i> sp. en agar XLD.....	14
Figura 12.	Tinción Gram de <i>E. faecium</i>	15
Figura 13.	Crecimiento de <i>E. faecium</i> en agar Sangre.....	15
Figura 14.	Tinción Gram de <i>Arthrobacter</i> sp.	16
Figura 15.	Crecimiento de <i>Arthrobacter</i> sp. en agar Sangre.....	16
Figura 16.	Tinción Gram de <i>Klebsiella</i> sp.	17
Figura 17.	Crecimiento de <i>Klebsiella</i> sp. en agar MacConkey.....	17
Figura 18.	Tinción Gram de <i>E. carotovora</i>	18
Figura 19.	Crecimiento de <i>E. carotovora</i> en agar MacConkey.....	18
Figura 20.	Esquema de hidrofobicidad de ácidos no disociados.....	21
Figura 21.	Estructuras del tanino condensado y sus modificaciones.....	29
Figura 22.	Blendas termoplásticas para ensayo en fase sólida.....	33
Figura 23.	Estandarización con Patrón McFarland.....	39
Figura 24.	Diluciones de poliflavonoides para metodología de dilución en caldo.....	40
Figura 25.	Determinación de CMI.....	41
Figura 26.	Determinación de CMB.....	42
Figura 27.	Halos de inhibición (Método Kirby-Baüer)....	44
Figura 28.	Técnica de microdilución en caldo en medio sólido.....	45

Figura 29. Área de crecimiento de <i>E. coli</i> (0,01-1000 ppm).....	48
Figura 30. Área de crecimiento de <i>S. aureus</i> (0,01-1000 ppm).....	49
Figura 31. Área de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> (0,01-1000 ppm).....	50
Figura 32. Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> sometida a poliflavonoide derivado de anhídrido Itacónico.....	51
Figura 33. Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> sometida a poliflavonoide derivado de anhídrido Citracónico.....	52
Figura 34. Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> sometida a poliflavonoide derivado de anhídrido Maleico.....	52
Figura 35. Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> sometida a Tanino condensado soluble.....	52
Figura 36. Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> sometido a Tanino condensado insoluble.....	53
Figura 37. Halos de inhibición de bacterias G+ contra poliflavonoides.....	57
Figura 38. Halos de inhibición de bacterias G- contra poliflavonoides.....	58
Figura 39. Porcentaje de inhibición de cinco bacterias patógenas frente a mezclas de polímeros (poliestireno más poliflavonoides).....	59
Figura 40. Porcentaje de inhibición de cinco bacterias patógenas frente a mezclas de polímeros (polietileno más poliflavonoides).....	60
Figura 41. Porcentaje de inhibición de cinco bacterias patógenas frente a mezclas de polímeros (ácido poliláctico más poliflavonoides).....	60

RESUMEN

Se realizó un estudio de la actividad microbiana de poliflavonoides de la corteza de *Pinus radiata*, así como de sus derivados modificados por esterificación con tres anhídridos (Anhídrido Itacónico, Citracónico y Maleico), y por hidroxipropilación con óxido de propileno; frente a bacterias patógenas de alta prevalencia en las industrias agrícola, alimenticia y biomédica. Para esto se efectuaron tres ensayos; dos en fase líquida, y uno en fase sólida. Para la fase líquida, en la primera etapa, se estudió el crecimiento bacteriano de tres especies (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) mediante el método de dilución en caldo, obteniendo resultados (semicuantitativos) positivos. El tanino modificado con anhídrido Citracónico mostró el máximo poder de inhibición con actividad desde los 50 mgL⁻¹. Dentro de estas tres bacterias, *L. monocytogenes* resultó ser la más sensible; *S. aureus* la de sensibilidad intermedia y *E. coli* la más resistente. En la segunda etapa (medio líquido), se realizó el análisis con la bacteria que se obtuvo mayor sensibilidad en la primera etapa y donde se decidió incorporar a *Erwinia carotovora*, *Klebsiella* sp., *Arthrobacter* sp., *Enterococcus faecium* y *Shigella* sp. Esta etapa se realizó mediante el método de Kirby-Baüer, donde se analizó el comportamiento frente a los mismos poliflavonoides utilizados en la primera etapa; obteniendo resultados (cuantitativos) positivos para el tanino insoluble y el tanino modificado a base de anhídrido Citracónico. En el caso de bacterias Gram positivas, los resultados más alentadores con los dos poliflavonoides descritos se obtuvieron frente a *L. monocytogenes*, mientras que de las bacterias Gram negativas, el mejor resultado se obtuvo con tanino insoluble para *E. carotovora* y con el tanino a base de anhídrido Citracónico para *Klebsiella* sp. Finalmente, los ensayos efectuados en medio sólido, demostraron un efecto asociado al tipo de poliflavonoide, de polímero y de la especie bacteriana. En este caso las bacterias más sensibles fueron *L. monocytogenes*, *Klebsiella* sp. y *Shigella* sp. En general, los taninos condensados y sus modificaciones, son biopolímeros/Bio-oligómeros que poseen actividad inhibitoria mayoritariamente sobre bacterias patógenas Gram positivas en fase

líquida, y bacterias Gram negativas en fase sólida. El tipo de polifenol y el medio en el que se encuentra influye significativamente en el potencial antibacteriano.

Palabras claves: Polifenol, poliflavonoides, *Pinus radiata*, microbiología, bacterias patógenas, polímeros antimicrobianos.

INTRODUCCIÓN

1.1 Historia forestal en Chile

Según las estadísticas realizadas hasta el año 2015, Chile se encuentra dentro de los 20 primeros países a nivel mundial que lideran la producción y comercialización de productos derivados de la madera, como la producción de trozas, pulpa y madera aserrada; además de la exportación de productos forestales (CORMA, 2016). Asimismo, esta industria genera un incremento en la economía del país, debido al bajo costo del proceso de producción de esta materia prima, y a pesar de que, durante el año 2008, la industria forestal sufrió una caída en los precios del mercado y una disminución en la exportación del producto, posterior a eso se ha mantenido; generando ya en el año 2009 una expansión de las empresas a nivel regional (AMCHAM, 2009).

En cuanto a la importancia, las plantaciones de pino tienen una gran incidencia en la silvicultura que se practica, ya que los grandes propietarios de plantaciones, lo son también de complejos industriales de celulosa, papel y aserraderos. Hasta el año 1992 habían aproximadamente 1.4 millones de hectáreas de plantaciones de pino, donde el 48% pertenecía a empresas como COPEC, CMPC y SHELL (Gerding, 1991).

Desde la expansión de las empresas, la Región del Biobío se considera el centro de la Industria forestal, debido a que la superficie de la zona cubierta por árboles hasta el año 2016, fue de 928.356 ha, precedida por la Región de la Araucanía con 493.013 ha, la Región del Maule con una superficie de 430.057 ha y la Región de los Ríos con un total de 185.108 ha. De las hectáreas ocupadas por plantaciones forestales en la VIII Región (Figura 1), alrededor de un 60,7% corresponden a *Pinus radiata*, el 26,5% a *Eucaliptus globulus*, el 11,1% a *Eucaliptus nitens* y el porcentaje restante, corresponden a plantaciones de árboles nativos (Infor, 2017).

Región del Biobío

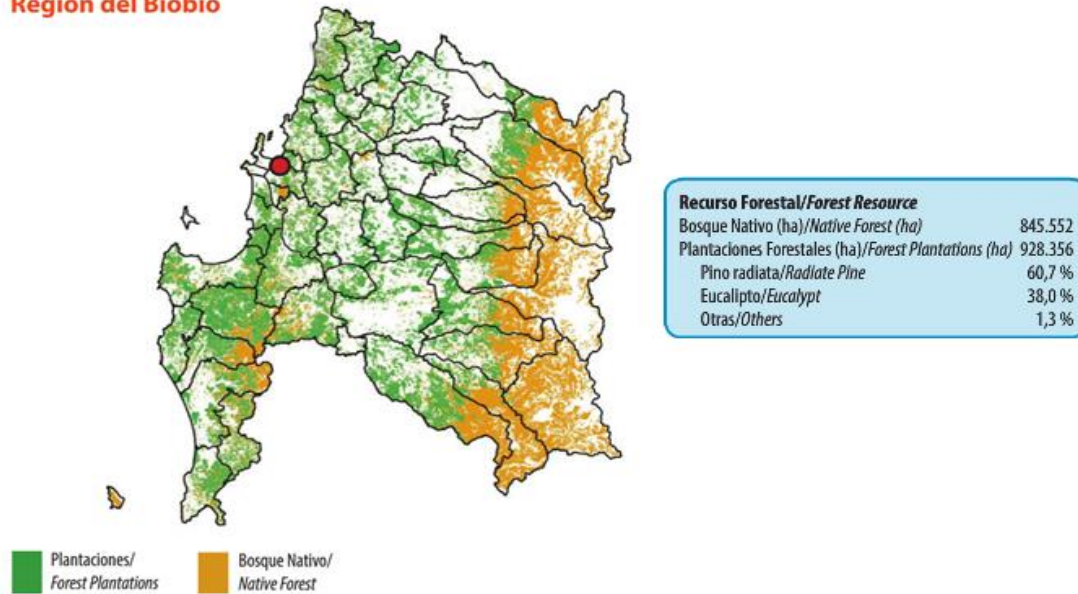


Fig 1. Distribución de especies madereras en Chile (Infor, 2017).

Pinus radiata (D.Don), o también llamado Pino Insigne, de Monterrey o de California, es una especie arbórea perteneciente a la familia de las pináceas, género *Pinus*, originaria del suroeste de los Estados Unidos, principalmente, California. Éste presenta un sinnúmero de características particulares que la posicionan en el primer lugar de las coníferas más plantadas a nivel mundial, como lo son: su gran crecimiento en climas tropicales, la facilidad de propagación y la versatilidad de su madera (Crecente-Campo, 2008).

La corteza, es la capa más externa del tronco, y está formada por los componentes típicos de la pared celular. Particularmente, las especies de pino contienen niveles significativos de extraíbles en la corteza y la biomasa aérea. En el reino vegetal se pueden distinguir cuatro grandes grupos de compuestos: sustancias fenólicas, terpénicas, azucaradas y nitrogenadas (Iglesias, 2009).

Dentro de este grupo se encuentran los compuestos polifenólicos, los que se subdividen en fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, flavonoides, poliflavonoides (taninos condensados), taninos hidrolizados (ácidos derivados), ligninas y lignanos; los cuales pueden aprovecharse en distintas áreas debido a actividades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (González y Rosales, 2003; Xiao *et al.*, 2016).

1.2 Polifenoles

Durante mucho tiempo, los compuestos polifenólicos fueron denominados genéricamente como “Materias tanoides o Taninos”, los cuales poseen características representativas en cuanto a olor y color. Además, estos compuestos son los que otorgan sabor amargo y la astringencia en muchas plantas (Calderón, 2002). Sin embargo, han adquirido un gran interés, no sólo por sus características organolépticas, sino también debido a sus propiedades químicas como su capacidad de enlazar proteínas y metales, y sus beneficios para la salud humana como antimicrobianos, antioxidantes y anticancerígenos (Méndez *et al.*, 2007).

Los polifenoles forman parte de los llamado metabolitos secundarios, los cuales se caracterizan por encontrarse en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios, se encuentran en todo el reino vegetal. Dentro de las características más predominantes de los metabolitos secundarios se encuentran la capacidad de proteger a las plantas de la ingestión por herbívoros, de la infección por patógenos microbianos, servir como atrayentes polinizadores y dispersadores de semilla y además servir como agentes en la competencia entre distintas plantas (Taiz y Zeiger, 2006).

Químicamente, los polifenoles son compuestos orgánicos bio-sintetizados, y se caracterizan por tener en su estructura molecular la presencia de al menos un grupo bencénico unido a grupos hidroxilos, los cuales derivan del aminoácido L-fenilalanina (Crozier *et al.*, 2013).

En particular, los taninos condensados e hidrolizables, forman parte de la mayoría de las sustancias orgánicas astringentes. Se encuentran en abundancia en la corteza y el tejido leñoso de los vegetales, especialmente, en la del Roble y el Pino. En general, se obtienen de árboles talados, teniendo en cuenta que si se recolectan muestras en primavera, la corteza se desprende con mayor facilidad (Lastra, 2001). Según Howes (1953), la abundancia de taninos en la corteza varía dependiendo de factores como la procedencia, la edad y la posición en el tronco. Además, Wrann (1988) determinó el contenido de taninos en cortezas de *P. radiata*, donde obtuvo

un porcentaje de hasta un 16% en muestras de la zona basal del árbol y de edad madura, entre 19 y 27 años.

Estos compuestos al ser provenientes de plantas se encuentran ampliamente difundidos en la naturaleza, jugando un papel importante dentro de las características organolépticas y sensoriales de la biomasa vegetal. Son susceptibles a sufrir modificaciones ya sea tanto por oxidación, como por complejaciones por metales y cambios debido a las modificaciones del pH. Según su estructura química se pueden subdividir en grupos relacionados (Rebolo, 2007).

Los taninos hidrolizables son poliésteres derivados de los glúcidos, que al ser tratados con ácido o enzimas, se separan en azúcares y en aglicona. Son estructuras principalmente de D-glucosa esterificada con ácidos hidroxifenólicos, mayormente ácidos gálico o elágico, produciendo galotaninos o elagotaninos, los cuales tienen una mayor diversidad estructural debido a la esterificación adicional de cadenas laterales y el acoplamiento oxidativo (Méndez *et al.*, 2007; Marcano y Hasegawa, 2002).

Los taninos condensados, también llamados proantocianidinas, son cadenas oligoméricas y poliméricas, basadas en unidades de flavonoides. Entre estos compuestos naturales, existen dos tipos abundantes: los que son formados por la condensación de unidades de catequina y epicatequina que se relacionan a la cianidina y que son conocidas como procianidinas, y aquellas en donde sus unidades monoméricas son la galocatequina y la epigalocatequina, que se asemejan a la delfidina y son conocidas como prodelfinidinas (Méndez *et al.*, 2007; Marcano y Hasegawa, 2002). A continuación, se presenta la estructura química de un monómero de tanino condensado abundante en especies de Pino (Figura 2).

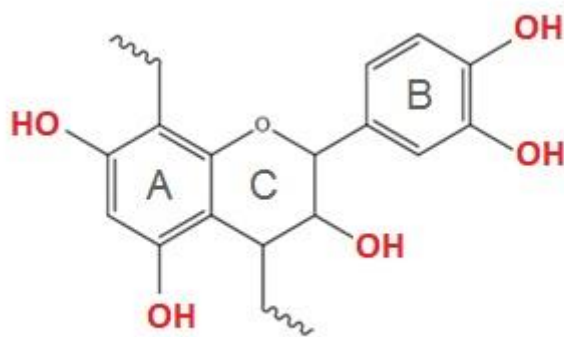


Fig 2. Estructura química de un monómero de tanino condensado (García, 2017).

En sentido general, los taninos condensados son más abundantes que los hidrolizables, se producen industrialmente en mayor cantidad y son más utilizados para el diseño de materiales bio-basados (Aguilar *et al.*, 2012).

1.3 Infecciones microbianas

Una de las complicaciones más graves en el ámbito de enfermedades infecciosas, es la microbiana, la cual se extiende a áreas como la medicina, farmacéutica, sanitaria, sistemas de purificación de agua, alimenticia, agrícola y textil. Debido a esto, los investigadores y las industrias buscan la forma de proporcionar calidad y seguridad de sus productos. Considerando este amplio rango de contaminación microbiana, las más preocupantes corresponden al área agrícola, alimenticia y biomédica, puesto que tienen directa relación con infecciones en seres humanos (Kenawy *et al.*, 2007).

En cuanto al área agrícola, la contaminación suele afectar a las plantas por patógenos como: bacterias, espiroplasmas, fitoplasmas, fitomonas, hongos, nematodos, virus y viroides los cuales pueden ser transmitidos por encontrarse en las semillas o parte del tejido que es utilizado para conservación o propagación, lo que influye directamente en la reducción de la producción (EMBRAPA-CNPSO, 1995).

Dentro de estos patógenos, las bacterias poseen una característica que se destaca por sobre los otros tipos de patógenos, que corresponde a su capacidad de

consumir una gran cantidad de sustrato en un período de tiempo reducido, lo que se ve potenciado por su velocidad de multiplicación y su actividad enzimática. El resultado de este tipo de infecciones se manifiesta generalmente por pudriciones blandas y acuosas (Ames, 1997).

En general, toda bacteria fitopatógena necesita algún grado de asociación con los hospedantes para su sobrevivencia en tiempos desfavorables. Esto se debe a que, ninguna de estas bacterias forman esporas, por lo que unas pocas sobreviven un corto tiempo en el suelo, en hojas caídas, en residuos de cosechas, en semillas, en órganos de propagación y en raíces de hospedantes silvestres; mientras que otras pocas, como *E. carotovora* y *Agrobacterium tumefaciens*, son capaces de permanecer en el suelo por varios años (González, 1976).

En el ámbito alimenticio, las enfermedades por transmisiones de este tipo han ido en aumento con el paso de los años favoreciendo el surgimiento de patógenos nuevos o cepas más agresivas y resistentes a los antibióticos; siendo una amenaza para la salud pública a nivel mundial y una causa importante de morbilidad del ser humano (Cabrera *et al.*, 2007).

En este sentido, hay que considerar que bacterias como *Arthrobacter* sp., que si bien sólo se encuentra en el suelo, podría ser transmitida a las plantas. Esto es de vital importancia porque en las transmisiones vía aérea, influye directamente la climatología de los lugares en donde se encuentran las plantas infestadas, hecho que se ha comprobado durante períodos húmedos, donde la vegetación suele liberar una mayor carga de bacterias (provenientes de la filósfera) a la atmósfera, en comparación con el suelo (Rosas *et al.*, 2004).

Este fortalecimiento, ha logrado la propagación de estas bacterias tanto en plantas como en alimentos, aumentando así, la probabilidad de que las personas adquieran dichas infecciones. Dentro de las más mencionadas con respecto a su evolución y resistencia frente a antibióticos, antisépticos y desinfectantes están *S. aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* y *L. monocytogenes* (Cabrera *et al.*, 2007).

Por último, en el ámbito biomédico, la transmisión por infecciones microbianas de patógenos, al igual que en la industria alimenticia, ha aumentado su frecuencia. Estos tipos de contagio son también llamados “infecciones nosocomiales”, las cuales son consideradas como las que se adquieren con motivo de una larga estancia en un hospital, sin ser parte del diagnóstico con el que el paciente ingresó al centro hospitalario. La frecuencia de infecciones de este tipo, varía dependiendo de factores como el tamaño del hospital, las áreas de este, el tipo de pacientes, la variabilidad de la instrumentación, las medidas preventivas, entre otros (Ausina y Moreno, 2005).

En base al desarrollo mencionado, se ha hecho común la práctica y el uso de la medicina herbal, en donde la utilización de plantas se ha ido incrementando significativamente, por sus distintas propiedades positivas en cuanto a la actividad antimicrobial. Esto ha favorecido a muchas culturas alrededor del mundo debido a los altos costos de la industria de la medicina, a la crisis económica, a la ineficiencia de los servicios públicos y el acceso a ellos, además de la comercialización de las empresas farmacéuticas (Konaté *et al.*, 2012).

1.3.1 Bacterias patógenas. Gram + y Gram -

Dentro de las muchas bacterias consideradas patógenas en los distintos ámbitos, *E. coli*, es una de las consideradas como emergentes. Esta ha obtenido la mayor atención y es en la cual se han dirigido la mayor parte de las investigaciones, puesto que ha sido reconocida como una de las principales causas de enfermedades humanas desde su descubrimiento, una de las causas significativas de morbilidad y mortalidad, y se reconoce como un indicador del estado higiénico de los alimentos (Soto, 2016).

Sin embargo, hasta este momento, sigue siendo un desafío para la seguridad alimenticia puesto que contiene una amplia diversidad de tipos dentro de la especie, las cuales, además, son capaces de mutar y ser aún más resistentes que la cepa anterior (Rojas-Herrera y González-Flores, 2006).

La tabla 1 muestra la primera parte de las principales bacterias patógenas encontradas en alimentos, en la industria agrícola y biomédica, con las enfermedades que producen y el origen o posibles productos portadores.

Tabla 1. Principales bacterias patógenas (Parte I).

Microorganismo	Trastorno	Origen
<i>Arcobacter</i> sp. (G-)	Diarrea, bacteremia	Carne de aves.
<i>Arthrobacter</i> sp. (G+)	-	Suelo.
<i>Bacillus cereus</i> (G+)	Diarrea, vómitos	Arroz especias, productos lácteos, y cárnicos.
<i>Campylobacter</i> sp. (G-)	Diarrea	Carne de aves, cerdo y res, leche cruda.
<i>Clostridium botulinum</i> (G+)	Botulismo, vómitos	Pescado, miel, alimentos enlatados.
<i>Clostridium perfringens</i> (G-)	Diarrea dolor abdominal	Carne de res y aves, salsas.
<i>Enterococcus faecium</i> (G+)	Meningitis	Intestino humano.
<i>Erwinia Carotovora</i> (G-)	Piedra negra y pudrición blanda	Plantas y tubérculos.
<i>Escherichia coli</i> (G-)	Diarrea Colitis, hemorragia, síndrome hemolítico-urémico	Carne de res, y productos lácteos.

Fuente: Rojas-Herrera y González-Flores (2006)

La tabla 2 muestra la segunda parte de las principales bacterias patógenas encontradas en alimentos, en la industria agrícola y biomédica, con las enfermedades que producen y el origen o posibles productos portadores.

Tabla 2. Principales bacterias patógenas (Parte II).

Microorganismo	Trastorno	Origen
<i>Klebsiella</i> sp. (G-)	Neumonía, infecciones vesicales, renales, bacteremia, inflamación al colon.	Hospitales y centros de atención.
<i>Listeria</i> sp. (G+)	Listeriosis	Paté, leche, queso suave, carne, mariscos, ensalada de col
<i>Salmonella</i> sp. (G-)	Gastroenteritis	Carne de res y aves, leche, huevos crudos.
<i>Shigella</i> sp. (G-)	Disentería bacilar, fiebre, calambres	Mayonesa, vegetales crudos, leche, aves, productos lácteos.
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	Intoxicación estafilocócica	Leche cruda.
<i>Vibrio cholerae</i> (G-)	Cólera	Ostras crudas, pescado.
<i>Yersinia enterocolítica</i> (G-)	Yersiniosis	Leche o agua contaminada, tofu, canales de cerdo.

Fuente: Rojas-Herrera y González-Flores (2006)

De esta lista, las bacterias más mencionadas suelen ser *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. y *Vibrio cholerae*. Sin embargo, todas estas son provenientes, mayoritariamente, de alimentos que forman parte de la vida cotidiana. Es por esto que la preocupación sobre infecciones causadas por patógenos, es de vital importancia y es por lo que se han desarrollado diversos métodos bacteriológicos para detectar la existencia de contaminación de agua y productos alimenticios (Stanier *et al.*, 1992).

1.3.2 Diferencias entre paredes celulares bacterianas

Una célula bacteriana típica, presenta distintas estructuras fuera y dentro de la pared celular, como las estructuras externas (los flagelos, los pili y la cápsula), las

cuales varían dependiendo del tipo de bacteria y de las condiciones en las que estas se cultiven. Sin embargo, existe una estructura que permite diferenciar las bacterias al realizarles Tinción Gram, logrando un color característico dependiendo del tipo de bacteria (Raviña, 2008).

Esta diferencia de estructura, las divide en Gram positivas, y Gram negativas, y gracias a la técnica de Tinción desarrollada por Christian Gram en 1884, las primeras se tiñen de un color violeta intenso, y las segundas, de color rojo (García, 2004).

A continuación, en la figura 3 se observa la complejidad arquitectónica de la pared celular para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

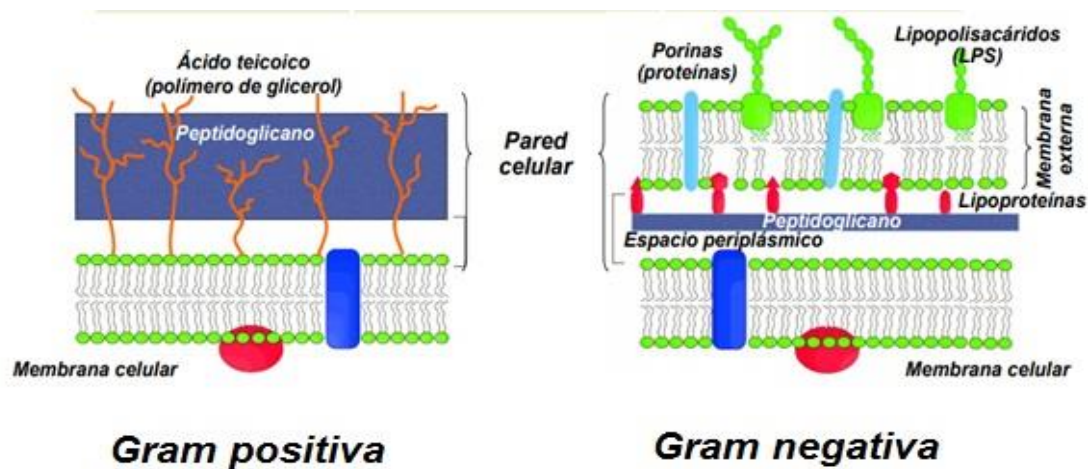


Fig 3. Estructura de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas (García, 2004).

Es debido a esta estructura, que las bacterias Gram negativas suelen tener una mayor influencia en la resistencia de antibióticos, sobre todo a los que actúan sobre la pared de peptidoglicanos, siendo este el punto débil de las bacterias Gram positivas. Es por eso, que en bacterias Gram positivas al estar la pared más expuesta, suelen ser más susceptibles a tratamientos con antibióticos; mientras que las bacterias Gram negativas, tienen una pared más delgada, y que se encuentra entre dos membranas que dificultan el acceso de antibióticos. Esta particularidad no implica que exista una mayor o menor efectividad de un antibiótico frente a estos dos tipos de bacterias, puesto que a pesar de que la pared está más expuesta en

las Gram positivas, aun así tiene la capacidad de ejercer un efecto protector o de resistencia frente a numerosos antibióticos, los cuales necesariamente tienen que atravesar esta estructura para poder llegar al interior de la bacteria y producir el efecto antibacteriano (Mora, 2012).

En particular, la Tinción Gram, tiñe el frotis fijado al calor, con un colorante (Cristal violeta), para luego lavarlo con agua y tratarlo sucesivamente con una solución de lugol, un agente decolorante como alcohol, o una mezcla de alcohol y acetona, para finalmente darle contraste con un colorante como la Safranina. No obstante, no es la única diferencia entre Gram positivas y Gram negativas, sino que también tiene diferencias bioquímicas y morfológicas, como el hecho de que todas las bacterias que poseen flagelos polares son Gram negativas (García, 2004; Reviña, 2008).

1.3.1.1 *Staphylococcus aureus* (G +)

Las bacterias del género *Staphylococcus* son bacterias Gram positivas. Morfológicamente, son de forma esférica (cocos); de 0,5 a 1,5 μm de diámetro y que se agrupan de forma irregular como racimos (Figura 4). El crecimiento de *S. aureus* en agar con infusión cerebro-corazón (BHI) se puede apreciar en la figura 5. En medios de cultivos no selectivos, la mayoría de las especies crecen después de 18-24 horas de incubación formando colonias lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros de 1 a 3 mm de diámetro (Pahissa, 2009).

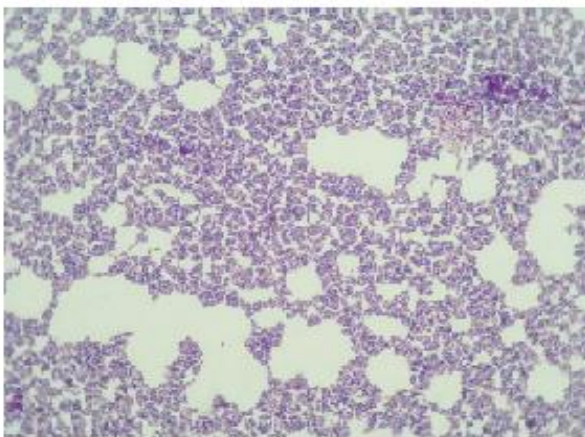


Fig 4. Tinción Gram de *S. aureus* agrupado en racimos irregulares (Vázquez et al., 2010).



Fig 5. Crecimiento de *S. aureus* en agar BHI (Fuente: Propia).

La principal característica que diferencia a *S. aureus* de las demás especies de estafilococos es la producción del enzima coagulasa, que permite a la bacteria coagular plasma. Son bacterias muy resistentes al calor y la desecación; además de que poseen una capacidad especial para crecer en medios con elevada salinidad (7,5% de NaCl). Son inmóviles y no forman esporas, y aunque generalmente no poseen cápsula, en raras excepciones son anaerobias facultativas (Pahissa, 2009).

1.3.1.2 *Escherichia coli* (G-)

Esta bacteria es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. En la figura 6 se observa la morfología de *E. coli* una vez realizada la Tinción Gram, mientras que la figura 7, muestra el crecimiento de la bacteria en agar MacConkey (Rodríguez-Ángeles, 2002).

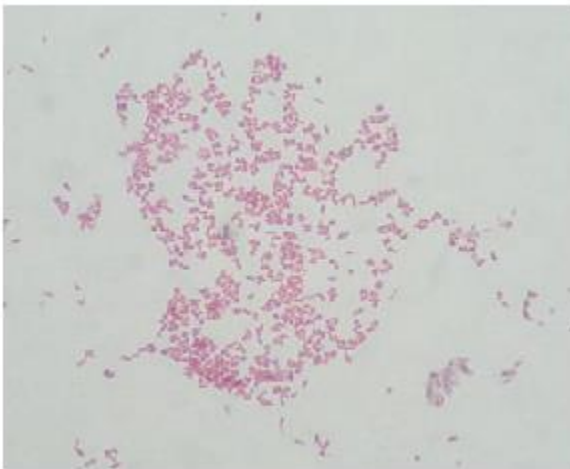


Fig 6. Tinción Gram de *E. coli*
(Vázquez *et al.*, 2010).



Fig 7. Crecimiento de *E. coli* en
agar MacConkey (Fuente: Propia).

E. coli se caracteriza por colonizar el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, considerándose un microorganismo de flora normal, excepto algunas cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos. Es considerada una de las bacterias patógenas más complejas en cuanto a su resistencia, pues tiene la facultad de mutar con facilidad, es decir, dependiendo del antibiótico que se utilice con ella en los análisis antimicrobianos en la actualidad,

estas cepas podrán mutar para los análisis antimicrobianos posteriores (Rodríguez-Ángeles, 2002).

1.3.1.3 *Listeria monocytogenes* (G+)

Al realizarle la Tinción Gram a esta bacteria, estamos en presencia de un bacilo Gram positivo corto, regular, no esporulado (figura 8), que crece con facilidad en medios enriquecidos con sangre de cordero, tras 18 a 24 horas de incubación en aerobiosis. Las colonias son pequeñas, blanco grisáceas y presentan hemolisis que excede escasamente el borde de la colonia, puede ser confundida con *Streptococcus agalactiae*. Su crecimiento en agar Oxford presenta halos de color negro alrededor de cada colonia, como se muestra en la figura 9 (Benadof, 2008).

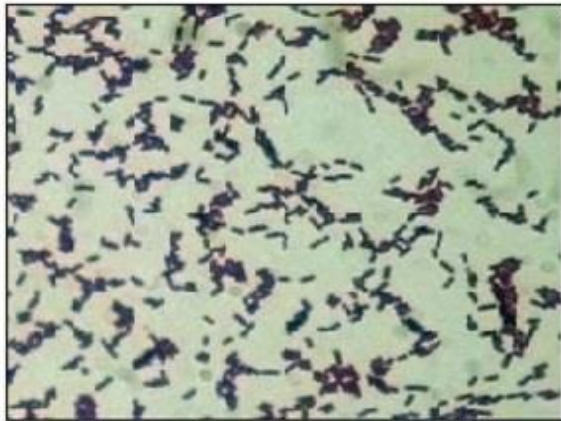


Fig 8. Tinción Gram de *L. monocytogenes* (Benadof, 2008).

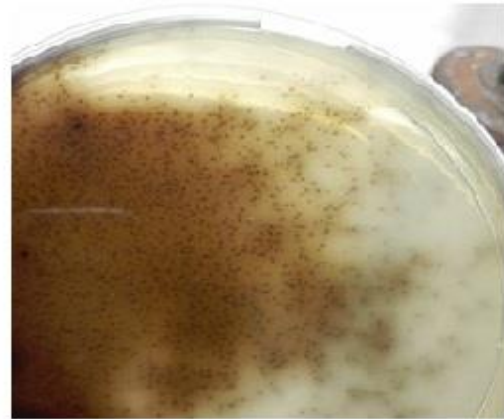


Fig 9. Crecimiento de *L. monocytogenes* en agar Oxford (Fuente: Propia).

Las enfermedades causadas por *L. monocytogenes* son producidas por el consumo de alimentos contaminados con este microorganismo. Afecta principalmente a mujeres embarazadas, especies reactivas de nitrógeno (RNs) y huéspedes inmunodeprimidos. Esta bacteria puede ser aislada del suelo, agua, vegetales y contenido fecal de una amplia gama de animales. Es capaz de producir biofilm en alimentos, crece a temperaturas de refrigeración, resiste condiciones adversas de pH y altas concentraciones de NaCl (Benadof, 2008).

1.3.1.4 *Shigella* sp. (G-)

Esta bacteria forma parte de la familia Enterobacteriaceae. Morfológicamente, se presenta como bacilos cortos Gram negativos sin formar agrupación, y miden entre 0,7µm y 3µm. Son bacterias inmóviles, que no esporulan, ni forman cápsula. Crece en condiciones aerobias luego de 24 hrs a 35°C, formando colonias blanquecinas o grisáceas de 1 a 2 mm de diámetro. Particularmente, forma colonias rojas en agar XLD (Xilosa, lisina, desoxicolato) o VB (Verde brillante), y colonias amarillas en agar MacConkey y agar SS (Salmonella-shigella). A continuación, se muestra en la figura 10 su morfología, mientras que en la figura 11 se observa el crecimiento en agar XLD (Zaidi y Estrada, 2014).

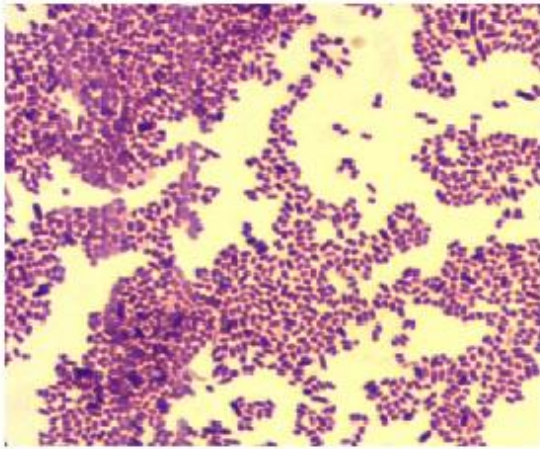


Fig 10. Tinción Gram de *Shigella* sp. (Pisabarro, 2008).



Fig 11. Crecimiento de *Shigella* sp. en Agar XLD (Pisabarro, 2008).

Esta bacteria es altamente enteroinvasiva, puesto que su hábitat es el colon y su principal reservorio, es el humano. Puede transmitirse a partir de contacto directo o indirecto con heces de personas infectadas (Zaidi y Estrada, 2014).

1.3.1.5 *Enterococcus faecium* (G+)

Morfológicamente, son cocos Gram positivos, los cuales pueden encontrarse aislados, en pares o formando cadenas cortas. Son catalasa negativa y anaerobios facultativos. Son capaces de crecer en presencia de NaCl al 6,5%, con temperaturas

entre 10°C y 45°C aunque su temperatura óptima es de 35°C, y con un pH de hasta 9,6. Particularmente, en agar sangre crece dentro de 24 hrs con colonias de entre 0,5 y 1 mm, que a menudo presentan color opaco y blanco como puede verse en la figura 13, mientras que en la figura 12 se puede observar su Tinción Gram (Acosta-Gnass, 2011).



Fig 12. Tinción Gram de *E. faecium* (Flores y Albarado, 2009).



Fig 13. Crecimiento de *E. faecium* en agar Sangre (Armijo, 2011).

Estas bacterias forman parte de la flora normal del tracto gastrointestinal, tanto en humanos como en animales, particularmente, *E. faecalis* y *E. faecium*. Sin embargo, están entre un grupo de doce especies de *Enterococcus* que son clínicamente importantes (Acosta-Gnass, 2011).

1.3.1.6 *Arthrobacter* sp. (G+)

La propiedad más sobresaliente de *Arthrobacter* sp. es la sucesión de cambios en la forma celular que acompañan al crecimiento. En cultivos que han entrado en la fase estacionaria las células son esféricas y de tamaño uniforme, semejante a los micrococcos. Cuando el crecimiento se reinicia, estas células se alargan hasta formar bacilos originando, finalmente, formas ramificadas (Stainer *et al.*, 1992). A continuación, se observa la Tinción Gram (Figura 14) y el crecimiento de *Arthrobacter* sp. en agar sangre (Figura 15).

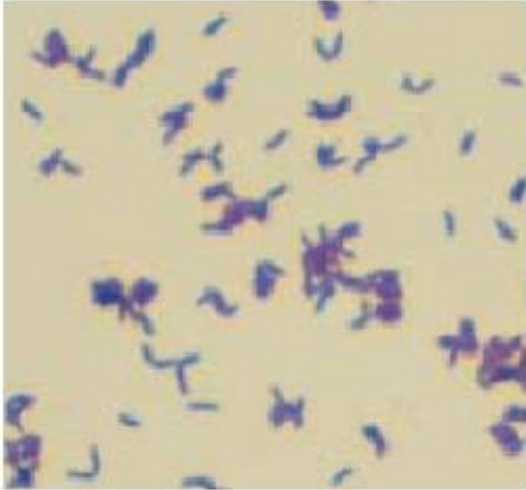


Fig 14. Tinción Gram de *Arthrobacter* sp. (Barrios, 2015).



Fig 15. Crecimiento de *Arthrobacter* sp. en agar Sangre (Barrios, 2015).

Los organismos del género *Arthrobacter* representan una amplia fracción de la población bacteriana de quimioheterótrofos aeróbicos presentes en el suelo, y son agentes importantes en la mineralización de la materia orgánica. En sus propiedades nutricionales *Arthrobacter* muestra interesantes analogías con las pseudomonas aeróbicas; la mayoría de las especies pueden utilizar una amplia y variada gama de compuestos orgánicos sencillos como fuente principal de carbono y energía (Stainer *et al.*, 1992).

1.3.1.7 *Klebsiella* sp. (G-)

El segundo género de gran importancia en la familia Enterobacteriaceae es *Klebsiella*, con *Klebsiella pneumoniae* como la especie más estudiada. Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son generalmente facultativas anaeróbicas, con un rango de 0,3 a 1 μm de ancho y 0,6 a 6,0 μm de longitud, de forma bacilar, Gram negativas, inmóviles y usualmente desarrollan una cápsula que actúa como factor determinante en la virulencia de la bacteria (González *et al.*, 2013). Su morfología está representada en la Tinción Gram de la figura 16 y su crecimiento en agar MacConkey en la figura 17.

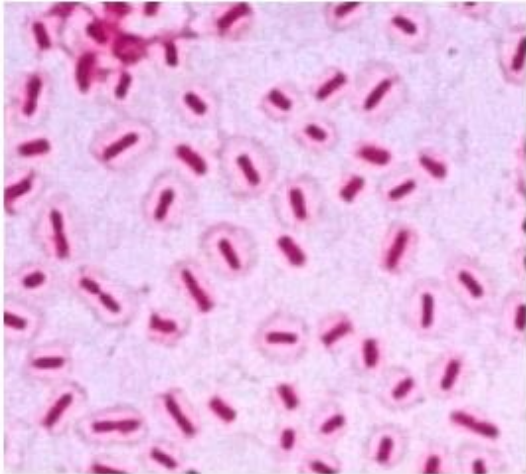


Fig 16. Tinción Gram de *Klebsiella* sp (Pisabarro, 2008).



Fig 17. Crecimiento de *Klebsiella* sp. en agar MacConkey (Pachón, 2009).

K. pneumoniae es la especie más estudiada y de mayor relevancia clínica, porque desempeña un papel importante como agente etiológico de enfermedades infecciosas oportunistas, además está ampliamente esparcida en el ambiente, y presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos, mientras que en los seres humanos coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal (Vargas y Echeverri, 2010).

1.3.1.8 *Erwinia carotovora* (G-)

Es un patógeno vegetal enterobacteriano Gram negativo y el agente etiológico de las enfermedades de pudrición blanda, que tiene forma de bastones móviles. Las condiciones ambientales más favorecedoras para la permanencia de esta bacteria en las plantas son la presencia de agua, debido a que gracias a ésta puede movilizarse con facilidad a través de los tejidos de las plantas, baja disponibilidad de oxígeno, siendo así un patógeno microaeróbico, y la temperatura adecuada, que va desde los 27°C a los 37°C, dependiendo de la especie (Rocha *et al.*, 2006). En las figuras 18 y 19, se presenta la morfología en Tinción Gram y el crecimiento en agar MacConkey, respectivamente.



Fig 18. Tinción Gram de *Erwinia carotovora* (Barrios, 2015).



Fig 19. Crecimiento de *Erwinia carotovora* en agar MacConkey (Barrios, 2015).

Al ser un patógeno vegetal, durante la invasión del tejido, produce una variedad de enzimas que incluyen celulasas, proteasas y una amplia gama de petinasas destinadas a digerir enzimáticamente la pared celular de la planta. Dentro de sus principales hospederos y que es de vital importancia comercial, se encuentra la papa, causando pudrición tanto en el tubérculo como en la planta (England *et al.*, 1999).

1.4 Agentes antimicrobianos. Generalidades.

Se conoce como agente antimicrobiano a una sustancia producida por microorganismos o sintetizada químicamente, que en bajas concentraciones, puede inhibir, e incluso, destruir microorganismos infecciosos, sin producir efectos tóxicos en el huésped (Lorenzo *et al.*, 2015). Cuando los agentes son utilizados, en el sector agrícola o alimenticio deben poseer características mecánicas que garanticen adhesividad a los alimentos, manipulación evitando el deterioro y ser neutros con respecto al color tacto y olor (Figuroa *et al.*, 2011).

Según su origen, los agentes antimicrobianos se pueden clasificar en: (1) agentes de origen animal, los que incluyen proteínas, enzimas líticas, hidrolasas y polisacáridos; (2) agentes de origen vegetal, los que incluyen compuestos fenólicos,

alcaloides y terpenos que provienen de la corteza, tallos, hojas y flores y (3) agentes de origen microbiano, los que incluyen compuestos producidos por los mismos microorganismos (Beuchat, 2001; Davidson y Zivanovic, 2003).

Los ácidos orgánicos y ésteres, sulfitos, especias y hierbas, oleorresinas, aceites esenciales (ajo, orégano, pimienta negra), extracto de canela, aldehídos y derivados, polisacáridos, y compuestos fenólicos, son considerados como las distintas clases de agentes antimicrobianos naturales. En particular, los ácidos fenólicos están presentes en partes de plantas que son usadas como especias, dentro de los que se pueden encontrar los ácidos cafeico, clorogénico, p-cumárico y ferúlico. Muchos de estos compuestos, pueden retardar la invasión microbiana, así como también retardar la putrefacción en frutas y vegetales (Davidson, 1997; Beuchat, 2001).

Los derivados del ácido hidroxicinámico han logrado producir efectos de sensibilidad, tanto en bacterias Gram positivas, como negativas, hongos y levaduras. Además de los ya mencionados, otros compuestos como los poliflavonoides y el ácido tánico, también han demostrado tener actividad antimicrobiana, éste último resultando ser inhibitorio para *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *A. hydrophyla* y *S. faecalis* (Beuchat, 2001; Raybaudi *et al.*, 2006).

1.4.1 Uso de agentes antimicrobianos

En el sector agrícola, los agentes naturales han sido desarrollados principalmente con el fin de utilizarse como antimicrobianos, antioxidantes o nutrientes, para restringir la pérdida de humedad, reducir la absorción de Oxígeno disminuyendo así su tasa respiratoria, además de las pérdidas postcosecha. Estos agentes se han implementado como recubrimiento comestible de productos hortofrutícolas en base a, por ejemplo, propóleo, siendo sus principales componentes resinas y bálsamos las cuales están compuestas por flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos y sus ésteres, ceras, aceites esenciales, polen y compuestos orgánicos (Figuroa *et al.*, 2011).

Debido a que en la industria alimenticia es donde se encuentran la mayor cantidad de bacterias patógenas, así como también, el hecho de que ha ido en aumento la tendencia de los consumidores en demandar alimentos mucho más naturales y con la menor cantidad de procesamientos y adición de conservadores sintéticos; el uso de agentes antimicrobianos naturales ha sido fundamental, considerando que deben ser inocuos y deben cumplir con los parámetros de calidad y normativas de seguridad correspondientes (Delves-Broughton, 2005; Pilet y Leroi, 2011). Según Cleveland *et al.* (2001) estos agentes pueden ser aplicados en alimentos como cultivos iniciadores, aplicados directamente en el producto o como un ingrediente en la elaboración (aditivo).

En general, lo que se busca al utilizar agentes antimicrobianos naturales, es prologar la vida útil de los alimentos, procurando su mejor estado de conservación, evitando algún nivel de daño al ser humano (Naidu *et al.*, 2006; Beshkova y Frengova, 2012).

En el ámbito biomédico, los compuestos fenólicos son utilizados como agentes de uso tópico, usualmente, como agente desinfectante, en los que su actividad depende de la concentración y la especie a tratar. En general, estos compuestos son más efectivos sobre bacterias Gram positivas, que Gram negativas, y se caracterizan por destruir la pared y la membrana celular e inactivar los sistemas enzimáticos, y suelen ser tanto bactericidas, como bacteriostáticos (Estrela *et al.*, 2009). Además, son utilizados como esterilizantes, antisépticos y quimioterápicos (Lorenzo *et al.*, 2015).

1.4.2 Ácidos carboxílicos como antimicrobianos.

La efectividad de un ácido carboxílico como agente antimicrobiano depende de dos factores: su hidrofobicidad y el grado de ácido no disociado. En la mayoría de los casos, la efectividad antimicrobiana mejora con la hidrofobicidad. Dentro de los ácidos acético, benzoico, fumárico, láctico, propanoico y sórbico, los más potentes son el ácido benzoico y sórbico, a los que le siguen el ácido fumárico y propanoico, mientras que los menos eficaces resultan ser el ácido acético y láctico. Los ácidos

tartárico, cítrico y málico son los menos hidrófobos por lo que son los menos efectivos como agentes antimicrobianos. La hidrofobicidad es importante porque la pared celular microbiana normalmente contiene material lipídico, con el que los ácidos orgánicos hidrofóbicos pueden interactuar, y provocar la interrupción de la actividad microbiana (Figura 20) (Cherrington *et al.*, 1991).

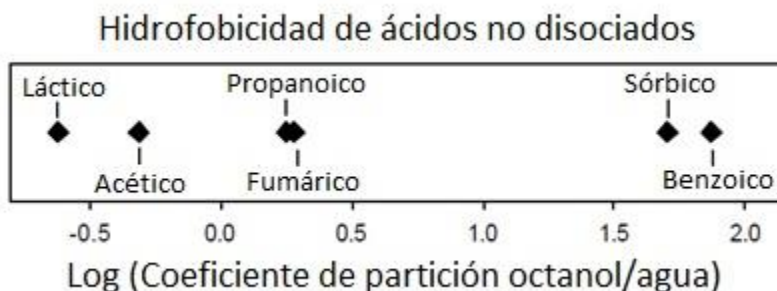


Fig 20. Esquema de hidrofobicidad de ácidos no disociados (Cherrington *et al.*, 1991).

Asimismo, el nivel de ácido completamente no disociado es el segundo factor que influye en la efectividad de un ácido orgánico como agente microbiano. Este nivel puede predecirse a partir del pKa1. Los ácidos son agentes antimicrobianos más efectivos a pH más bajos porque el nivel del ácido no disociado aumenta a medida que disminuye el pH, es decir, los ácidos disociados son menos efectivos porque son menos hidrofóbicos (Cherrington *et al.*, 1991).

Es por ello que cualquier modificación química a polifenoles u otros compuestos con agentes que provean un grupo funcional de ácido carboxílico pudiera constituir una estrategia para aumentar el poder antimicrobiano (Cherrington *et al.*, 1991).

1.5 Análisis antimicrobianos

Existen distintos tipos de análisis antimicrobianos, los cuales también son llamados análisis de sensibilidad bacteriana o antibiograma. Dentro de este análisis se encuentra el de Contacto directo, el cual, según Reyes-Jurado *et al.* (2014), está subdividido en las siguientes categorías:

1.5.1 Contacto directo

1.5.1.1 Dilución en agar

Este método es utilizado para determinar si el antibiótico es letal contra algún microorganismo, siendo utilizado en organismos tanto aeróbicos como microaerofílicos con velocidades variables de crecimiento. De esto, se obtiene la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (García *et al.*, 1993).

1.5.1.2 Dilución y micro dilución en caldo

Este método se lleva a cabo en tubos o pocillos con medios líquidos (caldos), que contienen concentraciones crecientes de antibiótico, y a los cuales se les inocula una concentración determinada de bacteria. De este ensayo se obtendrá la CMI, en base a la turbidez de los tubos, y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), en base al crecimiento en las placas (Prats, 2006).

1.5.1.3 Difusión en agar (Método de Kirby-Baüer)

Éste método, también conocido como difusión por discos, considera la incorporación del antibiótico en discos de papel filtro o bien, perforando el agar, añadiendo en las perforaciones un volumen determinado del antibiótico potencial. De esto se obtiene la CMI del antibiótico (Bernal y Guzmán, 1984).

1.5.1.4 Sembrado en espiral

Es utilizado para enumerar células en suspensión. No obstante, también se utiliza para la determinación de la CMI de algunos agentes antimicrobianos. Es un método que ha tenido bajo impacto en la determinación de actividad antimicrobiana y de la CMI (Reyes-Jurado *et al.*, 2014).

1.5.2 Medios de cultivo

Para aislar o identificar una especie bacteriana y diferenciarla de otras con las que pudiera confundirse morfológicamente, se necesita obtener cultivos que nos permitan realizar cada una de las distintas acciones con claridad. No obstante, existen diversos factores que afectan el desarrollo óptimo de un microorganismo en

estos medios de cultivos, dentro de los cuales se encuentran la disponibilidad de nutrientes, la existencia de Oxígeno, la humedad apropiada, el pH adecuado, la temperatura de incubación y las condiciones de esterilidad (García *et al.*, 1993).

1.5.3 Clasificación de medios de cultivo

Los medios de cultivos utilizados en microbiología, pueden clasificarse según su composición y consistencia (Tabla 3), y según su utilización (Tabla 4).

Tabla 3. Clasificación de medios de cultivo (Parte I).

Composición	Definidos	Se conoce con exactitud la identidad de las sustancias que lo integran.
	Indefinidos	Son más utilizados que los definidos, pero es difícil establecer su composición, debido a la naturaleza compleja de las sustancias que lo integran.
Estado Físico	Líquidos	Favorecen el desarrollo y el crecimiento de bacterias, puesto que, al difundirse tienden a encontrar con mayor facilidad las sustancias que necesitan para nutrirse.
	Sólidos	Dificultan el crecimiento de las bacterias, puesto que tienden a agotar más fácilmente los nutrientes.
	Semisólidos	Son usualmente utilizados para el estudio de propiedades bioquímicas.

Fuente: García *et al.* (1993)

Tabla 4. Clasificación de medios de cultivo (Parte II).

Aplicación	Generales	Apropiados para la mayoría de los microorganismos por la facilidad de desarrollo en ellos.
	Enriquecidos	Contienen nutrientes ricos que permiten el crecimiento de las bacterias difíciles de cultivar.
	Especiales o Específicos	Están dirigidos a determinadas especies bacterianas, y son utilizados para diferenciar una especie de otras.
	Selectivos	Contienen componentes que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos, pudiendo aislar a una especie bacteriana de otra.

Fuente: García et al. (1993)

Además de las clasificaciones ya mencionadas, las cuales son consideradas las más frecuentes, dentro de los medios de cultivo también podemos encontrar: Medios de recuento, que son utilizados para determinar el contenido bacteriano de ciertas sustancias (agua, leche, carne), a través del conteo de colonias resultante del sembrado de la muestra, aplicando finalmente operaciones matemáticas para obtener el resultado en Unidades Formadoras de Colonias (UFC); y Medio de transporte, que se utilizan para asegurar la viabilidad de las bacterias, procurando evitar que se reproduzcan alterando el número inicial de ellas, desde que se toma la muestra hasta que se siembra (Montoya, 2008).

1.6 Métodos de control de bacterias patógenas

Los métodos de control son variados; sin embargo, uno de los más utilizados es la producción de metabolitos secundarios, los cuales son capaces de actuar específicamente frente a otras bacterias, de amplio espectro, o de bacteriocinas activas frente a microorganismos de un cierto género o especie. Luego de este método, le sigue la producción de sideróforos o quelantes de hierro (Jacas *et al.*, 2005).

En otros casos se seleccionan microorganismos capaces de competir por el espacio y los nutrientes con la bacteria patógena. Además, uno de los mecanismos menos utilizados, pero con mayor interés en la actualidad, es la inducción de resistencia sistémica, puesto que se ha comprobado que ciertas bacterias son capaces de inducirla, teniendo así un espectro más o menos amplio de actuación (Baker y Cook, 1974).

En base a la información obtenida por medio de referencias bibliográficas, y considerando cada uno de los antecedentes obtenidos en previas investigaciones sobre agentes antimicrobianos naturales, se estudió la actividad antimicrobiana de poliflavonoides y sus derivados provenientes de la corteza de *P. radiata*, frente a distintas bacterias patógenas, con el fin de proporcionar información sobre el efecto de estos poliflavonoides y sus derivados modificados en un grupo de bacterias representativas del sector agrícola, alimenticio y biomédico.

HIPÓTESIS

Los poliflavonoides de corteza de *Pinus radiata* y sus derivados modificados por esterificación e hidroxipropilación, actúan como agentes antimicrobianos sobre bacterias de alta prevalencia y patogenicidad en el sector agrícola, el alimenticio y el biomédico.

OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

Determinar la influencia de poliflavonoides de corteza *P. radiata* y de sus derivados modificados, en el comportamiento de especies bacterianas patógena.

3.2.- Objetivos Específicos

- Determinar el comportamiento de especies bacteriana a poliflavonoides formulados en diferentes concentraciones en medio líquido.
- Estudiar el crecimiento bacteriano en soluciones de poliflavonoides a concentración y tiempo fijo.
- Evaluar el comportamiento bacteriano (crecimiento) frente a poliflavonoides nativos y modificados, inmovilizados en matrices poliméricas termoplásticas.

METODOLOGÍA

Los análisis fueron realizados en el laboratorio de Fitoquímica y el Laboratorio de Microbiología pertenecientes a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, donde se realizó la preparación de soluciones de poliflavonoides y análisis microbiológico, respectivamente. Los taninos con los cuales se trabajó, fueron proporcionados por la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT) de la Universidad de Concepción, mientras que los materiales necesarios para los análisis microbiológicos, fueron proporcionados por la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción.

En el caso de las bacterias, estas fueron proporcionadas por las siguientes organizaciones: *L. monocytogenes* por el Departamento de Bioprocesos del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción; *E. coli* y *S. aureus* por la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción; *E. carotovora*, *Arthrobacter* sp., *Klebsiella* sp., *E. faecium* y *Shigella* sp. por el Departamento de Química del Centro de Biotecnología “DAL” de la Universidad Técnica Federico Santa María de Valparaíso.

En este trabajo se realizaron tres experimentos: (1) se estudió la actividad antimicrobiana de poliflavonoides de corteza de *P. radiata* (Tanino soluble y Tanino insoluble) y de sus derivados modificados (Itacónico, Citracónico y Maleico), frente a *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Dilución en caldo), (2) se evaluó el comportamiento de *L. monocytogenes*, *Klebsiella* sp., *E. carotovora*, *Arthrobacter* sp., *E. faecium* y *Shigella* sp frente a los mismos poliflavonoides en medio líquido (Difusión en agar), (3) se investigó la actividad antimicrobiana del tanino insoluble, el derivado a base de anhídrido Maleico, Citracónico e Itacónico y el derivado hidroxipropilado inmovilizados en matrices termoplásticas sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, *Klebsiella* sp., *E. carotovora*, *Arthrobacter* sp., *E. faecium* y *Shigella* sp.

4.1 Características de los poliflavonoides y sus derivados

A continuación, en la figura 21, se tiene la estructura del tanino condensado (anillo B), y la estructura de los taninos modificados.

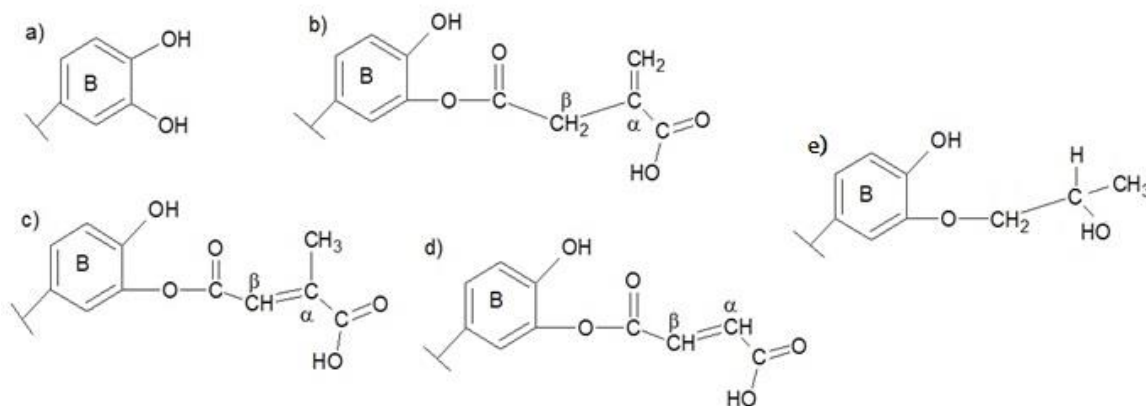


Fig 21. Estructura de la unidad de Catecol del tanino condensado y los taninos modificados. (a) Tanino condensado; (b) tanino modificado derivado de anhídrido Itacónico; (c) tanino modificado derivado de anhídrido Citracónico; (d) tanino modificado derivado de anhídrido Maleico; (e) tanino modificado por hidroxipropilación con óxido de propileno (Fuente: Gayoso, 2018).

Estos derivados obtenidos a través de procesos de modificación química, han mostrado ser versátiles para el diseño de materiales como: resinas termofijas y termoplásticas, hidrogeles y composites. Estos derivados, tienen tendencia a ser mucho más reactivos que los taninos condensados nativos (García *et al.*, 2016).

Además de esto, se seleccionaron los anhídridos Maleico, Itacónico y Citracónico debido a que el primero es uno de los reactivos de mayor uso en la industria de polímeros, el segundo deriva de la fermentación de la biomasa y constituye una alternativa atractiva para el desarrollo de materiales a base de recursos naturales, mientras que el tercero deriva de cítricos y puede ser considerado un reactivo eco-amigable en el contexto del aprovechamiento y la utilización de derivados de biomasa vegetal (Gayoso, 2018).

Por otra parte, la hidroxipropilación con óxido de propileno es una reacción comúnmente utilizada para otorgar propiedades específicas a compuestos provenientes de biomasa lignocelulósica y es muy conveniente cuando se pretende incorporar polifenoles a matrices termoplásticas, considerando que estos derivados no son solubles en soluciones acuosas (García, 2014).

4.2 Extracción de los poliflavonoides

La extracción de poliflavonoides (TI y TS), los que corresponden al tanino insoluble y soluble, respectivamente, se realizó de la corteza de *P. radiata* en condiciones de planta piloto. La extracción de TI y TS, se realizó mediante una mezcla de etanol agua en proporción 1:20 p/v, en un reactor de acero inoxidable de fabricación cónica de 800 L, a 120°C. El tanino insoluble (TI), se colectó mediante precipitación durante la evaporación del metanol a 80°C, posterior al proceso de extracción. El peso final de TI resultó ser de 12 Kg. El poliflavonoide se lavó con agua destilada a 40°C, y se secó en un horno a 60°C durante 48hrs. El tanino soluble (TS), permaneció en el licor, luego de la precipitación del TI. El peso final del TS resultó ser de 25 Kg, lo cual se obtuvo luego de secar por pulverización la solución que lo contenía, mediante el uso de un secador por aspersion, para así mantener el polvo en un desecador hasta su uso (García *et al.*, 2016).

4.3 Modificación de los poliflavonoides

La modificación de los poliflavonoides obtenidos en el proceso de extracción (Véase 4.2), se realizó con el fin de darle mayor funcionalidad a los poliflavonoides de *P. radiata*. Esto se llevó a cabo por dos métodos: (1) Esterificación (maleilación) e (2) Hidroxipropilación, donde los primeros fueron utilizados para los ensayos en medio líquido y sólido; mientras que los segundos fueron empleados sólo en los ensayos de fase sólida por su baja polaridad.

4.3.1 Maleilación (esterificación)

Se agregaron aproximadamente 500 mmol del respectivo anhídrido (Maleico, Citracónico e Itacónico) en un reactor de vidrio de 500 mL, y se llevó a 60°C por 15

min. Luego, se agregaron 100 mmol de poliflavonoide en polvo. Una vez diluido el poliflavonoide, se agregó 100 mmol de NaHCO_3 como catalizador, lo cual se mantuvo en agitación durante 4 hrs. La solución obtenida luego de la agitación, se vertió en agua fría (5°C), formando una suspensión, por lo que se centrifugó a 4000 rpm por 10 min.

Por un lado, los sólidos obtenidos luego del centrifugado, se separaron de la disolución, se lavaron 5 veces con 50 mL de agua fría (5°C) y se secaron en un horno a 40°C por 48 hrs, los que luego se molieron en un mortero y se guardaron en un desecador hasta su uso; mientras que el sobrenadante se dializó (Spectrum Lab Inc., membrana de diálisis MERCK, tamaño de poro: 300 Da, \varnothing : 2 cm) durante 72 hrs. La fracción resultante de la dialización, se sometió a evaporación del disolvente a 40°C durante 3 hrs hasta $1/3$ del volumen inicial. El sólido del sobrenadante se lavó dos veces con agua fría y se liofilizó.

4.3.2 Hidroxipropilación

Se disolvieron 100g de tanino en 500 mL de solución acuosa de NaOH 2N, ajustando el pH a 12, solución que fue combinada con 4 equivalentes molares de PO. Esta reacción se llevó a cabo en agitación durante 24 hrs a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C). Una vez terminado el tiempo de agitación, se calentó la solución a 60°C por 30 min, para eliminar el PO que no alcanzó a reaccionar. Antes de que la solución se enfriara, se ajustó el pH a 2, con una solución de HCl al 40% v/v, produciendo así un precipitado que se centrifugó. Luego, el sobrenadante fue recolectado por decantación y el precipitado se lavó 5 veces con agua destilada liofilizada. Finalmente, el sobrenadante se recuperó por evaporación del solvente en un rotavapor a 40°C , seguido de precipitación. El sobrenadante purificado se evaporó en rotavapor a una $T^\circ < 60^\circ\text{C}$ y se liofilizó (García *et al.*, 2017).

4.4 Preparación de blendas termoplásticas

Para la realización de las blendas termoplásticas, se utilizó un reómetro de torque de marca Brabender, Alemania. El polietileno de baja calidad (LDPE), el ácido poliláctico parcialmente cristalino (PLA) y el poliestireno (PS), se mezclaron a 110°C, 170°C y 240°C, respectivamente, en la cámara del reómetro. El tiempo de mezcla fue de 15 min, lo que se definió según hallazgos previos (García *et al.*, 2016). Los componentes sólidos se pretrataron mediante secado en estufa a 60°C durante 72 hrs para eliminar la posible agua absorbida en la superficie de las partículas.

Los polímeros comerciales y los poliflavonoides se mezclaron durante 2 min y se cargaron en un reómetro hasta su fusión, para luego agregar polietilenglicol (PEG-400), hasta terminar con una mezcla homogénea.

Finalizada la etapa de mezcla, se separaron tres muestras por tratamiento de aproximadamente 50 g cada una. Estas mezclas se molieron en un molino eléctrico (IKA, Basic MF10, China), se moldearon por compresión en una prensa LabTech LP20-B (Tailandia) (T: 175 ° C, t: 5 min, p: 32 bar). Se usaron laminados de 100 mm² (espesor: 1,5 mm) para la fase antimicrobiana en sólido, como se muestra a continuación en la figura 22.



Fig 22. Blendas termoplásticas de mezcla de polímeros (Fuente: Propia, 2017).

4.5 Preparación de solución patrón de poliflavonoides

Para el análisis de dilución en caldo, se pesó en un vaso de precipitado 1g de cada poliflavonoide (Véase 4.2 y 4.1) en una balanza analítica. Posterior a eso, se diluyó con 5mL de Dimetil Sulfóxido (DMSO), los cuales se añadieron poco a poco, procurando evitar la aparición de espuma. Una vez diluido completamente, se añadió agua destilada y se llevó a aforo a 1L para obtener una concentración patrón de 1000 ppm. Para el análisis de difusión en agar, se pesaron 10g de poliflavonoide, realizándose el mismo proceso que el anterior, para obtener una solución patrón de 10000 ppm (García *et al.*, 2017).

4.5.1 Diluciones de poliflavonoides

Se prepararon las diluciones correspondientes para los análisis de dilución en caldo y difusión en agar. Las diluciones fueron realizadas en las siguientes concentraciones (Tablas 5 y 6):

Tabla 5. Concentraciones de poliflavonoides para método de dilución en caldo (0,01-1000 ppm).

Nomenclatura	Concentración (mg L⁻¹)
C1	0,01
C2	0,1
C3	0,5
C4	1
C5	5
C6	10
C7	50
C8	100
C9	500
C10	1000

Tabla 6. Concentraciones de poliflavonoides para método de Kirby-Baüer (3000-10000 ppm).

Nomenclatura	Concentración (mg L⁻¹)
C11	3000
C12	5000
C13	7000
C14	10000

Las diluciones presentadas en la tabla 5 que corresponden al ensayo de dilución en caldo constan de la dilución de 5 polifenoles: Tanino Soluble (TS), Tanino Insoluble (TI), Tanino modificado con anhídrido Itacónico (I), Tanino modificado con anhídrido Citracónico (C) y Tanino modificado con anhídrido Maleico (M) (Véase 4.3). Mientras que la tabla 6, muestra las diluciones realizadas para el ensayo de difusión en agar con: Tanino insoluble, Tanino soluble y derivados.

4.6 Preparación del material

El material de vidrio a utilizar en el ensayo microbiológico, se sometió a dos procesos de limpieza. La primera etapa consistió en una exhaustiva limpieza manual, seguida de una segunda etapa de esterilización, con el fin de eliminar todo tipo de microorganismo. Para esto se selló con papel Kraft cada boquilla de matraces, vasos de precipitado y tubos de ensayo, mientras que las pipetas, fueron envueltas en sobres con el mismo papel, procurando que no tuvieran contacto con el ambiente, posterior a la esterilización y previo a la realización del ensayo. Para este proceso de esterilización del material, se utilizó un equipo WiseClave a una temperatura de 121°C de 15 a 20 min (Stainer *et al.*, 1992).

4.7 Medio de cultivo líquido

Para el ensayo en fase líquida se utilizó como medio de cultivo líquido Tryptic Soy Broth (TSB), que corresponde a uno de los medios básicos no selectivo, para estudios microbianos. Es un medio de cultivo universal, utilizado para la recuperación o el crecimiento de microorganismos no exigentes (aerobios y anaerobios), y debido a su composición, permite el crecimiento satisfactorio de éstos (Forbes *et al.*, 2009).

Para el ensayo en fase sólida se utilizó como medio de cultivo líquido Müller-Hinton Broth (MH), el cual es el medio recomendado para la realización de antibiograma en medio sólido por su buena reproducibilidad, y además sirve como medio para microorganismos exigentes (García *et al.*, 1993).

4.7.1 Preparación del caldo tripticasa (TSB)

En una botella de vidrio, se disolvieron 30g de medio de cultivo deshidratado TSB comercial (Merck) en 1L de agua destilada, distribuyendo 5mL en tubos de ensayo ya esterilizados, los que se llevaron nuevamente a esterilizar en autoclave, luego de ser tapados con algodón hidrófobo y papel Kraft.

4.7.2 Preparación del caldo Müller-Hinton (MH)

Se disolvieron 21g de medio de cultivo deshidratado Müller-Hinton comercial (Sigma Aldrich) en 1L de agua destilada, y se llevó a esterilizar en autoclave.

4.8 Medio del cultivo sólido

Se prepararon en botellas de vidrio, las respectivas disoluciones de cada agar cromogénico deshidratado comercial (Merck), correspondiente a cada una de las bacterias a utilizar en la primera etapa del ensayo en fase líquida, en 1L de agua destilada. Se tapó y llevó a esterilización de igual manera que en la preparación de TSB. Una vez finalizado el proceso de autoclave, se continuó en ambiente estéril dentro de una campana, la dosificación de 20mL de agar en placas petri

desechables estériles de 90mm, las que se dejaron en reposo hasta que el agar solidificó.

4.8.1 Preparación del agar MacConkey

Se diluyó 50g de agar MacConkey comercial (Merck), en 1L de agua destilada. Se dejó reposar por aproximadamente 15 min, y se llevó a ebullición con agitación frecuente por 1 min, para diluirlo por completo. Posterior a eso, se preparó para la esterilización.

4.8.2 Preparación del agar Oxford

Se diluyó 58,5g de agar Oxford comercial (Merck), en 1L de agua destilada. Posterior a eso, se preparó para la esterilización.

4.8.3 Preparación del agar BHI

Se diluyeron 37g de Infusión cerebro-corazón (BHI) más 15g de agar-agar comercial (Merck), en 1L de agua destilada. Posterior a eso, se preparó para la esterilización.

4.8.4 Preparación del agar Müller-Hinton

Se diluyeron 21g de medio de cultivo deshidratado Müller-Hinton comercial (Sigma Aldrich), más 15 g de agar-agar comercial (Merck), en 1L de agua destilada. Posterior a eso, se preparó para la esterilización.

4.8.5 Consideraciones para uso del agar

Cada medio de cultivo debe prepararse de la mejor manera posible, tomando en cuenta características que pudieran afectar el resultado del análisis de sensibilidad (Dharan, 1982).

4.4.5.1 Concentración del medio: La preparación debe ser la correcta, puesto que, al obtener un agar muy suave puede dar como resultado una falsa sensibilidad, mientras que si el medio de cultivo es muy duro, podría producir una falsa resistencia, incidiendo directamente en la velocidad y en la distancia de difusión del antibiótico. Esto se logra desde la etapa de disolución del medio deshidratado,

donde se dejó reposar la preparación para la suspensión uniforme procurando una dilución homogénea, para finalmente, aplicar calor uniforme, y evitar la presencia de grumos.

4.4.5.2 Ajuste de pH: Algunos medios de cultivos, preparados comercialmente, incluyen el ajuste de pH adecuado para su utilización. No obstante, en el momento de la preparación de la solución de cada medio, ya sea líquido o sólido, el pH tiende a variar, dependiendo de la calidad del agua utilizada para diluir. En este caso, el pH del medio se reguló con una solución de HCl o bien de NaOH, ambos de concentración 0,1M.

4.4.5.3 Humedad del medio: En el caso de ser medio sólido, indica un cambio en su composición, para esto, una vez preparadas las placas con el medio, se eliminó cualquier rastro de condensación para evitar el cambio posterior a su utilización.

4.4.5.4 Almacenamiento: La preparación del medio de cultivo se realizó en el momento en que se utilizó.

4.9 Preparación del Estándar de Turbidez (McFarland)

Para el estándar de turbidez 0,5 McFarland, se prepararon dos soluciones por separado, 100mL de BaSO₄ 0,048M y 100mL de H₂SO₄ 0,36N. Posterior a la preparación de ambas soluciones, en un matraz aforado de 100mL, se agregaron 99,5mL de la solución de H₂SO₄, y 0,5mL de la solución de BaSO₄. Finalmente, se envolvió el matraz con papel aluminio y se almacenó a temperatura ambiente en oscuridad (MacFaddin, 2003).

4.9.1 Consideraciones

Para la correcta utilización del patrón McFarland, éste se debe controlar periódicamente en un espectrofotómetro con un camino de luz de 1cm y cubetas apareadas. La absorbancia a 625 nm debe ser de 0,08 a 0,10 para el estándar de turbidez de McFarland de 0,5. Además de controlar periódicamente la solución patrón, el reactivo de BaSO₄, también debe ser controlado individualmente, con el

fin de evitar la preparación errónea de una siguiente solución patrón (Winn *et al.*, 2006).

4.10 Preparación de inóculos

Para una correcta inoculación de la cepa bacteriana, fue necesario aislar la cepa en placas de agar cromogénico (Véase 4.8), el cual se dejó incubar desde 16 a 24 horas. Posterior a eso, se recolectó de 4 a 5 colonias, con un asa metálica, las cuales se suspendieron en un tubo de ensayo con caldo tripticasa (TSB) y caldo Müller-Hinton, para dilución en caldo y difusión en agar, respectivamente, los que se prepararon con anterioridad (Véase 4.7). Pasadas las 5 horas de incubación a 37°C, la mayor parte de las cepas bacterianas, se encuentran en la etapa de crecimiento activo (la mitad de la fase logarítmica de crecimiento), lo que se visualiza al encontrar turbidez en el caldo (Hernández, 2003).

Para obtener una concentración de inóculo conocida, se comparó la turbidez obtenida luego de las 5 horas de incubación, con el estándar de turbidez 0,5 de McFarland (Véase 4.9), para así obtener una concentración óptica de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL. Para poder realizar la comparación del tubo con el inóculo, se agregó la misma cantidad de líquido en otro tubo de ensayo del patrón McFarland. Luego, se ubicó un tubo junto al otro, y se observaron contra un fondo con rayas negras (Figura 23).



Fig 23. Estandarización con Patrón de Turbidez McFarland (Fuente: Propia)

En este caso, el inóculo debería presentar una mayor turbidez que el patrón de McFarland, por lo que, para poder ajustarlo a la concentración del estándar, se agrega agua destilada estéril, con el fin de observar la mayor similitud en el color de las líneas negras a través ambos tubos. Una vez realizado este procedimiento de estandarización del inóculo, se puede informar que éste presenta una concentración aproximada de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL.

4.11 Medio líquido

Para el análisis en medio líquido, se realizaron las siguientes metodologías.

4.11.1 Dilución en caldo

Este método estudia la susceptibilidad, mediante el cultivo de bacterias en medios líquidos, los cuales contienen concentraciones decrecientes a partir de la solución patrón (rango de concentraciones) de un determinado agente antimicrobiano (Reyes-Jurado, 2014).

4.11.1.1 Procedimientos

Una vez dispuestos los materiales y preparado el lugar de trabajo, se añadió en tubos de ensayo, ya rotulados y esterilizados, 5mL de cada concentración de cada antibiótico (Véase 4.5.1), así como se aprecia a continuación en la figura 24 (Forbes *et al.*, 2009).

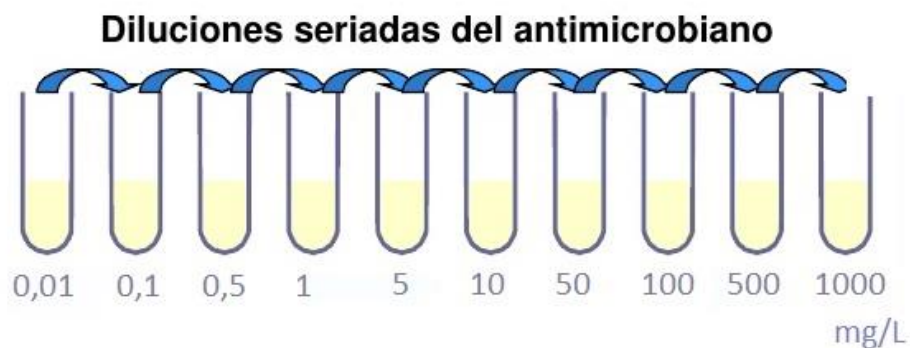


Fig 24. Diluciones de poliflavonoide para metodología de dilución en caldo (Fuente: Propia).

Una vez dispuestas las concentraciones de antibióticos en tubos de ensayo (Figura 24), se añaden 100µL del inóculo bacteriano a cada uno de ellos, además de añadir el mismo volumen de inóculo a un tubo Control que sólo contiene medio de cultivo (TSB), y se llevaron a incubación por 24 hrs a 37°C.

4.11.1.2 Determinación de CMI y CMB

Transcurrido el tiempo de incubación, se observó el crecimiento (turbidez) en cada uno de los tubos, para el cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), como se muestra en la figura 25.



Fig 25. Determinación de la CMI posterior a la incubación del inóculo (Fuente: Propia).

La Concentración Mínima Inhibitoria, estará representada por el tubo con la menor concentración que no presente turbidez (Figura 25). Finalmente, y una vez observada la CMI, se tomaron 100 µL de cada solución incubada con inóculo, y se traspararon a una placa con el agar correspondiente a cada bacteria, utilizando como método de difusión, la siembra con rastrillo, procurando cubrir completamente la superficie del agar.

Cada placa, fue llevada a incubación por 24 hrs a 37°C, obteniendo el crecimiento en placa, a las 13,18 y 24 Hrs, pudiendo así determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) como se muestra en la figura 26.

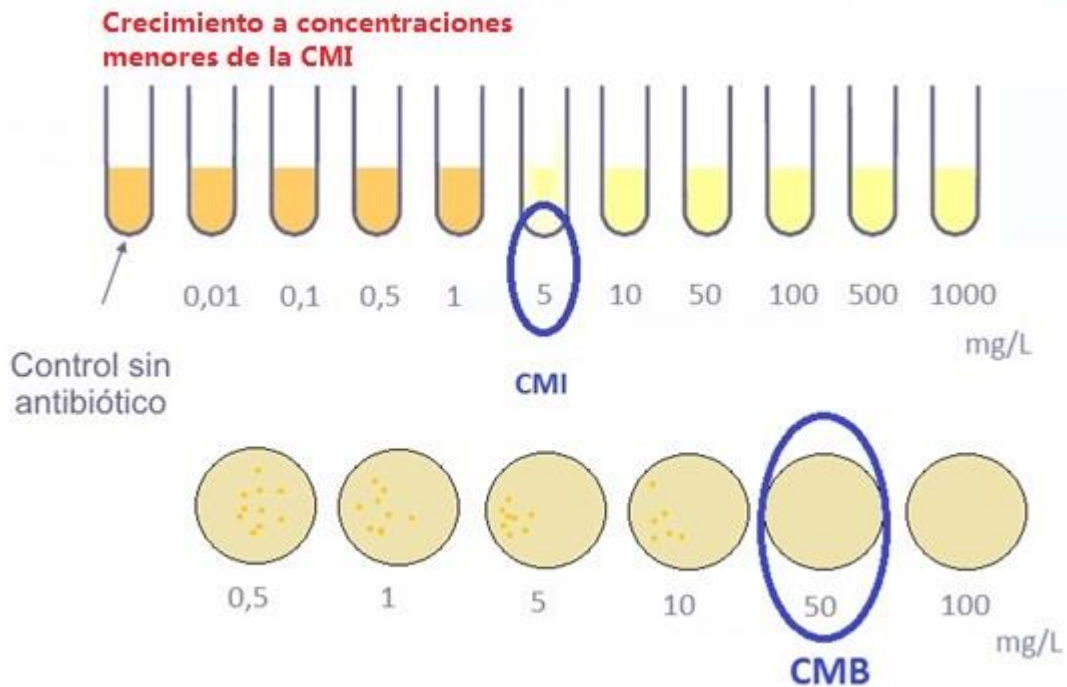


Fig 26. Determinación de la CMB posterior al período de incubación en placa (Fuente: Propia).

La Concentración Mínima Bactericida, corresponderá a la mínima concentración de la placa sembrada que no presente crecimiento bacteriano.

4.11.1.3 Determinación semicuantitativa de área de crecimiento

El resultado semicuantitativo se obtuvo por conteo de área de la placa (%), mediante el uso del programa Matlab (Carpenter *et al.*, 2006). Para esto, se realizó una modificación de cada imagen de las placas, decolorando el contorno de esta con blanco, dejando así en la imagen sólo tres colores: el fondo (Blanco); el agar (Color del agar cromogénico utilizado para cada bacteria); y las colonias de cada bacteria (Negro). Posterior a eso, se ingresó cada imagen en el programa, donde se hizo conteo de los pixeles blancos y negros, obteniendo los resultados como código binario para cada color, es decir, con 1 y 0, respectivamente (Puchkov, 2016).

Con los datos obtenidos, se realizó el cálculo matemático para determinar el número de pixeles correspondientes al área de agar que no estaba cubierta por la bacteria.

$$n^{\circ} \text{ pixeles agar} = n^{\circ} \text{ pixeles blancos} - n^{\circ} \text{ pixeles negros}$$

Finalmente, y mediante el mismo programa, se realizó la proporción para obtener el porcentaje de área de crecimiento de cada bacteria en el agar.

$$\% \text{ área de crecimiento} = \frac{n^{\circ} \text{ de pixeles negros}}{n^{\circ} \text{ de pixeles agar}} * 100$$

Este método, ha sido utilizado en numerosas investigaciones, considerando distintas modificaciones, tanto para conteo de colonias, como para la realización de modelos predictivos de crecimiento, lo que incluye un enfoque interdisciplinario donde se fusionan la microbiología, la matemática, la estadística y la tecnología de alimentos, con el fin de proporcionar información predictiva de las respuestas fisiológicas de microorganismos frente a condiciones ambientales definidas y controladas (Cayré *et al.*, 2004).

4.11.2 Difusión en agar (Método de Kirby-Baüer)

Esta técnica es utilizada para realizar control de calidad en pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, demostrando el efecto del grosor de medio de cultivo sobre halos de inhibición (Rodríguez *et al.*, 2012).

4.11.2.1 Procedimiento

Para este método, se utilizaron placas con agar Müller-Hinton (Véase 4.8.4), a las que se le realizó una marca en la base de la placa para identificar el lugar en el que se agregarían las distintas concentraciones de las muestras. Luego se pipetearon 200 µL del inóculo de bacteria, previamente estandarizado (Véase 4.10), para realizar difusión del inóculo por toda la superficie del agar, procurando cubrir por completo toda la placa. Se añadieron, sobre cada punto ya rotulado, 10 µL de cada concentración de muestra, más el control negativo (C-) y control positivo (C+), los que contenían caldo más inóculo de bacteria, y estreptomycin de 1000ppm, respectivamente (Anexo 6.1). Se almacenaron las placas hasta que el agar absorbió

el volumen de poliflavonoide pipeteado, para así llevar a incubación, y finalmente determinar los halos de inhibición.

4.11.2.2 Descripción de la determinación del halo de inhibición

A continuación, la figura 27 muestra un esquema del resultado esperado de la incubación por el método de difusión en agar.

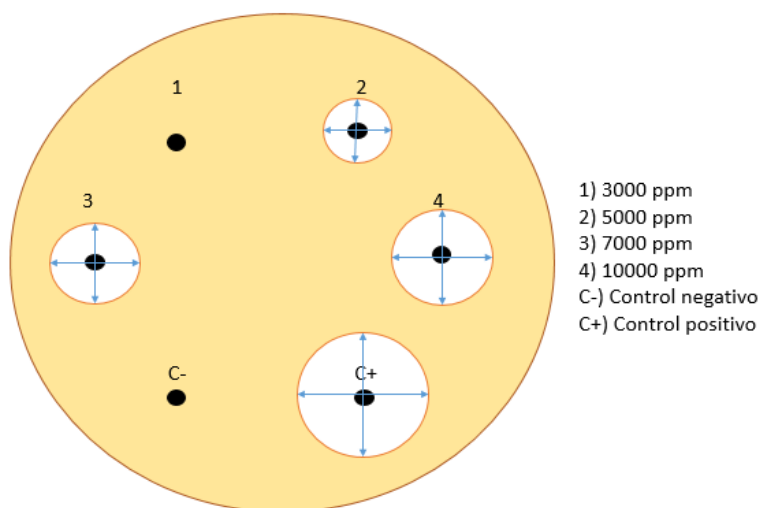


Fig 27. Esquema que representa los halos de inhibición según el método de Kirby-Baüer (Fuente: Propia).

Como puede observarse, los halos de inhibición cuando el antibiótico a utilizar es efectivo, pueden ser medidos para obtener milímetros de halo de inhibición. Esto se realiza mediante la medición de los diámetros en 90° de cada halo formado, obteniendo como resultado el promedio de halo de inhibición de cada concentración.

$$\bar{X} \text{ diámetro (mm)} = \frac{\text{diámetro 1 (mm)} + \text{diámetro 2 (mm)}}{2}$$

4.12 Medio sólido

Para el ensayo en medio sólido se realizó el ensayo de dilución en caldo, para evaluar el efecto de mezclas de polímeros sobre el crecimiento de *Shigella sp.*, *Arthrobacter sp.*, *E. faecium*, *Klebsiella sp.* y *L. monocytogenes*.

4.12.1 Micro dilución en caldo

Para esto, las bacterias fueron cultivadas en tubos estériles, que contenían 10mL de caldo Müller-Hinton (MH) (Véase 4.7.2) y se incubaron a 27°C durante 12 hrs con agitación para producir los cultivos iniciales. Luego, se agregaron las blendas termoplásticas de los poliflavonoides en láminas circulares de 1mm de diámetro (véase 4.4) de cada polímero, a las que se le añadieron 170µL de caldo en microplacas estériles de 96 pocillos, más 30µL de las bacterias ya incubadas, obteniendo un volumen final en cada microplaca, de 200µL, como se observa en la figura 28 (Cole, 1994; Carvajal *et al.*, 2016).

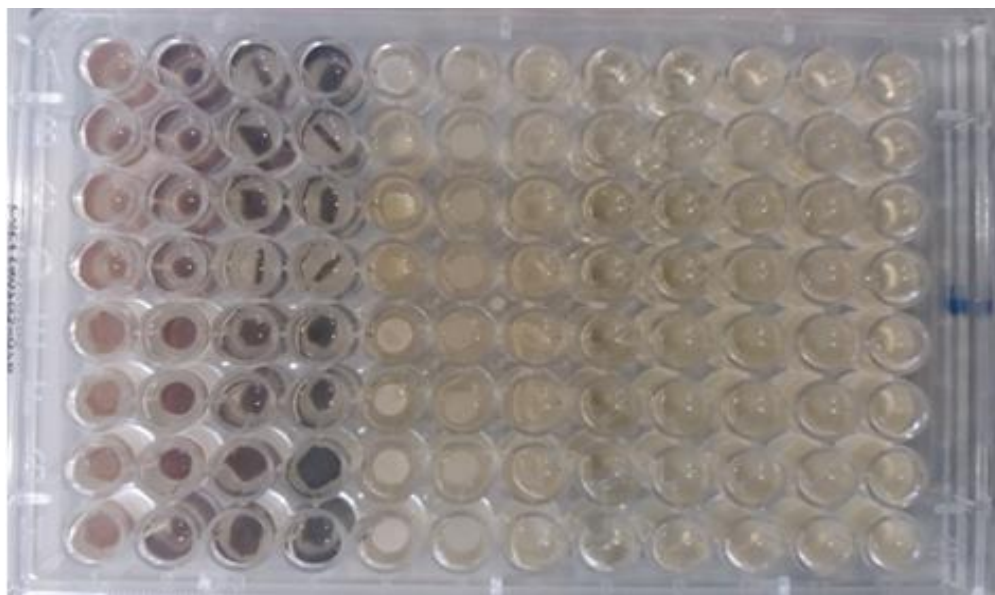


Fig 28. Técnica de microdilución en caldo con blendas termoplásticas para ensayo en medio sólido (Fuente: Propia).

Paralelamente se utilizó un volumen de caldo como control negativo [C(-)] y un volumen de caldo más Estreptomicina (O-2-deoxi-2-metilamino- α -L-glucopiranosil-(1-2)-O-5-deoxi-3-Cformil- α -L-lixofuranosil-(1-4)-N¹,N³-diamidino-D-estreptamina)

como control positivo [C(+)] (McManus *et al.*, 2012). Estas placas se incubaron durante 6 hrs a 27°C. Finalmente, el crecimiento bacteriano se controló midiendo la densidad óptica a 595 nm cada hora, con un lector de microplacas. El tiempo 0 y el tiempo final de la cinética de crecimiento bacteriano se midieron en ausencia del polímero en el pozo, puesto que el polímero interfiere en la lectura de la absorbancia, lo que implica eliminar el polímero del pozo una vez que se había completado la cinética (García *et al.*, 2000).

Todas las pruebas se realizaron en diez repeticiones para cada microorganismo evaluado. El crecimiento bacteriano se mostró como la media aritmética expresada en términos del control negativo (crecimiento del 100%). Los resultados se expresan como un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano según el control negativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Medio líquido

Para la fase en medio líquido, se realizaron dos ensayos:

- Dilución en caldo: Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), tanto en los tubos de las muestras, como en las placas, respectivamente. Además, se determinó el porcentaje del área de crecimiento de cada cepa bacteriana, frente a la actividad de los distintos poliflavonoides; es decir, el área de cubrimiento de la bacteria en las placas, luego del período de incubación determinado previamente (24 hrs para *E. coli* y *S. aureus*, y 72 hrs para *L. monocytogenes*).
- Difusión en agar: Se obtuvieron diámetros de halos de inhibición formados por las distintas concentraciones de poliflavonoides utilizados, frente a cada una de las especies bacterianas.

5.1.1 Dilución en caldo

5.1.1.1 *Escherichia coli*

En la figura 27 se observa un alto porcentaje de área de crecimiento de *E. coli*, con un comportamiento no lineal de este, observándose variaciones entre las concentraciones. Sin embargo, los que presentaron un mejor comportamiento, con respecto al efecto inhibitorio, fueron el tanino insoluble (TI) y el tanino modificado con anhídrido Citracónico (C). A continuación, se muestra el área de crecimiento de la bacteria versus las concentraciones utilizadas de cada poliflavonoide (Figura 29).

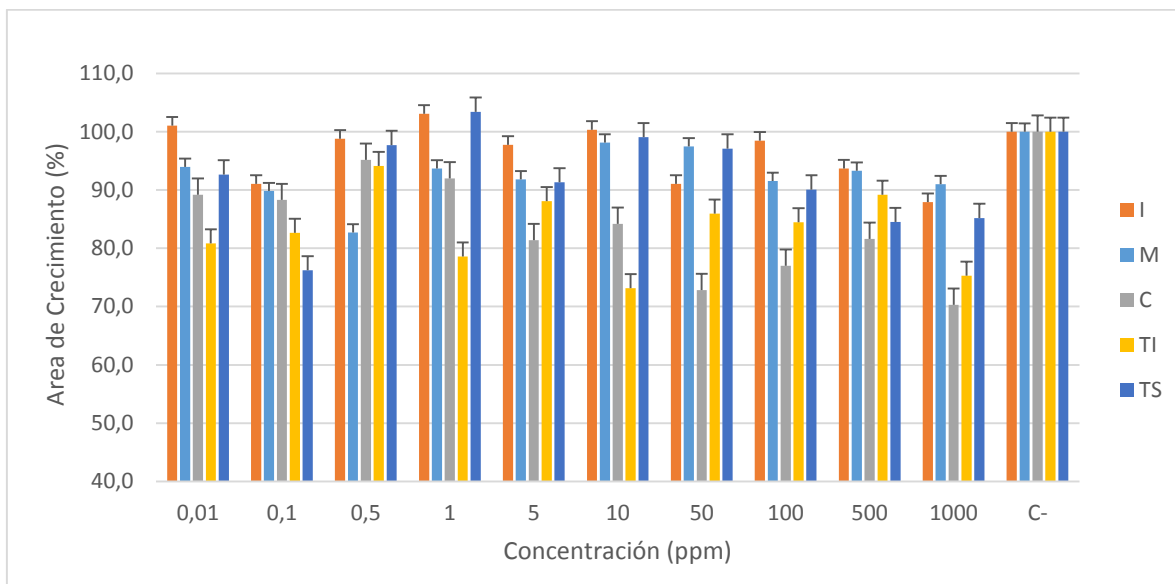


Fig 29. Porcentaje de área de Crecimiento de *E. coli* en función de la concentración de cada uno de los poliflavonoides (TI: Tanino insoluble, TS: Tanino soluble y los taninos modificados en base a los distintos anhídridos, I: Itacónico, M: Maleico, C: Citracónico) (N=5).

Este resultado se debe al poder de resistencia que presenta ésta bacteria, el cual ha ido desarrollándose y fortaleciéndose con el paso del tiempo, y que le permite un crecimiento óptimo; aun cuando se le aplique una serie de compuestos con potencial antibiótico. Además, esto concuerda con muchas pruebas antimicrobianas realizadas en diferentes condiciones de experimentación (Guirao y Arias, 2006).

Esta resistencia se puede observar en el trabajo de Herrera (2016), donde se probó el efecto bactericida de dos desinfectantes (A: Compuesto por glutaraldehído y amonios cuaternarios; B: Compuesto por ácido peracético, peróxido de hidrogeno y ácido acético) sobre *E. coli* y *L. innocua*, si bien el desinfectante A resulto ser más eficiente que el compuesto B se comprobó que *E. coli* fue la más resistente frente a ambos productos.

Esto también se ve reflejado en un estudio del efecto antibacteriano del ácido gálico de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *E. Coli*, lo cual se realizó en medio líquido y en medio sólido donde el ácido gálico presentó mayor actividad inhibitoria, siendo aun así la *E. coli* la más resistente (Díaz, 2012).

5.1.1.2 *Staphylococcus aureus*

Se puede observar un resultado similar al que se obtuvo con *E. coli*. Sin embargo, dentro de los cinco poliflavonoides, se destaca el efecto del tanino soluble (TS) y el derivado a base de anhídrido Citracónico; puesto que, comparando ambos comportamientos, el área de crecimiento de la bacteria disminuye a medida que la concentración del poliflavonoide va en aumento notándose una disminución de 20%, desde los 50 mgL⁻¹. A continuación se muestra el porcentaje de crecimiento de *S. aureus* a distintas concentraciones de los poliflavonoides (Figura 30).

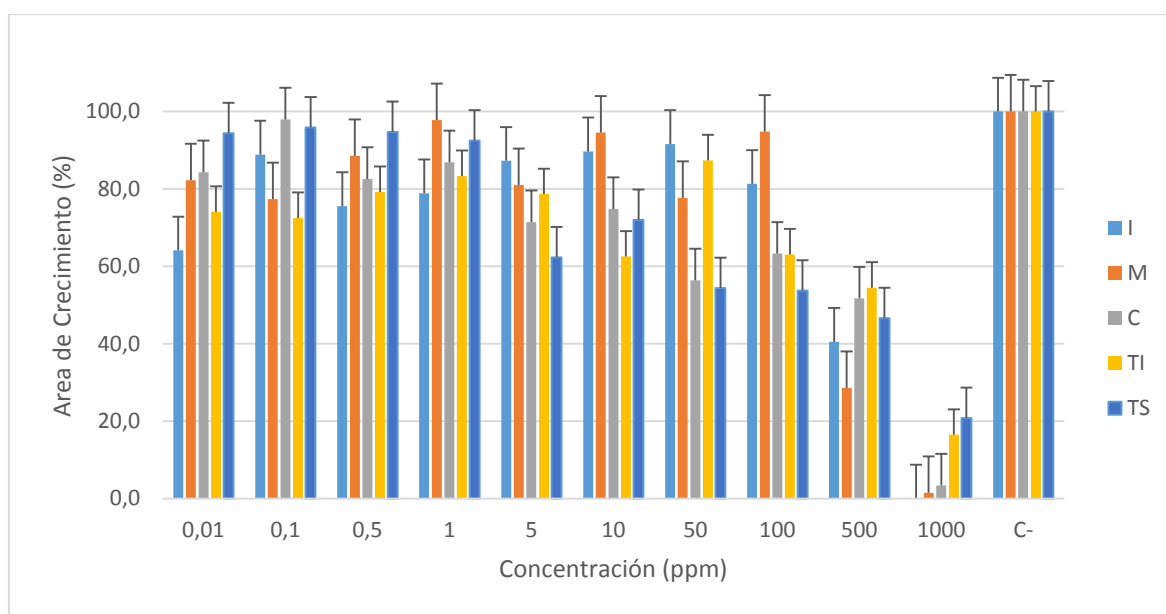


Fig 30. Área de Crecimiento de *S. aureus* en función de la concentración de cada uno de los poliflavonoides (TI: Tanino insoluble, TS: Tanino soluble y los taninos modificados en base a los distintos anhídridos, I: Itacónico, M: Maleico, C: Citracónico) (N=5).

A pesar de lo descrito anteriormente, el poder de inhibición se ve reflejado casi en un 100% a una concentración de 1000 ppm para los tres taninos modificados. No obstante, se infiere una actividad antimicrobiana moderada sobre esta bacteria, puesto que el porcentaje de área de crecimiento resultó ser sobre el 50% en la mayoría de las concentraciones estudiadas.

El resultado obtenido concuerda con lo informado por Venegas y Vásquez (2016) donde se estudió el efecto de un aceite esencial de Lantana camara sobre el

crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*, a través del método de difusión en agar donde se obtuvo inhibición de crecimiento en ambas bacterias en las distintas concentraciones del aceite esencial. Sin embargo, con respecto a los halos de inhibición *S. aureus* presentó en una concentración del 100%, un halo de inhibición de 33mm versus el halo de inhibición de *E. coli*, con 11, 87mm.

5.1.1.3 *Listeria monocytogenes*

Se observó una considerable disminución de las áreas de crecimiento con respecto a las dos bacterias anteriormente mencionadas. Si bien, se obtuvo crecimientos cercanos al 100%, la mayoría de las áreas resultantes, estuvieron bajo el 60%. Además, se observa que sobre la concentración de 50 mgL⁻¹, el efecto de la mayoría de los poliflavonoides sobre el crecimiento de la bacteria alcanza la inhibición total de éstas. A continuación, se muestra el porcentaje del área de crecimiento de *L. monocytogenes* frente a las concentraciones de los poliflavonoides (Figura 31).

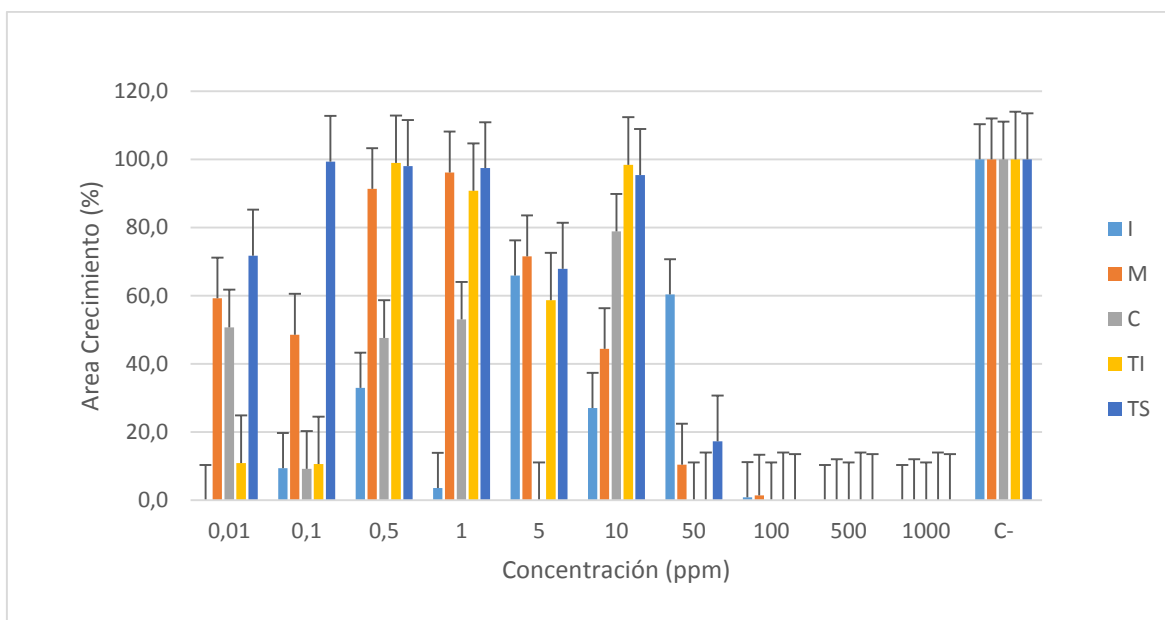


Fig 31. Área de Crecimiento de *L. monocytogenes* respecto del control en función de la concentración de cada uno de los poliflavonoides (TI: Tanino insoluble, TS: Tanino soluble y los taninos modificados en base a los distintos anhídridos, I: Itacónico, M: Maleico, C: Citracónico) (N=5) a las 72 hrs.

Si bien los resultados están expresados sólo hasta las 24 hrs en el caso de *E.coli* y *S. aureus*, en el caso de la *L. monocytogenes*, el punto final de crecimiento en placa se observó hasta las 72 hrs, haciendo alusión a que la velocidad de crecimiento de esta bacteria pudo haber sido afectada por la presencia de los poliflavonoides.

Esta bacteria ha sido inhibida en diferentes estudios y frente a distintos tipos de antibióticos como en el caso del estudio realizado por Rivera (2016), donde se analizó 222 cepas de *L. monocytogenes* frente a 8 antimicrobianos obteniendo solo 45 cepas resistentes correspondiente al 20,3% del total de cepas analizadas, siendo estas resistentes con mayor frecuencia a uno de los 8 antimicrobianos.

Además, se obtuvo un resultado similar en el trabajo de Silva (2004), donde se analizó la acción antimicrobiana de dos bacteriocinas lácticas sobre *Listeria monocytogenes* adheridas a una superficie de acero inoxidable, en el cual los resultados mostraron que *L. monocytogenes* fue completamente inactivada después de 24hrs por la combinación de ambas bacteriocinas, sin embargo, también se obtuvieron efectos bactericidas en cada uno de ellas por separado.

En las figuras 32-36, podemos ver la representación del crecimiento de *Listeria*, de una de las cinco réplicas por tratamiento, al ser sometidas a los derivados Itacónico, Citracónico y Maleico; así como para Tanino Soluble y Tanino insoluble, respectivamente (Véase tabla 3).

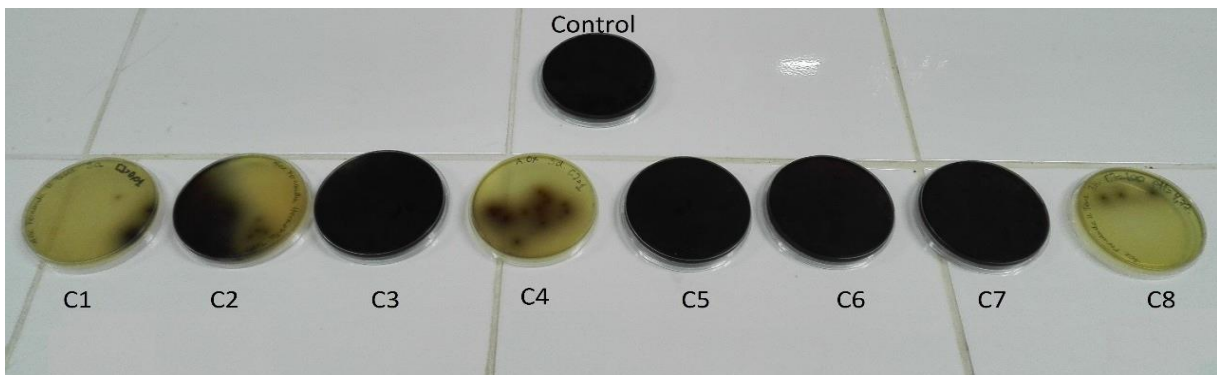


Fig 32. Crecimiento de *L. monocytogenes* frente a ensayo con poliflavonoide derivado de anhídrido Itacónico luego de 72 Hrs.

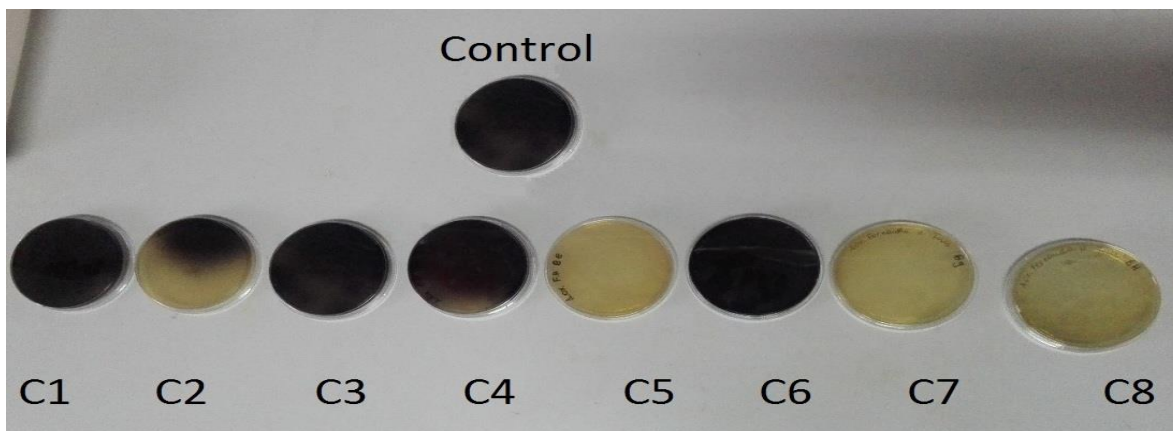


Fig 33. Crecimiento de *L. monocytogenes* frente a ensayo con poliflavonoide derivado de anhídrido Citracónico luego de 72 Hrs.

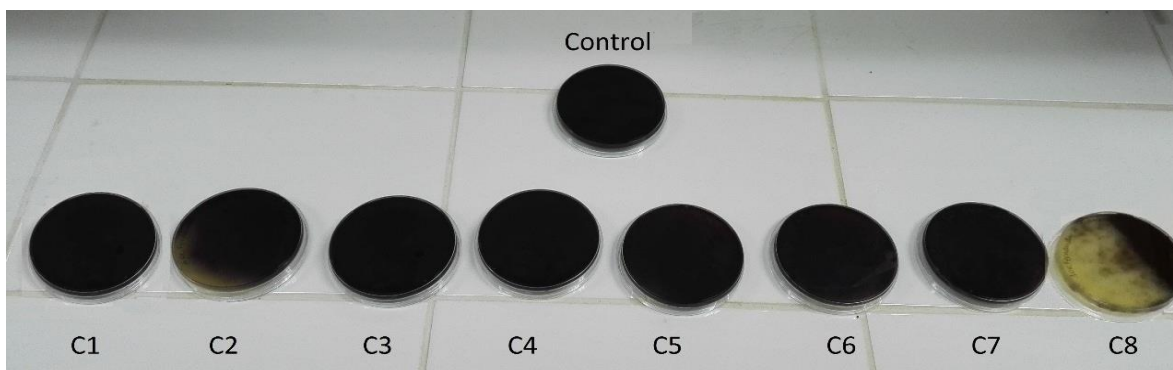


Fig 34. Crecimiento de *L. monocytogenes* frente a ensayo con poliflavonoide derivado de anhídrido Maleico luego de 72 Hrs.

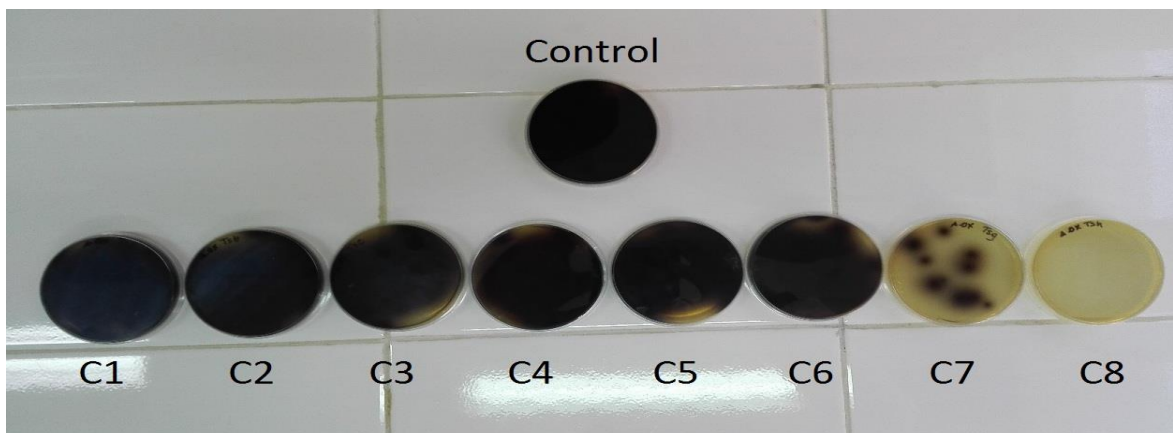


Fig 35. Crecimiento de *L. monocytogenes* frente a ensayo con poliflavonoide TS luego de 72 Hrs.

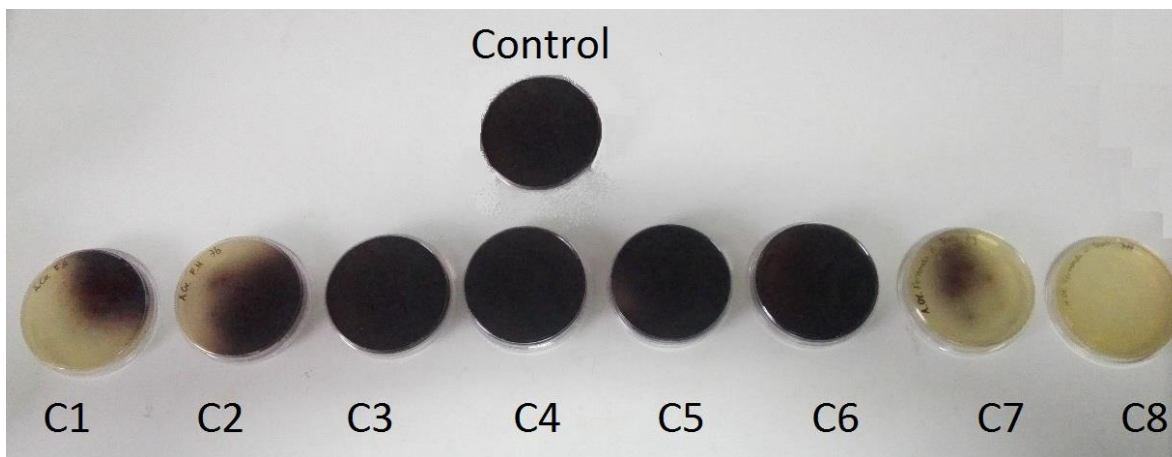


Fig 36. Crecimiento de *L. monocytogenes* frente a ensayo con poliflavonoide TI luego de 72 Hrs.

A partir de estas imágenes, se realizó la determinación del porcentaje de área de crecimiento en la placa. En este caso el porcentaje de área de crecimiento fue medido por conteo de pixeles en cada placa, puesto que en el caso de *L. monocytogenes*, no se pudieron distinguir las células de la colonia, lo que suele realizarse con mayor frecuencia en el procesamiento digital de imágenes. Este tipo de método es llamado “Computer digital image analysis” (CDIA) el cual forma parte del procesamiento de imagen digital en computador (CDIP) (Puchkov, 2016).

A continuación, se presenta la tabla con los resultados obtenidos de la primera etapa en medio líquido, y de donde se obtuvieron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Concentraciones mínimas bactericidas (CMB), correspondientes a *E. coli*, *E. aureus* y *L. monocytogenes* (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de poliflavonoides sobre *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus*, representados por CMI y CMB.

Bacterias	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
Poliflavonoides	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
I	>1000	>1000	500	1000	50	500
C	500	1000	50	100	10	50
M	>1000	>1000	500	1000	100	500
TS	>1000	>1000	100	500	50	100
TI	>1000	>1000	100	500	50	100

I: Tanino modificado en base a anhídrido Itacónico; C: Tanino modificado en base a anhídrido Citracónico; M: Tanino modificado en base a anhídrido Maleico; TS: Tanino soluble; TI: Tanino insoluble; CMI: Concentración Mínima Inhibitoria; CMB: Concentración Mínima Bactericida.

Los resultados de la tabla, muestran la efectividad de la actividad antimicrobiana del tanino modificado con anhídrido Citracónico contra el crecimiento de *L. monocytogenes*, específicamente.

En el caso donde las áreas de crecimiento resultaron ser no lineales con respecto a las concentraciones de los poliflavonoides, y donde las áreas de crecimiento de las bacterias en determinadas concentraciones, superaron las áreas de crecimiento de los controles respectivos a cada una de ellas, aparentemente se presenta debido a la Hormesis (Anexo 6.2), la cual está descrita como un fenómeno de dosis-respuesta, en el que la exposición a una dosis baja de un agente químico o bien un factor ambiental, que es dañino a dosis altas, induce una respuesta adaptativa y/o

un efecto benéfico en la célula o en el organismo (Rattan *et al.*, 2009); es decir, en aquellos casos, las bacterias posiblemente fueron capaces de metabolizar favorablemente componentes específicos de la fracción de poliflavonoide.

Vale la pena destacar que en algunas ocasiones, como es el caso de *L. monocytogenes*, se observó un efecto inhibitorio a muy bajas y muy altas concentraciones, como tendencia general. Dicho comportamiento, probablemente se relacione con los mecanismos que dominan la interacción de los poliflavonoides, con los componentes de la membrana bacteriana (Santos *et al.*, 2016).

Sin embargo, un mayor número de estudios se requieren para comprender como pudiera estar ocurriendo dicho proceso. No obstante, respecto a la mayor efectividad del derivado de anhídrido Citracónico, es bien conocido que este compuesto se produce por destilación del ácido cítrico, o como producto metabólico defensivo de microorganismos. Recientes estudios señalan que su actividad biológica se asocia a su efecto de inhibición competitiva en la reducción del fumarato (HMDB, 2018). Quizás su origen bacteriano y su efecto de inhibición selectiva, se asocie con la mayor efectividad de dicho derivado ante las bacterias estudiadas.

A continuación, la tabla 8 provee información comparativa asociada a las propiedades de las cadenas de ácidos carboxílicos incorporados a los poliflavonoides que evidencia una mayor actividad biológica del ácido Citracónico, respecto del resto.

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas y de actividad biológica calculada de ácidos dicarboxílicos análogos a anhídridos cíclicos utilizados en la esterificación de poliflavonoides de *P. radiata*.

Propiedad Relativa	Ácido dicarboxílico correspondiente		
	Maleico (fumárico)	Itacónico	Citracónico (mesacónico)
Estructura química			
Nombre IUPAC	Ácido (E)-Butenedioico	2-Methylidenebutanedioic acid	(2E)-2-Methyl-2-butenedioic acid
Peso molecular (gmol ⁻¹)	116,07	130,10	130,10
pKa1	3,03	3,65	3,72
logP	-0,68	-0,34	-0,13
Ligando de GPCP	-2,87	-1,78	-2,06
Modulador de canales de iones	-2,60	-0,97	-1,46
Inhibidor de kinasa	-3,46	-2,82	-2,54
Ligando de receptores nucleares	-2,61	-1,54	-1,21
Inhibidor de proteasa	-2,83	-2,08	-2,21
Inhibidor enzimático general	-2,48	-1,23	-1,10

GPCP: receptor de proteína-G acoplada, logP: coeficiente de partición octanol/agua. Nota: cálculos realizados mediante el Software libre “Molinspiration Cheminformatics”

A partir de esto, se puede explicar el comportamiento del tanino modificado con anhídrido Citracónico, puesto que en comparación con los pka de los anhídridos Itacónico (pka=3,65) y Maleico (pka= 1,85 *cis* y 3,03 *trans*), este tiene un pka= 3,72; estando dicha variable directamente relacionada al poder antimicrobiano de derivados de ácidos carboxílicos en un amplio grupo de bacterias (Bello, 2000). De la misma forma se puede ver una asociación entre el pka de cada tipo de ácido, versus los valores obtenidos para los inhibidores, tanto de kinasa y proteasa, como los inhibidores enzimáticos en general. Es por esto que el tanino modificado en base a anhídrido Citracónico pudo haber obtenido el mejor comportamiento frente a la inhibición de bacterias patógenas.

En base a lo obtenido en esta primera fase del ensayo, se decidió presentar resultados con respecto a *L. monocytogenes*, puesto que tuvo un comportamiento positivo frente a la inhibición causada por los poliflavonoides, con ausencia de crecimiento desde los 50 ppm para el derivado del anhídrido Citracónico y el Tanino Insoluble; mientras que para los derivados del anhídrido Itacónico y Maleico además del Tanino Soluble, la inhibición se presentó desde los 100 ppm.

5.1.2 Difusión en agar (Método de Kirby-Baüer)

Los resultados del ensayo de difusión por disco se presentan a continuación, donde se muestran los diámetros de los halos de inhibición en milímetros, en las distintas concentraciones de poliflavonoides (Figuras 37 y 38).

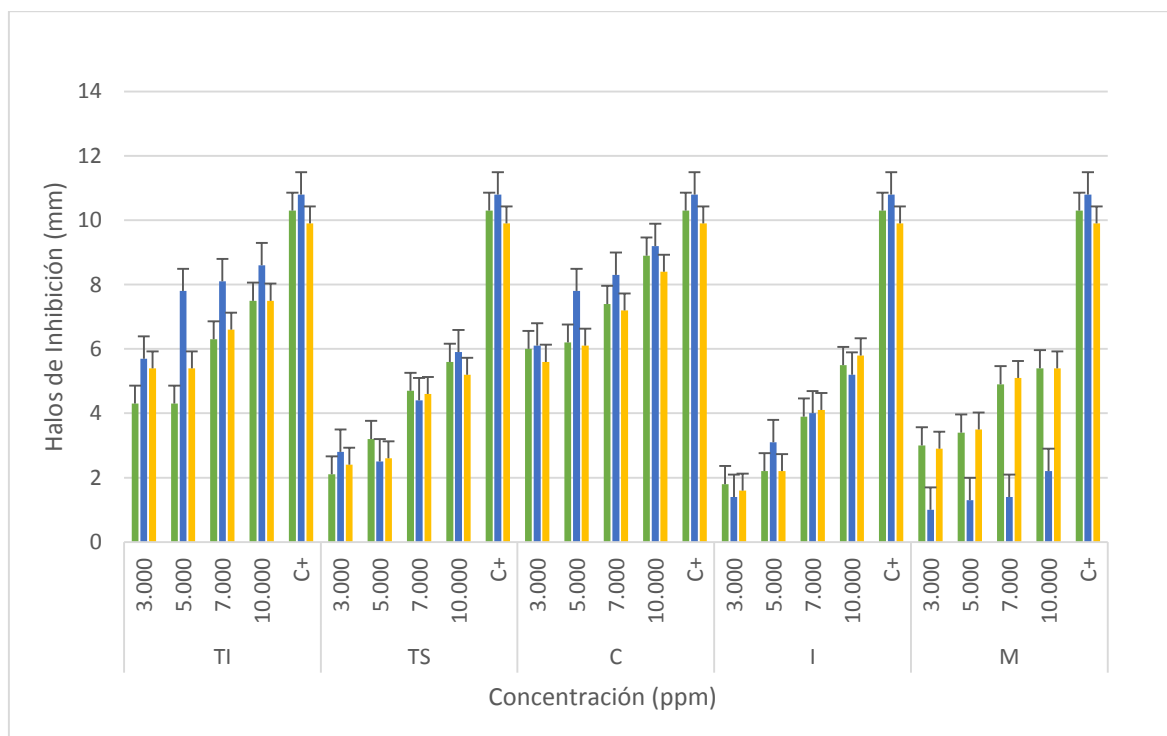


Fig 37. Halos de inhibición (mm) para bacterias Gram positivas (*E. faecium*; *L. monocytogenes*; *Arthrobacter* sp.) en cada una de las concentraciones de poliflavonoides.

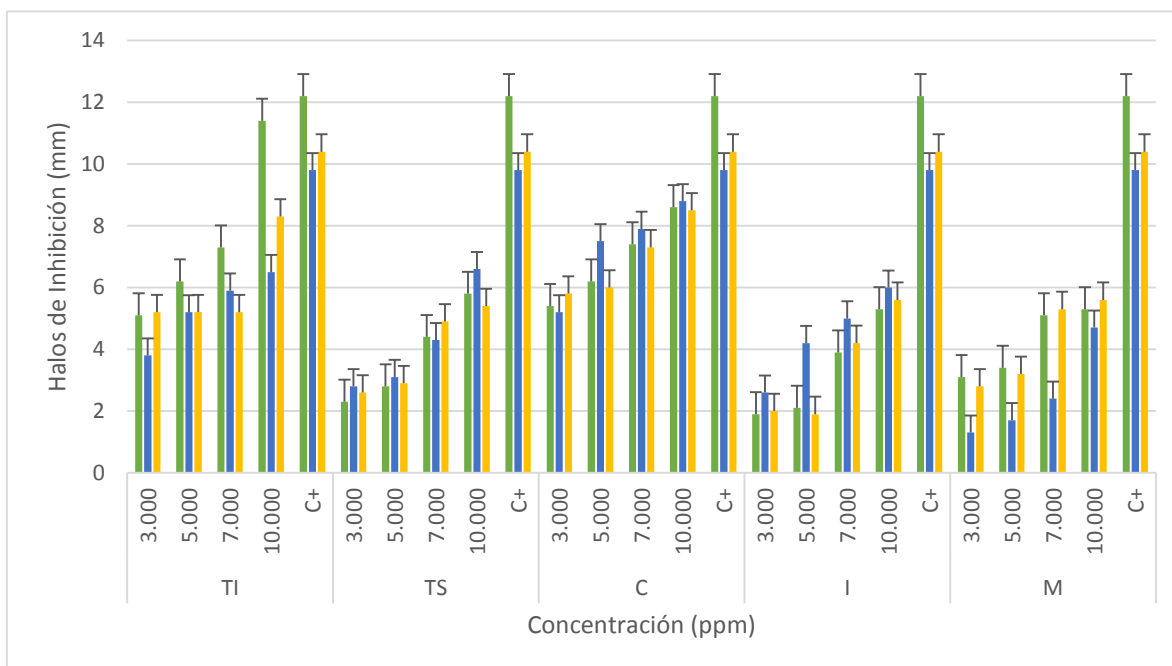


Fig 38. Halos de inhibición (mm) para bacterias Gram negativas (■ *E. carotovora*; ■ *Klebsiella* sp.; ■ *Shigella* sp.) en cada una de las concentraciones de poliflavonoides.

Como se puede observar en los resultados obtenidos por el método de Kirby-Baüer; en sentido general, los poliflavonoides presentaron mayor inhibición en bacterias Gram positivas que en Gram negativas. Este resultado concuerda con el ensayo de dilución en caldo, y puede estar relacionado a la carga superficial de las bacterias, además de la estructura de la pared celular en ambos casos.

Se resalta el efecto del tanino insoluble y del tanino modificado a base de anhídrido Citracónico. En el caso de las bacterias Gram positivas, el halo de inhibición formado fue mayor para *L. monocytogenes*, en cambio para el caso de las bacterias Gram negativas, la mayor inhibición se presentó con el tanino insoluble frente a *E. carotovora*.

5.2 Medio sólido

5.2.1 Micro dilución en caldo

Para la etapa en medio sólido se realizó el ensayo de dilución en caldo, el cual fue definido como micro dilución, puesto que el volumen final fue de aproximadamente 300 μ L. Como resultado de este análisis, se obtuvo el porcentaje de inhibición de cinco especies bacterianas (*L. monocytogenes*, *Shigella* sp., *E. faecium*, *Klebsiella* sp. y *Arthrobacter* sp.) frente al efecto de diversas mezclas de polímeros. Las blendas termoplásticas se prepararon a base de poliestireno, polietileno y ácido poliláctico enriquecidas con diferentes concentraciones de poliflavonoides (figura 39, 40 y 41).

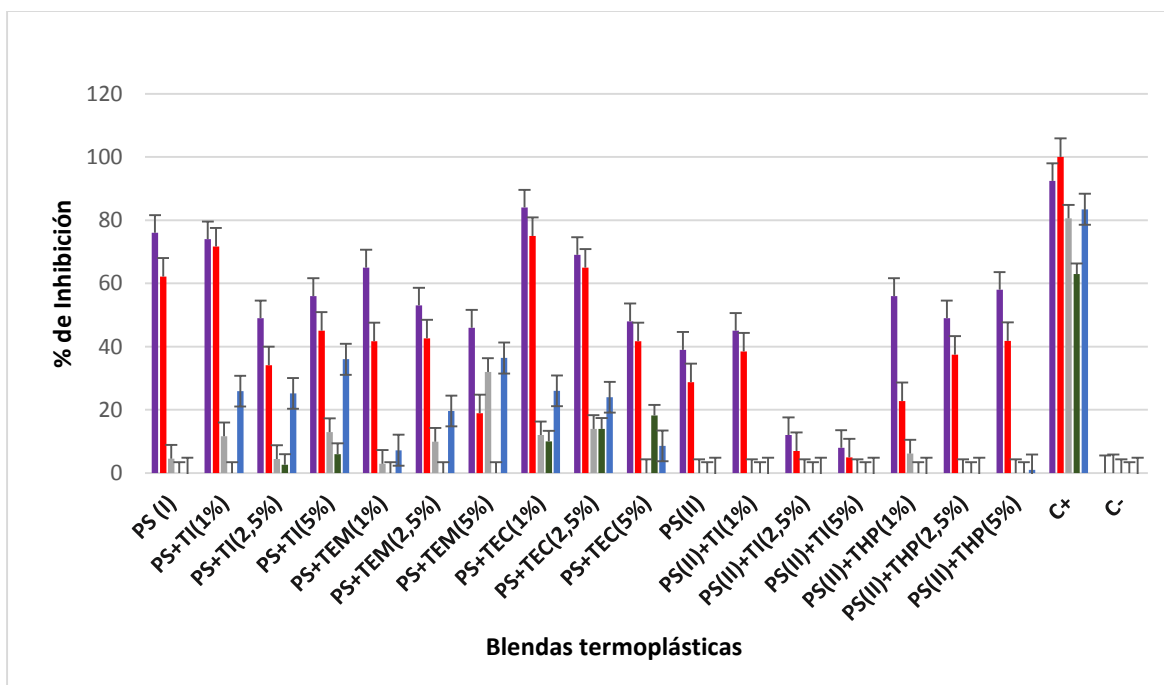


Fig 39. Porcentaje de inhibición obtenidos para cinco bacterias patógenas (■ *L. monocytogenes*; ■ *Klebsiella* sp.; ■ *E. faecium*; ■ *Arthrobacter* sp.; ■ *Shigella* sp.) frente a mezclas de polímeros (poliestireno más poliflavonoides).

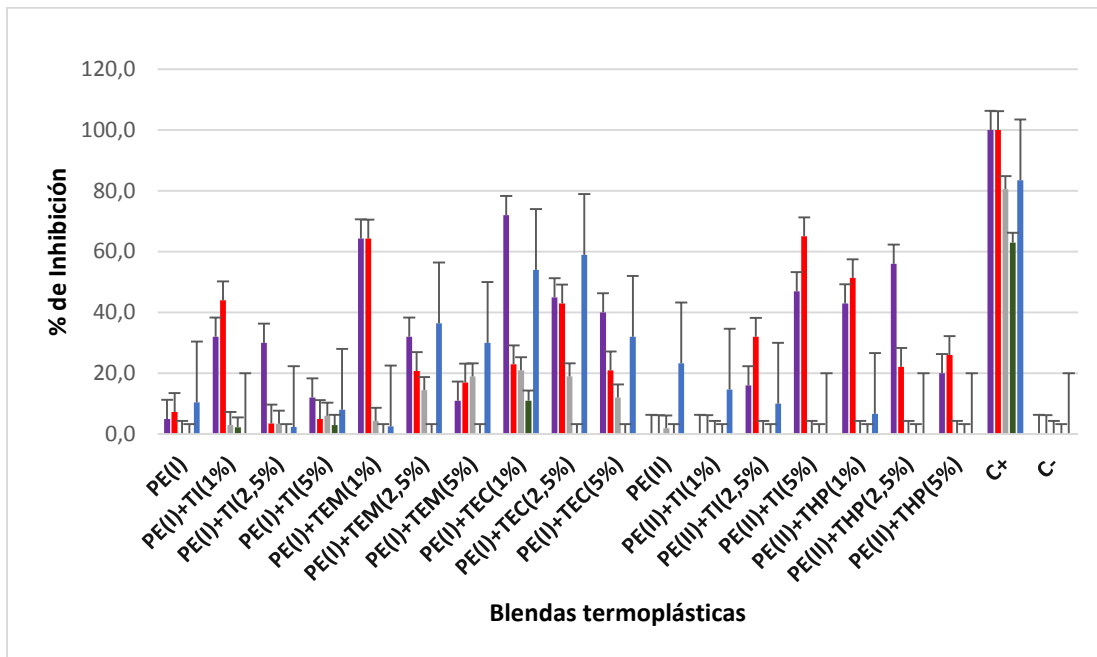


Fig 40. Porcentaje de inhibición obtenidos para cinco bacterias patógenas (*L. monocytogenes*; *Klebsiella sp.*; *E. faecium*; *Arthrobacter sp.*; *Shigella sp.*) frente a mezclas de polímeros (polietileno más poliflavonoides).

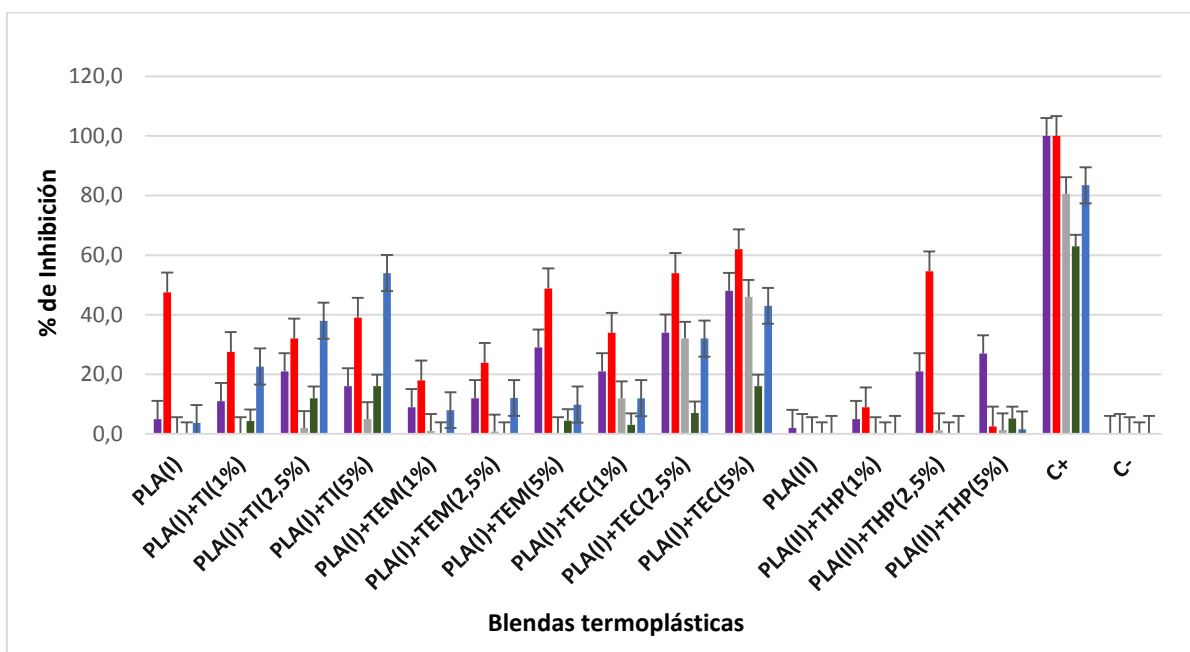


Fig 41. Porcentaje de inhibición obtenidos para cinco bacterias patógenas (*L. monocytogenes*; *Klebsiella sp.*; *E. faecium*; *Arthrobacter sp.*; *Shigella sp.*) frente a mezclas de polímeros (ácido poliláctico más poliflavonoides).

En la fase sólida se resaltan efectos inhibitorios tanto para *L. monocytogenes*, *Klebsiella* sp., como para *Shigella* sp., dependiendo de la mezcla de polímero. Se obtuvo mayor inhibición con los poliflavonoides inmovilizados en poliestireno, siendo ésta mezcla la que obtuvo porcentajes de inhibición mayores que los utilizados con polietileno y ácido poliláctico.

En este sentido, otros autores han reportado materiales antimicrobianos en base a este polímero comercial enriquecidos con otros aditivos y co-polímeros no polifenólicos (Lin *et al.*, 1996; Farah *et al.*, 2015; Popok *et al.*, 2018).

De forma comparativa, el poliestireno es el único polímero aromático utilizado en este estudio. Dichos resultados presentan relevancia, considerando que es un termoplástico comercial de uso masivo en la industria de alimentos y la industria biomédica, lo cual lo convierte en una opción para el desarrollo de piezas termoformables enriquecidas con poliflavonoides y derivados para su uso masivo (Sastri, 2014).

Vale la pena destacar que si bien los resultados fueron variados respecto al porcentaje de inhibición en función de la bacteria; con el poliflavonoide modificado con el anhídrido Citracónico se observó un mayor espectro antimicrobiano en comparación con el resto. Estos resultados nos llevan a pensar que las propiedades fisicoquímicas y de actividad biológica del ácido Citracónico discutidas en los experimentos en fase líquida, también sean los causantes del marcado potencial antimicrobiano de este derivado, inclusive al estar inmovilizado dentro de la matriz polimérica.

También en el análisis debe considerarse la polaridad intermedia que presenta el poliestireno, en comparación con el polietileno y el ácido poliláctico (García *et al.*, 2016). De hecho, algunas investigaciones han utilizado este polímero para el desarrollo de materiales antimicrobianos, por lo que posiblemente el rango acotado de polaridad de los polímeros termoplásticos, sea en sí un aspecto que le confiere actividad bactericida/bacteriostática (Ocampo *et al.*, 2014); esto a la luz de que en

algunos casos el polímero, sin aditivos, exhibió actividad antimicrobiana. Una disminución de la adherencia de las bacterias a la superficie del polímero, la inducción de toxicidad o ruptura de la membrana asociada a características de polaridad y grupos funcionales, pueden ser las principales causas.

Sin embargo, se debe enfatizar que la interacción de bacterias con materiales poliméricos ocurre en la región interfacial, en el cual hay que considerar todos los factores que influyen en los fenómenos de superficies tales como el carácter antifílico de los componentes involucrados, la cohesión y la adhesión entre las fases, las repulsiones entre los restos moleculares y los grupos funcionales presentes y el poder de adsorción extensión y asociación de los componentes; todo esto, relacionado a la energía superficial (Mattox, 2010).

En todo caso, en el presente experimento se constató que el tipo de bacteria, de polímero termoplástico y de poliflavonoides, condicionan la actividad antimicrobiana en fase sólida. No obstante, otros estudios se requieren para conocer la influencia de aspectos asociados a la carga superficial del polímero (potencial- Z) y la conformación macromolecular de los poliflavonoides inmovilizados en la superficie polimérica, para entender en profundidad el efecto antimicrobiano de polifenoles como aditivos a polímeros comerciales.

Por otra parte, con respecto al efecto del tipo de modificación química (esterificación con anhídridos o hidroxipropilación con óxido de propileno) se debe señalar que ambas fueron efectivas; pero a su vez el efecto antimicrobiano fue altamente dependiente de la bacteria específica, la matriz polimérica y el contenido del poliflavonoide en la blenda. No obstante, en sentido general, la esterificación resultó ser más factible comparativamente. Quizás el grupo terminal de ácido carboxílico correspondiente a los derivados a base de anhídridos, tuvieron un papel preponderante en la interacción con bacterias. Es bien conocido que grupos funcionales polares, como parte de la estructura de materiales sólidos, tienen actividad bacteriana acentuada sobre patógenos específicos (Moovendhan *et al.*, 2015).

CONCLUSIÓN

- Los polifenoles estudiados, así como sus modificaciones con anhídridos cíclicos insaturados, presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas en medio líquido, como es el caso de *L. monocytogenes* y *S. aureus*; aún cuando la inhibición se obtuvo en concentraciones distintas en ambos casos.
- Dentro de las bacterias utilizadas en medio líquido, según la categorización de sensibilidad bacteriana la más sensible fue *L. monocytogenes*; de nivel Intermedio, *S. aureus* y la más resistente, *E. coli*.
- Los taninos modificados (fundamentalmente a base de anhídrido Citracónico) produjeron resultados positivos en la inhibición del crecimiento de bacterias Gram positivas en medio líquido. Sin embargo, los taninos nativos (Insolubles) sin modificación afectaron notablemente el crecimiento bacteriano en numerosas combinaciones.
- Los polímeros termoplásticos usados en fase sólida y enriquecidos con poliflavonoides, presentan actividad antimicrobiana mayormente frente a bacterias Gram negativas como *Klebsiella* sp. y *Shigella* sp. Sin embargo, también presenta actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*.
- Dentro de las bacterias Gram negativas, *Klebsiella* sp. resultó ser la más sensible frente a los polímeros funcionalizados, obteniendo porcentajes de inhibición de hasta un 70%; mientras que dentro de las bacterias Gram positivas *L. monocytogenes*, presentó porcentajes de inhibición de hasta un 80%.
- Los polifenoles provenientes de la corteza de *P. radiata* pueden ser utilizados como agentes antimicrobianos tanto en fase sólida, como en fase líquida; con el fin de inhibir el crecimiento o disminuir la velocidad de crecimiento de patógenos.
- En medio líquido se observó una mayor sensibilidad sobre bacterias Gram positivas; mientras que con polímeros en fase sólida, fueron más efectivos en bacterias Gram negativas. Estos resultados avizoran la preparación de

productos antimicrobianos en base a polifenoles en función de patógenos específicos.

- Los polifenoles podrían ser utilizados en la preparación de aerosoles o soluciones líquidas antimicrobianas; así como para la fabricación de películas que inhiban el crecimiento bacteriano.
- El estudio de la actividad antimicrobiana de polifenoles y sus modificaciones puede ser ampliado a otros ámbitos, con el fin de cubrir un espectro más amplio de bacterias, sus distintas cepas u otro tipo de organismo microbiano, en el futuro.

REFERENCIAS

- Acosta-Gnass S. (2011). Manual de control de infecciones y epidemiología hospitalaria. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C. pp 169-174.
- Aguilar J., Jaén J., Vargas A., Jiménez P., Vega I., Herrera J., Borbón H., Soto R. (2012). Extracción y evaluación de taninos condensados a partir de la corteza de 11 especies maderables de Costa Rica. Tecnología en Marcha. Vol. 25, N° 4. pp 15-22.
- AMCHAM. (2009). La industria forestal de Chile. Disponible en: <http://www.amchamchile.cl/2009/09/la-industria-forestal-de-chile/>. Fecha de consulta: 18 de abril de 2017.
- Ames T. (1997). Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. pp 7, 8.
- Armijo J. (2011). Presencia de *Enterococcus faecalis* en dientes con diagnóstico de periodontitis apical asintomática. Facultad de odontología, Universidad de Chile. Santiago, Chile. p 19.
- Ausina V., Moreno S. (2005). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Madrid, España. pp 250-251.
- Baker K., Cook R. (1974). Biological Control of Plant Pathogens. W.H. Freeman and Company. San Francisco, EUA. P 433.
- Barrios R. (2015). Identificación de bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) con síntomas de pudrición blanda, colectadas en Sanare, Estado Lara. Venezuela. pp 66-68.

Bello J. (2000). Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos. Universidad de Navarra, Madrid, España. pp 484, 485.

Benadof D. (2008). *Listeria monocytogenes*. Revista chilena de infectología, 25(5), 350.

Bernal M., Guzman M. (1984). El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Baüer. Revista Biomédica. pp 112-121.

Beshkova D., Frengova G. (2012). Bacteriocin from lactic acid bacteria: microorganisms of potencial biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*. pp 1-14.

Beuchat L. (2001). Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. Londres, Reino Unido. pp 149-152.

Cabrera C., Gómez R., Zúñiga A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica. pp 149-158.

Calderón L. (2002). Evaluación de los compuestos fenólicos (*Theobroma cacao L.*) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación con la calidad. Tesis para optar al grado de Lic. en Química, Pontificia Universidad Católica. Quito, Ecuador. p 10.

Carpenter A., Jones T., Lamprecht M., Clarke C., Kang I., Friman O., Guertin D., Chang J., Lindquist R., Moffat J., Golland P., Sebatini D. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and cuantifying cell phenotypes. *Genome Biology*. Cambridge, USA. pp 1-4.

Carvajal M., Vergara A., Santander R., Osorio E. (2016). Chemical Composition and Anti-phytopathogenic Activity of the Essential Oil of *Beilschmiedia miersii*. *Natural Product Communications*. pp 1367-1372.

Cayré M., Vignolo G., Garro O. (2004). Modelo dinámico para el crecimiento de bacterias lácticas sobre emulsiones cárnicas. Facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. pp 1-4.

Cherrington C., Hinton M., Mead G., Chopra I. (1991). Advances in microbial Physiology. Volumen 32, UK. pp 87-108.

Cleveland J., Monteville T., Nes I., Chikindas M. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. pp 1-20.

Crecente-Campo F. (2008). Modelo de crecimiento de árbol individual para *Pinus Radiata* D.Don en Galicia. Tesis para optar al grado de Doctor. Universidad de Santiago de Compostela, España. pp 2,3.

Cole MD. (1994). Key Antifungal, antibacterial and anti-insect assays a critical review. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22. pp 837-856.

CORMA. (2016). Chile en el mercado mundial. Disponible en: <http://www.corma.cl/perfil-del-sector/aportes-a-la-economia/chile-en-el-mercado-mundial>. Fecha de consulta: 18 de abril de 2017.

Crozier A., Del Rio D., Rodríguez-Mateo A., Spencer J., Tognolini M., Borges G. (2013). Dietary (Poly) phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14). pp 1818-1892.

Davidson P., Zottola E., Schafer W., Ulate J. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Micrococcus luteus* by linear furocoumarins in a model food system. Saint Paul, Minesota, USA. pp 1050-1054.

Davidson P., Zivanovic S. (2003). The use of natural antimicrobials. Food preservation techniques. Washington. pp 5-29.

Delves-Broughton J. (2005). Nisin as a food preservative. *Food Australia*. pp 525-527.

Dharan M. (1982). Control de calidad en los laboratorios clínicos. Barcelona, España. pp 125-130.

Díaz P., Ferrera-Cerrato R., Almaraz-Suárez J., Alcantar G. (2001). Inoculation of plant Growth-promoting Bacteria in Lettuce. Volumen 19. Chapingo, México. (4) p 328.

Díaz R. (2012). Antibacterial effect of the gallic acid and of the catechin against *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp 13-28.

EMBRAPA-CNPSO. (1995). El cultivo de la Soja en los trópicos. Mejoramiento y producción. Londrina, Brasil. pp 23-25.

England R., Hobbs G., Bainton N., Roberts D. (1999). Microbial signaling and communication. Cambridge University Press, United Kingdom. pp 161, 162.

Estrela C., Sydney G., Figueiredo J. (2009). A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *J. Applied Oral Science*. Brasil. 17(2). pp 87-91.

Farah S., Aviv O., Laout N., Ratner S., Domb A. (2015). Antimicrobial N-brominated hydantoin and uracil grafted polystyrene beads. *J. Control Release*, 28(216). pp 18-29.

Ferrer C., Arias M., González M., Baca P. (2010). Journal of endodontics: Antimicrobial activity of maleic acid and combinations of cetrimide with chelating agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. Universidad de Granada, Granada, España. pp 1673-1675.

Figuroa J., Salcedo J., Aguas Y., Olivero R., Narvaez G. (2011). Edible coatings in the conservation of mango and avocado and perspective to use in the formulation propolis. Universidad de Sucre, Colombia. pp 386-395.

Flores E., Albarado L. (2009). Ciclo celular por Gram y tinción de fluorescencia modificada en bacterias con aspecto morfotintorial semejante a *Neisseria gonorrhoeae* aisladas de muestras perianales y uretrales. Universidad de Oriente, Venezuela. pp 31,32.

Forbes B., Sahm D., Weissfeld A. (2009). Diagnóstico microbiológico. 12ª Edición. Buenos Aires, Argentina. pp 97, 187-190, 205.

Gao Z., Shao J., Sun H., Zhong W., Zhuang W., Zhang Z. (2012). Evaluation of different kinds of organic acids and their antibacterial activity in Japanese apricot fruits. Nanjing, China. pp 4911-4918.

García D., Glasser W., Pizzi A., Paczkowski S., Laborie M. (2016). Modification of condensed tannins: from polyphenol chemistry to materials engineering. *New Journal of Chemistry*, 40. pp 36-49.

García D., Medina P., Zúñiga V. (2017). Toxicological features of maleilated polyflavonoids from *Pinus radiata* (D. Don.) as potential functional additives for biomaterials design. *Food and Chemical Toxicology*, 109. pp 1069-1078.

García J., Cantón R., García J.E., Gómez M., Martínez L., Rodríguez C., Vila J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. España. pp 22, 23.

García P., Fernández M., Paredes, F. (1993). Microbiología Clínica práctica. 2º edición. Cádiz, España. pp 51, 52, 135, 145,146.

García V. (2004). Introducción a la microbiología. 2ª edición. Costa Rica. pp 46-48.

Gayoso A. (2018). Captación de Cu(III) por polifenoles de corteza de pino radiata y sus derivados modificados, como estrategia para el desarrollo de resinas intercambiadoras de origen biológico. Tesis para optar al grado de Químico Ambiental, Facultad de Ciencias, UCSC, Concepción, Chile. p 35.

Gerding V. (1991). Management of *Pinus radiata* D. Don plantations in Chile. Instituto de Silvicultura, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. pp 3,4.

González A., Nieves B., Solórzano M., Cruz J., Puig J., Moreno M. (2013). Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. Revista chilena de infectología, 30(4). pp. 374-380.

González L. (1976). Introducción a la fitopatología. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica. pp 42, 43.

González R., Rosales M. (2003). Comparación de contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. Madera y bosques, 9 (2). pp 41-49.

Guirao X., Arias J. (2006). Infecciones quirúrgicas. Madrid, España. pp 38-40.

Hernández A. (2003). Microbiología industrial. EUNED, Costa Rica. pp 27-29.

Herrera J. (2016). Efecto bactericida de desinfectante sobre cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua* en superficies de usos en la industria alimentaria. Facultad de ciencias químicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. pp 5-6.

HMDB. The Human metabolome database. Disponible en: <http://www.hmdb.ca/>. Fecha de consulta: 25 de julio de 2018.

Howes F. (1953). Vegetable tanning materials. *Butterworths Scientific Publications*. p 325.

Huang K., Yang C., Huang S., Chen C., Lu Y., Lin Y. (2016). Recent advances in antimicrobial polymers: A Mini- Review. Taiwán. pp 2-9.

Iglesias J. (2009). Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. Universidad de Santiago de Compostela. España. pp 73.

Infor. (2017). El sector forestal Chileno 2017. Disponible en: wef.infor.cl/sector_forestal/sectorforestal.php#. Fecha de consulta: 18 de abril de 2017.

Jacas J., Caballero P., Avilla J. (2005). El control biológico de enfermedades y plagas. La sostenibilidad de la agricultura mediterránea. Universidad Pública de Navarra. España. p 134.

Kenawy E., Worley S., Broughton R. (2007). The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review. *Biomacromolecules*. Vol 8. pp 1359-1384.

Konaté K., Hilou A., Francois J., Nicaise A., Souza A., Barro N., Datté J., M'Batchi B., Nacoulma O. (2012). Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. pp 5,11.

Lastra J. (2001). Bosques naturales de Asturias. Universidad de Oviedo, España. pp 103-105.

Lin K., Tani T., Endo Y., Kodatna M., Teramoto K. (1996). Antimicrobial Activities of Iodinated Polystyrene Derivatives. *Artificial Organs*, 20(11). pp 1191-1195.

Liu P., Xu G., Pranantyo D., Xu L., Neoh K., Kang E. (2017). pH-Sensitive Zwitterionic Polymer as an Antimicrobial Agent with Effective Bacterial Targeting. Singapore. pp 40-46.

Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain I., Leza J., Moro M., Portolés A. (2015). *Farmacología Básica y Clínica*. Madrid. pp 793, 888-891.

MacFaddin J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3ª edición. Montevideo, Uruguay. p 764.

Marcano D., Hasegawa M. *Fitoquímica Orgánica*. (2002). Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas. pp 178-181.

Mattox D. (2010). Substrate (“Real”) Surfaces and Surface Modification. In: *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing*. 2nd Edition. p 746.

McManus PS., Stockwell V., Sundin, G., Jones, A. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40. pp 443-465.

Méndez R., Vidal G., Lorber K., Márquez F. (2007). Producción limpia en la industria de la curtiembre. Universidad Santiago de Compostela, España. pp 43,44.

Montoya H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Colombia. pp 74, 75, 222, 223.

Mora X. (2012). Diferenciando bacterias Gram+ y Gram- . *Revista Selecciones Avícolas*. España. pp 25-27.

Moovendhan M., Seedeve P., Shanmugam A., Shanmugam V. (2015). Antibiotic Susceptibility and Functional Group Characterization of *Pinna nobilis* Metabolites Against Clinical Isolates. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 5(1). pp 52-57.

Naidu A., Unal R., Tulpinski J. (2006). Bacteriocins: antimicrobial activity and applications. *Food Biotechnology*. Segunda edición. Florida, Estados Unidos. pp 1391-1417.

Ocampo P., Lázár V., Papp B., Arnoldini M., Wiesch P., Busa-Fekete R., Fekete G., Pál C., Ackermann M., Bonhoeffer S. (2014). Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics Is Prevalent. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58(8). pp 4573–4582.

Olivas E., Alarcón L. (2004). Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez. México. p18.

Pachón D. (2009). Aislamiento, identificación y serotificación de enterobacterias del genero *Salmonella* en una población de *Crocodyus intermedius* y testudinos mantenido en cautiverio en la estación de biología. Pontificia Universidad Javariana. Colombia. pp 62, 63.

Pahissa A. (2009). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Barcelona, España. pp 15-19.

Pilet M., Leroi F. (2011). Application of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fresh seafood and seafood products. *In Protective Culturesm Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*. Francia. pp 12-20.

Pisabarro A. (2008). Microbiología Clínica. España. pp 25-30.

Popok V., Jeppesen C., Fojan P., Kuzminova A., Hanuš J., Kylián O. (2018). Comparative study of antibacterial properties of polystyrene films with TiO_x and Cu nanoparticles fabricated using cluster beam technique. *Beilstein J. Nanotechnol.* pp 9, 861–869.

Prats G. (2006). Microbiología clínica. Universidad de Barcelona. Madrid, España. pp 49, 50.

Puchkov E. (2016). Image analysis in Microbiology: A review. *Journal of Computer and Communications*, Pushchino, Rusia. 4, pp 8-32.

Puupponen R., Nohynek L., Meier C., Kahkonen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman K. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol.* Centro de Investigación Técnica (VTT), Finlandia. pp 494-507.

Rattan S., Fernandes R., Demirovic D., Dymek B., Lima C. (2009). Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effect on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation Dose-Response. Department of Molecular Biology, Universidad de Aarhus, Dinamarca. pp 90-95.

Raviña E. (2008) . Medicamentos, un viaje largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos. Santiago de Compostela, España. p 404.

Raybaudi R., Mosqueda J., Soliva R., Belloso O. (2006). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobial. Lérida, España. pp 157-180.

Rebolo S. (2007). Estudio de composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Riveiro, Valdeorras y Ribeira Sacra. Departamento de química analítica, nutrición y bromatología, Facultad de ciencias, Universidad de Santiago de Compostela. España. pp 9-11.

Reyes-Jurado F., Palou E., López-Malo A. (2014). Temas selectos de ingeniería de alimentos: Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Puebla, México. pp 68-78.

Rivera D. (2016). Caracterización de patrones de resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* y asociación de riesgo según: origen, matriz alimentaria y serotipo. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias. Universidad de Chile, Santiago de Chile. pp 33-41.

Rocha R., Lozano P., Martínez Y. (2006). Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero II. Universidad autónoma de Puebla, México. pp 86, 87.

Rodríguez-Angeles G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5). pp 464-475.

Rodríguez E., Gamboa M., Hernández F., García J. (2012). Bacteriología general. Principios y prácticas de laboratorio. 1ª edición. San José, Costa Rica. p 339.

Rojas-Herrera R., González-Flores T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Volumen 31. No2. pp 70, 71.

Rosas I., Cravioto A., Ezcurra E. (2004). Microbiología ambiental. Instituto Nacional de Ecología, México. p 20.

Santos M., Fonseca A., Mendonça P., Branco R., Serra A., Morais P., Celho J. (2016). Recent Developments In Antimicrobial Polymers: A Review. Portugal. p 13.

Sastri R. (2014). Plastics in Medical Devices Properties, Requirements and Applications. 2nd Edition. p 305.

Silva R. (2004). Acción antimicrobiana de dos bacteriocinas lácticas sobre *Listeria monocytogenes* adheridas a una superficie de acero inoxidable. Facultad de ciencias agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. pp 31-41.

Slobodníková L., Fialová S., Rendeková K., Kováč., Mucaji P. (2016). Antibiofilm Activity Of Plant Polyphenols. Bratislava, Slovakia. pp 2-9.

Soto Z., Pérez L., Estrada D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. Salud Uninorte. Colombia. pp 105-122.

Stanier R., Ingraham J., Wheelis M., Painter P. (1992). Microbiología. 2da Edición. Barcelona, España. pp 22, 23, 483, 545, 546.

Taiz L., Zeiger E. (2006). Fisiología vegetal. Tercera edición. Universitat Jaume. p 534.

Vázquez C., Martín A., Silóniz M., Serrano S. (2010). Técnicas básicas de microbiología, Observación de bacterias. Serie microbiología. España. pp 20, 24.

Venegas A., Vásquez M. (2016). Effect of lantana camara essential oil on growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Universidad nacional de Trujillo, Trujillo, Perú. pp 32-35.

Vargas J., Echeverri L. (2010). *K. pneumoniae*: ¿La nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. Colombia. Vol. 23, nº2. pp 157-165.

Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. (2006). Koneman's color atlas textbook of diagnostic microbiology. Madrid, España. p 932.

Wrann J. (1988). Contenido de taninos en la corteza de Pino (*Pinus radiata* D.Don) según procedencia y edades distintas. Santiago, Chile. pp 69-72.

Xiao J.B., Capanoglu E., Jassbi A.R., Miron A. (2016). Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. p 56.

Zaidi M., Estrada T. (2014). Shigella: A highly virulent and elusive pathogen. México. pp 81-87.

ANEXOS

6.1 Método Kirby-Baüer.

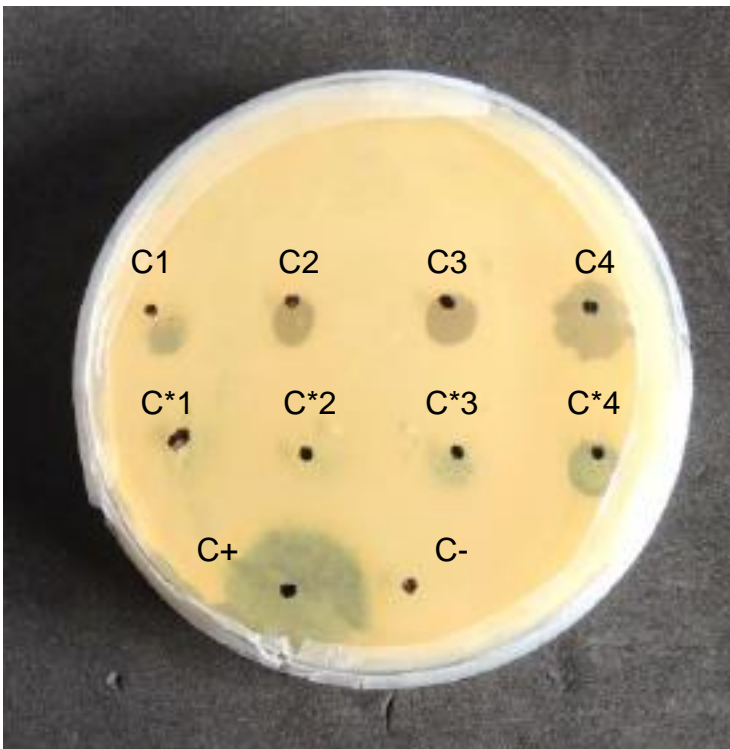
Imagen de referencia resultados difusión en agar para la medición de halo de inhibición, donde:

C1, C2, C3, C4: Corresponden a las concentraciones ascendentes (1000 ppm, 3000 ppm, 5000 ppm y 7000 ppm) del primer antibiótico.

C*1, C*2, C*3, C*4: Corresponden a las concentraciones ascendentes (1000 ppm, 3000 ppm, 5000 ppm y 7000 ppm) del segundo antibiótico.

C- : Corresponde al control negativo utilizado (Caldo+ bacteria)

C+ : Corresponde al control positivo utilizado (Estreptomicina 1000 ppm)



6.2 Curva hormética bifásica dosis-respuesta.

A) Curva en forma de “J”, que describe un fenómeno asociado a una disfunción biológica o daño tóxico. B) Curva en forma de “U” invertida representando una función biológica normal como crecimiento. C) detalle de la zona hormética en la curva de “U” invertida.

