



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Ingeniería en Alimentos

Acción antimicrobiana de extractos crudos
de especies de plantas nativas sobre
Escherichia coli y *Salmonella spp*

Memoria presentada como parte de los
requisitos para optar al **Título de
Ingeniero en Alimentos.**

María Angélica Ocares Cerón

VALDIVIA – CHILE
2012

PROFESOR PATROCINANTE:

Renate Schöbitz Twele
Tecnólogo Médico, MSc
Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias

PROFESORES INFORMANTES:

Luigi Ciampi Panno
Ingeniero Agrónomo, MSc, PhD
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal
Facultad de Ciencias Agrarias

Laura Otth Rademacher
Tecnólogo Médico
Instituto de Microbiología Clínica
Facultad de Medicina

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
1	INTRODUCCIÓN	3
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	Principales compuestos presentes en las plantas	5
2.1.1	Metabolitos primarios	5
2.1.2	Metabolitos secundarios	5
2.2	Extractos vegetales	8
2.2.1	Uso como agentes antimicrobianos	9
2.2.2	Efecto sobre bacterias gram negativas y gram positivas	10
2.2.3	Mecanismo de acción antimicrobiana	11
2.2.4	Microorganismos patógenos utilizados en este estudio	12
2.3	Especies de plantas nativas en estudio	13
2.4	Microorganismos patógenos utilizados en este estudio	15
2.4.1	<i>Escherichia coli</i>	16
2.4.2	<i>Salmonella</i> spp.	18

2.5	Potencial uso de extractos antimicrobianos como higienizantes	19
3	MATERIAL Y METODO	20
3.1	Cepas indicadoras	20
3.2	Material Vegetal	20
3.3	Obtención de los extractos	21
3.3.1	Secado y pulverización	21
3.3.2	Extracción	21
3.3.3	Eliminación del solvente	22
3.3.4	Resuspensión de los extractos	22
3.3.5	Esterilización de los extractos	22
3.4	Determinación de la actividad de los extractos vegetales	24
3.4.1	Prueba de antagonismo en placa	24
3.4.2	Prueba de inhibición en caldo	25
3.4.2.1	Preparación de la cepa indicadora	25
3.4.2.2	Preparación de los tratamientos	26
3.4.2.3	Recuento de células viables	27
3.5	Análisis estadístico	27
4	RESULTADOS Y DISCUSION	28
4.1	Selección de los extractos con actividad antagonista frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> spp.	28

4.1.1	Resultados de prueba de antagonismo en placa de extractos de plantas nativas frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> .	30
4.1.2	Resultados de prueba de antagonismo en placa de extractos de plantas nativas frente a cepas de <i>Salmonella</i> spp	33
4.2	Prueba de inhibición en caldo de los tratamientos con extractos	35
4.2.1	Inhibición de <i>E. coli</i> ATCC 25922.	36
4.2.2	Inhibición de <i>E. coli</i> ATCC 8739	37
4.2.3	Inhibición de <i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP).	39
4.2.4	Inhibición de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	40
4.2.5	Inhibición de <i>Salmonella enterica</i> serovar Anatum ATCC 9270	42
5	CONCLUSIONES	45
6	BIBLIOGRAFÍA	46
7	ANEXOS	51

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales grupos de compuestos generados por plantas	6
2	Especies nativas en estudio	13
3	Descripción botánica de las principales especies nativas en estudio	15
4	pH promedio de extractos metanólicos y clorofórmicos de diferentes especies de plantas nativas.	29
5	Diámetros de halos de inhibición (mm) de extractos frentes a cepas de <i>E. coli</i> .	30
6	Diámetros de halos de inhibición (mm) de extractos frente a cepas de <i>Salmonella</i> spp. frente a extractos vegetales	33

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Pared celular de bacterias gram negativas y gram positivas	10
2	Mecanismos de acción antimicrobiana de extractos vegetales en la célula	11
3	Esquema de obtención de extractos vegetales	23
4	Prueba de antagonismo en placa, para determinar la actividad de los extractos vegetales	24
5	Secuencia para la obtención de los inóculos de las cepas patógenas para la prueba de antagonismo en caldo	25
6	Prueba de antagonismo en caldo realizada en placas de microtitulación	26
7	Inhibición de <i>E. coli</i> en presencia de extractos de plantas nativas mediante la prueba de antagonismo en placa.	31
8	Inhibición de <i>Salmonella</i> spp en presencia de extractos de plantas nativas mediante la prueba de antagonismo en placa.	34
9	Acción antagonista en caldo soya tripticasa de tres extractos de plantas nativas frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922, a 37 °C.	36
10	Acción antagonista en caldo soya tripticasa de tres extractos de plantas nativas frente a <i>E. coli</i> ATCC 8739, a 37 °C.	38
11	Acción antagonista en caldo soya tripticasa de tres extractos de plantas nativas frente a <i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP), a 37 °C.	39

- | | | |
|----|--|----|
| 12 | Acción antagonista en caldo soya tripticasa de tres extractos de plantas nativas frente a <i>Salmonella</i> ATCC 14028, a 37 °C. | 41 |
| 13 | Acción antagonista en caldo soya tripticasa de tres extractos de plantas nativas frente a <i>Salmonella</i> ATCC 9270, a 37 °C. | 42 |

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Descripción de las especies nativas evaluadas	51
2	Resultados prueba de antagonismo en placa	56
3	Análisis estadístico de halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922	57
4	Análisis estadístico de halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos frente a <i>E. coli</i> ATCC 8739	58
5	Análisis estadístico de halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos frente a <i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP)	59
6	Análisis estadístico de halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos frente a <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	60
7	Análisis estadístico de halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos frente a <i>Salmonella enterica</i> serovar Anatum ATCC 9270	61
8	Resultados de los recuentos de células viables (Antagonismo en caldo)	62
9	Análisis estadístico del recuento de <i>E. coli</i> ATCC 25922 con los distintos tratamientos.	64
10	Análisis estadístico del recuento de <i>E. coli</i> ATCC 8739 con los distintos tratamientos	65

11	Análisis estadístico del recuento de <i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP) con los distintos tratamientos	66
12	Análisis estadístico del recuento de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028 con los distintos tratamientos	67
13	Análisis estadístico del recuento de <i>Salmonella enterica</i> serovar Anatum ATCC 9270 con los distintos tratamientos	68

RESUMEN

En el presente trabajo se seleccionaron 13 especies de plantas nativas que crecen entre la VII y IX región de Chile, con el objetivo de evaluar su capacidad antagonista frente a cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Los extractos crudos se obtuvieron a partir del material vegetal, el cual fue secado, pulverizado y puesto en contacto con solventes de diferente polaridad como agua, metanol y cloroformo. Luego se realizaron pruebas microbiológicas de antagonismo *in vitro*, utilizando las técnicas de difusión en agar e inhibición en caldo.

Las pruebas de antagonismo en placa se realizaron en un césped de las bacterias, estandarizado a una concentración de 10^5 ufc/mL, el cual fue inoculado con 25 μ L de cada extracto e incubado a 30° C por 24 h. Los extractos metanólicos de hoja de Lingue (*Persea lingue*), Ñirre (*Nothofagus antártica*), Luma (*Amomyrtus luma*), Picha (*Myrceugenia planipes*) y Meli (*Amomyrtus meli*) presentaron actividad antimicrobiana frente a todas las cepas utilizadas en este estudio, en comparación con los extractos metanólicos de Radal y Notro que sólo presentaron actividad antimicrobiana frente a *Salmonella entérica* serovar Typhimurium ATCC 14028. La prueba de comparación múltiple de Tukey, identificó que los extractos de Lingue, Ñirre y Picha arrojaron actividad antagonista significativamente mayor ($p < 0,05$) que las otras dos especies con todas las cepas bacterianas estudiadas. Sin embargo, se pudo observar que no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los extractos de Lingue y Picha frente a la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Una vez seleccionados los 3 extractos con mayor efecto antagonista (Lingue, Ñirre y Picha), se realizaron pruebas de inhibición en caldo, mediante la cual se pudo observar que los extractos metanólicos de las 3 especies presentaron efecto bactericida frente a todas las cepas evaluadas. Donde el extracto de Picha presentó el más amplio y rápido efecto bactericida, obteniendo a las 6 h de incubación una completa inhibición de la cepa *E. coli* ATCC 8939 y a las 8 h de las cepas *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* enteropatógena, *Salmonella* ATCC 14028 y *Salmonella* ATCC 9270.

SUMMARY

This work involved the selection of 13 species of native plants that grow between the VII and IX region of Chile, in order to evaluate the antimicrobial activity against strains *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. Crude extracts were obtained from plant material, which was dried, pulverized and placed in contact with solvents of different polarity as water, methanol and chloroform. Microbiological tests were then conducted *in vitro* using the agar diffusion technique and inhibition in broth cultures.

The plate antagonism tests were performed on a lawn of the bacteria standardized to a concentration of 10^5 CFU/ml, which was inoculated with 25ul of each extract and incubated at 30°C for 24 h. The methanol extracts of the leaves of Lingue (*Persea Lingue*), Ñirre (*Nothofagus antartica*), Luma (*Luma Amomyrtus*) Picha (*Myrceugenia planipes*) and Meli (*Amomyrtus meli*) showed antimicrobial activity against all strains used in this study, compared to the methanol extracts of Radal and Notro, which only showed antimicrobial activity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. The multiple comparison test of Tukey, identified that extracts of Lingue, Ñirre and Picha had a significantly higher activity ($p < 0,05$) against all strains. However, no significant differences ($p > 0,05$) were observed between extracts of Lingue and Picha against the strain *E. coli* ATCC 25922.

Once the three most effective extracts were selected (Lingue, Ñirre and Picha), broth inhibition tests were performed. These tests showed that the methanol extracts of the three plant species had a bactericidal effect against all strains. Among them the Picha extract had the widest and most rapid bactericidal effect, with a complete inhibition of the strain *E. coli* ATCC 8939 after 6 h of incubation and of the strains *E. coli* ATCC 25922, *E. coli enteropathogenic*, *Salmonella* ATCC 14028 and *Salmonella* ATCC 9270, after 8 h of incubation.

1 INTRODUCCION

La mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), son de origen microbiano, siendo éste uno de los problemas de salud pública de mayor impacto en el mundo. De acuerdo con lo anterior, es importante considerar la existencia de microorganismos de carácter patógeno, que son los principales responsables de dichas enfermedades y de graves intoxicaciones alimentarias.

Algunos de los microorganismos que se han asociado a las ETA son *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Estas bacterias, debido a su ubicuidad e incidencia, se han constituido en el blanco de acción de muchos de los sistemas de aseguramiento de la calidad en industrias alimenticias y ha conducido a la búsqueda de nuevas alternativas para su inhibición y eliminación. Es así como ha surgido el estudio del efecto antimicrobiano de sustancias de origen natural como extractos y aceites vegetales. Las investigaciones realizadas hasta el momento han demostrado el potencial de los extractos naturales como antimicrobianos, por lo cual la popularidad de los biocontroladores de origen vegetal continúa en aumento.

Hipótesis

Extractos crudos de especies de plantas nativas inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en pruebas realizadas *in vitro*.

En el presente estudio se han planteado los siguientes objetivos.

Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas, sobre *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

Objetivos específicos

- Obtener extractos crudos a partir de especies de plantas nativas recolectadas en zonas periféricas de la ciudad de Valdivia, mediante la técnica de extracción con solventes.
- Comprobar la capacidad inhibitoria *in vitro* sobre cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. de los extractos crudos de especies nativas por medio de la técnica de difusión en agar.
- Seleccionar tres extractos que presenten mayor actividad antagonista y realizar pruebas de antagonismo en caldo frente a las cepas de bacterias patógenas.

2 REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 Principales compuestos presentes en las plantas.

Las plantas son laboratorios naturales donde se biosintetizan una gran cantidad de sustancias químicas y de hecho se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Las plantas presentan dentro de su proceso de síntesis dos rutas metabólicas, una donde sintetizan los metabolitos primarios que son necesarios para el desarrollo de la propia planta y otra ruta metabólica donde se sintetizan en específico un metabolito secundario que en función de la genética de cada especie sintetiza este metabolito en mayor o menor proporción (COBIAN, 2007).

2.1.1 Metabolitos primarios. El metabolismo primario comprende aquellos procesos bioquímicos que cada sistema biológico debe llevar a cabo cada día para sobrevivir y reproducirse, entre los que se encuentran la glicólisis, ciclo de Krebs, cadena respiratoria, etc. Los principales metabolitos primarios son lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos que se caracterizan por tener una función metabólica directa al ser compuestos esenciales en las vías catabólica y anabólica, por lo que tienen que ser sintetizados si no están presentes en el medio en el que el organismo se desarrolla (CUADROS, 2010).

2.1.2 Metabolitos secundarios. Son compuestos químicos de estructura relativamente compleja, de distribución restringida y característica de fuentes botánicas específicas. Estos metabolitos son compuestos químicos sintetizados por los organismos y tienen como precursores a los metabolitos primarios (CUADROS, 2010).

Los metabolitos secundarios permiten que se lleven a cabo interacciones entre los organismos y su ambiente. Muchos de ellos, cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas) o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas (GARCIA, 2004).

Entre estos metabolitos secundarios son comunes aquellos que presentan alguna actividad biológica (Cuadro 1). Es por esto que en la actualidad existe un enorme interés en el estudio de plantas ya sea empleándola como materia prima para la producción de extractos o para el aislamiento de estas sustancias puras que actúen como agentes antimicrobianos (COBIAN, 2007).

CUADRO 1 Principales grupos de compuestos generados por plantas

Grupo Químico	Compuesto	Planta	Actividad
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (tomillo)	General
	Acido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	<i>S. aureus</i> , <i>S. thyphimurium</i>
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella</i>
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	VIH
Taninos		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias y virus
		<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	Virus
		<i>Melissa officinalis</i> (melisa)	
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus
Flavonas	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>S. mutans</i>
	Isoflavona	<i>Millettia thonningii</i>	<i>Schistosoma</i>
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
Alcaloides	Coca	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Cocos gram positivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, <i>Lactobacillus</i>
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	General

Fuente: DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003

Estos grupos de compuestos generados por plantas se describen a continuación:

- **Compuestos fenólicos simples:** Son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol, el ácido cinámico y el ácido cafeico. Muchos fenoles se encuentran en estado oxidado en esencias entre ellos el estragol, el apiol y el atenol. Plantas productoras de compuestos de estas características son el tomillo (*Thymus vulgaris*) y la manzanilla (*Matriarca chamomilla*). El mecanismo de acción antimicrobiana parece estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados. Dentro de este grupo cabe destacar también los aceites esenciales, compuestos causantes del agradable olor de determinadas plantas y algunos con poder antimicrobiano, como el mentol obtenido de la menta (Menta piperita) y la capsaicina de la planta conocida como pimiento rojo o chile (*Capsicumm annum*) (DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003).

- **Quinonas:** Son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio. Un ejemplo es la hipericina, una antraquinona aislada de la planta de San Juan (*Hypericum perforatum*) (DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003).
- **Taninos:** El término “tanino” se empleó para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados, en función de que puedan o no ser hidrolizados. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias. Un ejemplo es el tanino presente en el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003).
- **Cumarinas:** Son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente en las familias Umbeliferae y Rutaceae. Se encuentran en todas las partes de la planta desde la raíz hasta los frutos siendo más abundante en estos últimos. Se presentan a menudo como mezclas, en forma libre o como glicósidos. En los últimos años han despertado gran interés por el amplio rango de actividad biológica que muchas cumarinas han demostrado como por ejemplo la acción antibacterial del dicumarol (ARANGO, 2010).
- **Flavonas:** Son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo y constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se deba a su capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, además de presentar actividad sobre la pared celular de forma similar a las quinonas. Mención especial merecen las catequinas, presentes en el té verde (*Camellia sinensis*), las cuales ejercen actividad frente a *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, *Shigella* y otros microorganismos. Otros flavonoides tienen en general actividad antiviral, como la glicirricina, sintetizada por el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) (DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003).

- **Alcaloides:** Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos. Pertenecen a este grupo, entre otros, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. Un ejemplo son los derivados de la corteza de *la Cinchona officinalis* (quinina y quinidina), utilizados en el tratamiento de la malaria. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (DOMINGO y LÓPEZ-BREA, 2003).

2.2 Extractos vegetales.

Se han definido como un concentrado obtenido por el tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (LIZCANO y VERGARA, 2008).

Cuando la materia vegetal seca se pone en contacto con el solvente se inicia un proceso opuesto al del secado, es decir, se reconstituye el estado original de la célula. El proceso extractivo empieza cuando el solvente penetra en la célula, logrando sacar el aire contenido en el citoplasma. Para el aislamiento de metabolitos secundarios los solventes más empleados son: agua, alcohol etílico, glicerina, propilenglicol y sus mezclas (SULCA, 2010).

Un extracto vegetal puede ser líquido, semisólido o en polvo y se puede obtener por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos, a partir de una fuente vegetal y puede ser utilizado en cualquier campo de la tecnología (LIZCANO y VERGARA, 2008).

Los extractos vegetales se pueden obtener de diferentes partes de las plantas como:

- las hojas (ajenjo, albahaca, eucalipto, hierbabuena, menta, romero, salvia, toronjil, etc.)
- las raíces (ásaro, azafrán, cúrcuma, jengibre, sándalo, valeriana, etc.)
- pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.)
- el tallo (canela)
- las flores (lavanda, manzanilla, tomillo, clavo de olor, etc.)
- los frutos (cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.)

2.2.1 Uso como agentes antimicrobianos. Las sustancias naturales se han utilizado desde épocas antiguas, como sustancias aromáticas y como preservantes. Sin embargo, estas cubren un amplio espectro de actividades tales como efectos farmacológicos, antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos y biocidas contra una amplia gama de organismos como: bacterias, hongos, virus, protozoos e insectos (GÚIZA y RINCON, 2007).

Según lo señalado por KALEMBA (2003), se ha estudiado la importancia de estos extractos debido a su disponibilidad, a los pocos efectos secundarios y a la baja toxicidad que puedan causar, así como también a la mejor biodegradabilidad comparados con antimicrobianos y preservantes disponibles en la actualidad. Por todas estas propiedades, se ha evaluado el control que pueden ejercer estos compuestos contra microorganismos patógenos en alimentos, y por tanto, la posibilidad de ser utilizados como un método de eliminación (ULTEE *et al.*, 2002).

ISMAIEL y PIERSON (1990), han reportado que más de 1.340 plantas son un recurso potencial de compuestos antimicrobianos. De dichos compuestos se menciona que cerca de 80 productos de origen vegetal contienen altos niveles de antimicrobianos con uso potencial en alimentos como por ejemplo: clavo de olor, ajo, cebolla, salvia, romero, cilantro, perejil, orégano, mostaza y vainilla entre otros.

A partir de los años 90 se han publicado numerosos estudios sobre la actividad antimicrobiana de extractos de plantas, utilizando extractos de especias, hierbas secas aceites esenciales o sus componentes, encontrando efecto antibacteriano frente a diversos tipos de bacterias como por ejemplo *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli O157:H7*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, y *Staphylococcus aureus* (BURT, 2004) (RIOS y RECIO, 2005). También se ha reportado actividad frente a *Aeromonas hydrophila* *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, y levaduras (TAJKARIMI *et al.*, 2010).

2.2.2 Efecto sobre bacterias gram negativas y gram positivas. La mayoría de los estudios que investigan la acción de extractos vegetales contra los microorganismos patógenos causantes de las ETA y del deterioro de productos alimenticios han concordado, en general, que dichos extractos presentan una mayor actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas que a bacterias gram negativas (HERRERA y GARCÍA, 2006). El hecho que los microorganismos gram negativos sean menos susceptibles a la acción de antibacterianos, se debe a que estos poseen una membrana externa que rodean la pared celular que restringe la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de los lipopolisacárido que la cubren (VAARA, 1992).

Como se puede observar en la Figura 2 en bacterias Gram positivas de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus*, la pared se encuentra inmediatamente accesible y constituye un blanco ideal, sin embargo, en bacterias Gram negativas (*Enterobacterias*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* etc.), el grosor de la pared es mucho menor y se encuentra entre 2 membranas, lo que dificulta e impide el acceso directo de la sustancia antimicrobiana hacia el interior de la célula (SANCHEZ, 2006).

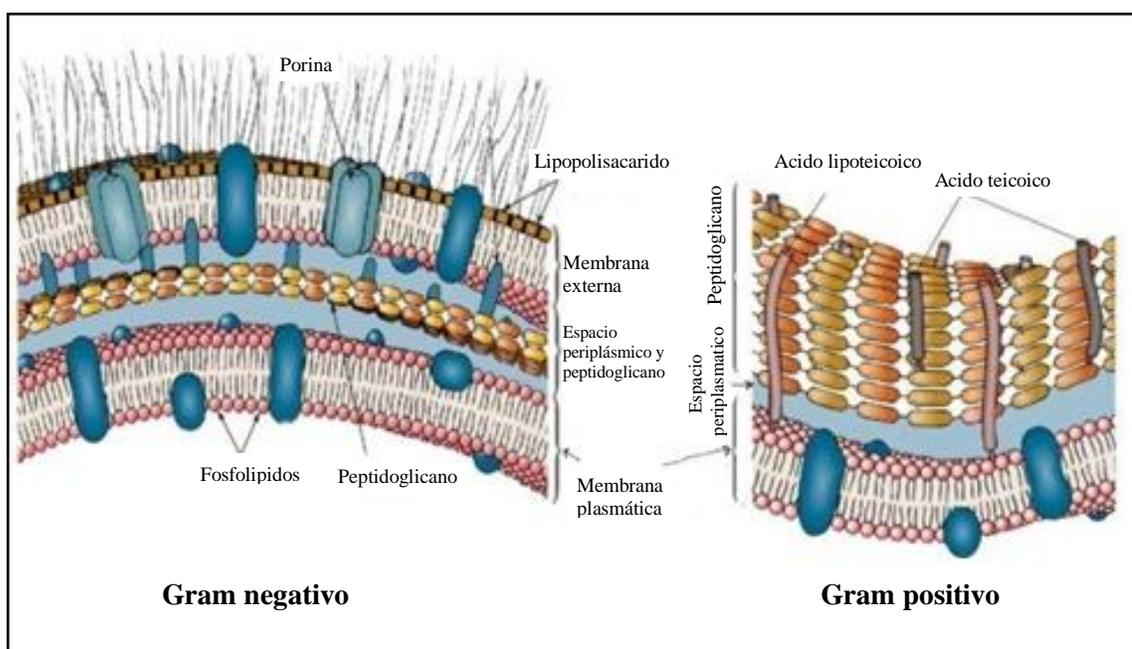


FIGURA 1 Pared celular de bacterias gram negativas y gram positivas.

FUENTE: SANCHEZ (2006).

2.2.3 Mecanismo de acción. Los mecanismos por los cuales los principios activos de las plantas pueden causar la destrucción o inhibición de los microorganismos se han atribuido a los metabolitos antimicrobianos que actuarían en los siguientes puntos: degradación de la pared celular, daño a la membrana citoplasmática, daño a las proteínas de membrana, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y el agotamiento de la fuerza motriz de protones (ULTEE *et al.*, 2002).

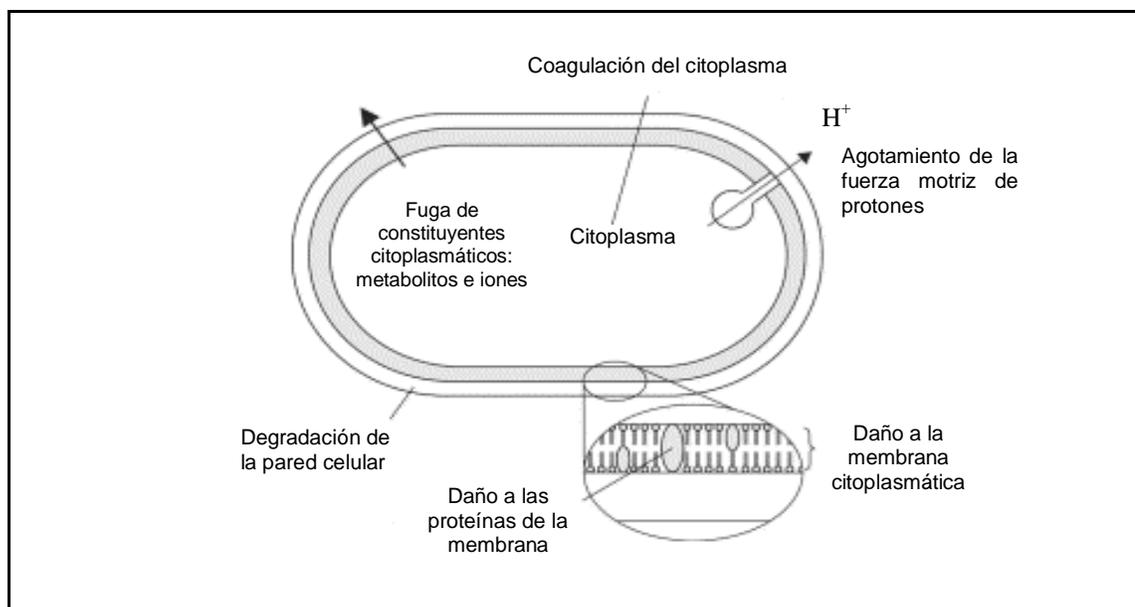


FIGURA 2 Mecanismos de acción antimicrobiana de extractos vegetales en la célula.

FUENTE: BURT (2004).

Los taninos precipitan las proteínas, fenómeno que, al ocurrir en la membrana citoplasmática bacteriana, altera la permeabilidad de la misma provocando, el intercambio de sustancias nutritivas y de desecho llevando finalmente a la muerte celular (ABAD, 2009). Los compuestos esteroidales pueden interferir en determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana y los triterpenos, por su parte, pueden actuar siguiendo diversos mecanismos, dependiendo de su naturaleza química, los de naturaleza hidrocarbúrica, por ejemplo, tienen generalmente acción depresora sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. Los triterpenos de naturaleza alcohólica alterarían la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte (ABAD, 2009).

La información disponible actualmente respecto al mecanismo de acción de los aceites esenciales es escasa, sin embargo en lo reportado se coincide que el carácter hidrofóbico de los aceites esenciales les permite incorporarse en los lípidos de las membranas bacterianas perturbando su estructura y consecuentemente su permeabilidad, dando lugar a las fugas de iones y otros contenidos celulares vitales, conduciendo finalmente a la muerte de la célula. Los aceites esenciales también podrían actuar sobre las proteínas de la membrana citoplasmática alterando la interacción lipido-proteína y afectando la actividad de enzimas como la ATPasa, disminuyendo la producción de energía requerida para el funcionamiento celular, otra posible acción sería la interacción directa de los componentes lipofílicos con las partes hidrofóbicas de la molécula de proteína (ULTEE *et al*, 2002). Sin embargo, según BURT (2004), se requiere de más investigación para elucidar los mecanismos de acción e interacciones que pueden ocurrir tanto en el microorganismo, como en el alimento que se pretende conservar con extractos como aceites esenciales individuales o en mezclas, lo que conllevará a establecer su inocuidad como bioconservadores, su potencial uso y la mejor forma de aplicación.

2.2.4 Plantas que destacan por su actividad antimicrobiana. Algunas hierbas o especias con aceites esenciales ricos en terpenos y compuestos fenólicos que poseen alta actividad antimicrobiana incluyen a la pimienta, albahaca, laurel, clavo de olor, canela, cúrcuma, eucalipto, extracto de semilla de toronja, orégano, rábano, romero, salvia, tomillo, valeriana, estragón, entre otras (DRAUGHON, 2004).

Algunas especias como el clavo de olor, pimienta y canela presentan una alta actividad antimicrobiana, la cual se atribuye al eugenol (2-metoxi-4 alil fenol) y al aldehído cinámico que son sus principales constituyentes volátiles. En tanto, el tomillo y el orégano que se utilizan en la industria alimenticia como sazónadores y bioconservadores culinarios, contienen aceites esenciales que se consideran de fuerte actividad inhibitoria contra bacterias, hongos y levaduras, donde los terpenos carvacrol, *p*-cimeno y timol son los principales componentes volátiles de estas especias, siendo el timol el que se encuentra en mayor proporción con un 50% en el orégano y 43% en el tomillo (BURT, 2004).

2.3 Especies de plantas nativas en estudio

Las características geográficas de Chile permiten que en el territorio exista una gran variedad de climas, esta diversidad de factores climáticos y ambientales hace que las plantas chilenas deban adaptarse a una amplia gama de condiciones de vida, las que en su mayoría son bastante extremas. Nuestro país tiene muchas especies que forman la selva húmeda y tupida sureña, que recuerda la selva tropical por su apariencia, pero cuyas plantas pueden soportar temperaturas bajo cero durante meses sin ningún problema (www.florachilena.cl).

La flora nativa de Chile no sólo ha sido fuente de interés para botánicos, etnobotánicos y científicos en general, sino también para los pueblos ancestrales, que le daban un uso a este recurso, pero con un enfoque vital, puesto que era la base de su dieta, su cobijo, su medicina y el origen de sus ritos. En nuestro país la flora nativa se utiliza actualmente como fuente medicinal, nutricional, ornamental e industrial. Además se puede decir que aproximadamente el 50 % de las plantas "grandes", esto es, árboles o arbustos, tienen o tenían aplicaciones prácticas, en su mayoría bien documentadas en la literatura (www.chileflora.com). Es por esto que en este estudio se seleccionaron 13 especies nativas arbóreas pertenecientes a las zonas centro sur de nuestro país, las cuales se describen en detalle en el Anexo 1 y cuyo listado se presenta a continuación:

CUADRO 2 Especies nativas en estudio.

Nº	Nombre común	Nombre Científico	Familia	Parte utilizada
1	Lingue	<i>Persea lingue</i>	LAURACEAE	Hojas
2	Ñirre	<i>Nothofagus antarctica</i>	NOTHOFAGACEAE	Hojas
3	Luma	<i>Amomyrtus luma</i>	MYRTACEAE	Hojas
4	Sauco	<i>Pseudopanax laetevirens</i>	ARALIACEAE	Hojas
5	Canelo	<i>Drimys winteri</i>	WINTERACEAE	Hojas
6	Temu	<i>Blepharocalyx cruckshanksii</i>	MYRTACEAE	Hojas
7	Tineo	<i>Weismannia trichosperma</i>	CUNONIACEAE	Hojas
8	Raulí	<i>Nothofagus alpina</i>	NOTHOFAGACEAE	Hojas
9	Picha	<i>Myrceugenia planipes</i>	MYRTACEAE	Hojas
10	Melí	<i>Amomyrtus meli</i>	MYRTACEAE	Hojas
11	Radal	<i>Lomatia hirsuta</i>	PROTEACEAE	Hojas
12	Notro	<i>Embothrium coccineum</i>	PROTEACEAE	Hojas
13	Pillo Pillo	<i>Ovidia pillopillo</i>	THYMELAEACEAE	Hojas - Corteza

FUENTE: Elaboración propia en base a www.chileflora.com

En el Cuadro 3 se describen detalladamente las principales especies de flora nativa evaluadas en este estudio:

CUADRO 3 Descripción botánica de las principales especies nativas en estudio.

<p>Nombre común: Lingue Nombre científico: <i>Persea lingue</i> Familia: LAURACEAE Género: PERSEA</p> <p>Distribución y Hábitat: Lingue crece desde Quillota hasta Chiloé (V a X región), bajo los 900m s.n.m., en ambas cordilleras y el valle central. Habita en suelos más o menos profundos.</p> <p>Descripción: Árbol siempre verde que alcanza una altura de hasta 30m y un diámetro de hasta 80cm, corteza gruesa y rugosa de color café a cenicienta. Hojas alternas de forma elíptica a ovadas con el margen ligeramente revoluto, haz de color verde lustroso y nervadura muy notoria. Flores hermafroditas dispuestas en inflorescencias de 3-6cm.</p> <p>Usos: La madera es de excelente calidad para muebles y construcción. La corteza es rica en taninos por lo que se utiliza en curtiembres y para teñir de color café. Las hojas se utilizan en medicina popular como astringentes y del fruto se prepara una chicha.</p> <p>Etimología: <i>Persea</i>, en honor a Perseo, héroe griego. Lingue, nombre Mapuche de la planta.</p>	
<p>Nombre común: Ñirre, ñire, ñirri, ñiré, ngire, Nombre científico: <i>Nothofagus antártica</i> Familia: NOTHOFAGACEAE Género: NOTHOFAGUS</p> <p>Distribución y Hábitat: Ñirre crece desde Curicó hasta el Cabo de Hornos (VI a XII región), también en Argentina. Habita en lugares con suelos pobres, bajas temperaturas y fuertes vientos, llegando hasta el límite altitudinal arbóreo donde crece de forma achaparrada.</p> <p>Descripción: Árbol de follaje deciduo, de hasta 20 metros de altura. Su tronco es cilíndrico, nudoso o tortuoso, de unos 60 cm de diámetro. La corteza es rugosa, gris y agrietada irregularmente. Hojas alternas, de forma ovada a ovado-elíptica, base oblicua y ápice redondeado, márgenes lobulados y ondulados.</p> <p>Usos: La madera es de calidad inferior, utilizada principalmente como leña.</p> <p>Etimología: <i>Nothofagus</i>, del latín = falsa haya. Antártica, de la región antártica, del sur. Ñirre, nombre Mapuche de la planta.</p>	

Nombre común: Picha

Nombre científico: *Myrceugenia planipes*

Familia: MYRTACEAE

Género: MYRCEUGENIA

Distribución y Hábitat: Picha se distribuye desde Aconcagua hasta Chiloé continental (IV a X región), también en Argentina. Habita sitios húmedos junto a esteros y lagos, inclusive dentro del agua.



Descripción: Árbol pequeño, siempreverde que alcanza una altura de hasta 15m y un diámetro de hasta 60cm, su tronco presenta fisuras longitudinales gruesas que lo hacen aparecer como si tuviera troncos de enredaderas adosados a él, corteza de color pardo-cenicienta. Hojas opuestas de margen entero y de forma elíptica, ápice y base, Nervio medio prominente en el envés.

Usos: La picha es muy importante en la protección de los cursos de agua.

Etimología: Myrceugenia, combinación de los géneros Myrcia y Eugenia, pertenecientes a la misma familia.

Fuente: Elaboración propia en base a <http://www.chilebosque.cl/libroarbolesnativos.html>

2.4 Microorganismos patógenos para el estudio.

La transmisión de enfermedades a través del consumo de alimentos es un fenómeno ya conocido en todo el mundo, se ha constatado el aumento de su frecuencia, cambios en las etiologías predominantes y en la dinámica epidemiológica. De este modo, se han producido fenómenos mundiales tales como la reaparición del cólera epidémico en las Américas, el aumento de la frecuencia de *Salmonella* Enteritidis vinculada al consumo de aves y huevos y la aparición de otros agentes en la transmisión a través de los alimentos como son *E. coli* 0157:H7 y *L. monocytogenes*. Es por esto que el Comité de Expertos de la OMS ha planteado que la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos de origen microbiano son causadas principalmente por patógenos como: *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *S. aureus* y *Toxoplasmodium gondii* (BURT, 2004).

2.4.1 E. coli. Esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, género *Escherichia*, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no formador de esporas que está presente en el intestino de los animales y del hombre, así como también en suelos. Fue inicialmente descrito por Theodor Escherich en 1885 con el nombre de *Bacterium coli*, tras aislarlo a partir de muestras fecales procedentes de niños con enteritis (JAWETZ *et al.*, 2008).

Las infecciones por *E. coli* en humanos se transmite directamente de los animales, por contacto persona a persona, por alimentos y aguas contaminadas (BELL, 2002). La presencia de esta bacteria en alimentos indica contaminación de origen fecal, razón por la cual es usado como un indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en agua, leche y otros productos (JAY, 2000).

Cepas de *E. coli* enteropatógenas se ha convertido en la actualidad, en uno de los tipos de bacteria de mayor preocupación en la industria alimenticia, ya que se le ha catalogado como uno de los principales agentes causales de epidemias por contaminación de alimentos, provocando en los seres humanos severos trastornos gastrointestinales, principalmente en niños y ancianos (CAREY *et al.*, 2008).

En base a los síndromes y características de la enfermedad en humanos, las cepas de *E. coli* se han clasificado en cinco grupos de virulencia (JAY, 2000):

- *E. coli* enteropatógenos clásicos (ECEP)
 - *E. coli* enterotoxigénicos (ECET)
 - *E. coli* verotoxigénicos (ECVT)
 - *E. coli* enteroinvasivo (ECEI)
 - *E. coli* enterohemorrágicos (ECEH)
-
- ***E. coli* enteropatógenos clásicos (ECEP):** Estas cepas se pegan a las vellosidades intestinales impidiendo los mecanismos de absorción y secreción. Este efecto se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades y por una adherencia destructiva a la membrana de las células epiteliales (RODRIGUEZ, 2005).

- ***E. coli* enterotoxigénicos (ECET):** La ECET es considerada como la más importante causa de la “diarrea del viajero”. Estas cepas colonizan el epitelio intestinal produciendo una diarrea acuosa. Los ECET poseen mecanismos de adhesión que les permiten colonizar la superficie de la mucosa del intestino delgado, soportando el peristaltismo intestinal (RODRIGUEZ, 2005).
- ***E. coli* verotoxigénicos (ECVT):** Su descubrimiento se produjo al observar que ciertas cepas de *E. coli* producían un efecto citopático irreversible en las células de la línea celular Vero. Algunas de las complicaciones de la infección por *E. coli* productora de verotoxinas son falla renal, disminución de plaquetas y anemia. Afecta a todas las edades, sin embargo, la mayor tasa de incidencia se registra en menores de 5 años (RODRIGUEZ, 2005).
- ***E. coli* enterohemorrágicos (ECEH):** Estas cepas se identificaron en 1982 en Estados Unidos, donde ocasionaron brotes en varios Estados, desde entonces se han descrito epidemias en diversos países del mundo. El agente etiológico principal es *E. coli* O157:H7, aunque intervienen otros. Presenta un cuadro diarreico con deposiciones acuosas y sanguinolentas, sin leucocitos en las heces, lo cual establece la diferencia con la shigelosis y la disentería causada por *E. coli* enteroinvasivo. En algunos casos se presenta síndrome urémico hemolítico y de púrpura trombocitopénica trombótica. El modo de transmisión puede darse por alimentos contaminados, principalmente por carne de res poco cocida. También se puede transmitir por leche cruda, carne molida sin una adecuada manipulación y un buen grado de cocción. Se han vinculado brotes por agua sin desinfección y más recientemente han sido detectados casos implicados a alimentos como frutas, hortalizas, zumos, yogur, etc. (RODRIGUEZ, 2005).
- ***E. coli* enteroinvasivo (ECEI):** Los serotipos pertenecientes a este grupo causan una diarrea similar a la causada por *Shigella dysenteriae*. Consiste en una diarrea febril inflamatoria, con leucocitos y glóbulos de pus, lo cual la diferencia de una diarrea por cólera o por la causada por *E. coli* enterotóxica. Los ECEI tienen la capacidad de invadir las células epiteliales del colon, proliferar y causar necrosis (inflamación y ulceración de la mucosa) del tejido del colon y del tejido epitelial, lo que da como resultado final una diarrea sanguinolenta con fiebre (RODRIGUEZ, 2005).

La contaminación de alimentos por estas cepas de patógenos entéricos son una causa importante de enfermedades diarreicas en los países en vías de desarrollo que resulta en altos índices de morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas significativas. *E. coli* enteropatógena (EPEC) es una causa importante de diarrea infantil en estos países y es responsable de brotes esporádicos en países desarrollados. EPEC se ha aislado de una gran variedad de alimentos tales como carne, mariscos, verduras, frutas, leche y en especial de productos lácteos. La sustitución de la lactancia materna para la alimentación con leche de vaca, que es un alimento barato y popular, aumenta considerablemente el riesgo de contraer diarrea por EPEC, especialmente para los bebés menores de 6 meses de edad (CARNEIRO *et al.*, 2006).

2.4.2 *Salmonella* spp. El género *Salmonella* es miembro de la familia Enterobacteriaceae. Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, no formadora de esporas, que no requiere condiciones estrictas de crecimiento. Las bacterias de *Salmonella* spp. son móviles (excepto *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*) y desarrolla flagelos periferales. Pueden crecer en un rango de temperatura de 5-45°C con una temperatura óptima entre 35-37°C. Pueden crecer a pH bajos y son generalmente sensibles a altas concentraciones de sal. Son capaces de proliferar y sobrevivir en diversos ecosistemas tal como la producción de alimentos e instalaciones de procesamiento (BHUNIA, 2008). Existen más de 2.400 serotipos de la bacteria *Salmonella*, siendo las más comunes *Salmonella entérica* serovariedad Typhimurium y *Salmonella entérica* serovariedad enteritidis (JAY, 2005).

Salmonella spp. es considerada uno de los mayores problemas de la industria de los alimentos, debido a que afecta su inocuidad, incrementando el riesgo de ocasionar infecciones alimentarias en humanos, y la transmisión de cepas multirresistentes a través de los alimentos (RODRIGUEZ, 2011). Las principales fuentes de infección en el ser humano son las aves de corral, los huevos, los productos lácteos y alimentos preparados o manipulados inapropiadamente o previamente contaminados (MURRAY, 2009). Este patógeno causa una infección en humanos caracterizada por gastroenteritis la cual se manifiesta en diarrea, vómitos, fiebre, calambre abdominal y dolores de cabeza. *Salmonella* Typhimurium causa serias enfermedades en niños e

individuos inmunocomprometidos, resultando a menudo en infecciones sistémicas (BHUNIA, 2008).

2.5 Potencial uso de extractos antimicrobianos como higienizante

En las industrias de procesamiento de alimentos, las superficies de equipos de acero inoxidable y utensilios son conocidos por ser los principales sitios de adhesión de bacterias, con la consiguiente formación de biopelículas en los entornos de procesamiento industrial. Esto representa una fuente potencial de contaminación que puede conducir al deterioro de alimentos o a la transmisión de las ETAS (MATTOS *et al.*, 2010).

Para reducir la contaminación de los alimentos, en los últimos años, se ha dado prioridad a la limpieza eficiente y a la creación de programas de desinfección que eliminen el riesgo de contaminación de los alimentos por microorganismos presentes en las superficies industriales. Con este fin dichos microorganismos deben ser atacados con higienizantes o biocontroladores en los lugares de procesamiento. La industria, en estos días sin embargo, enfrenta el problema que algunos higienizantes de amplio espectro antimicrobiano, son poco efectivos contra patógenos como *Listeria monocytogenes*. Es por ello, que se están estudiando nuevos productos como higienizantes de superficies, con mayor especificidad frente a determinados patógenos comunes en alimentos, donde los extractos de plantas han surgido como una buena alternativa, utilizándolos en forma líquida por aspersion en superficies de trabajo y equipos (DE ANCOS *et al.*, 2006).

Los aceites esenciales de condimentos, plantas aromáticas y plantas medicinales han sido evaluados recientemente con miras a la posibilidad del uso de estos metabolitos secundarios o sus constituyentes como desinfectantes en la industria alimentaria. Los resultados obtenidos han sido prometedores, pero divergentes debido a que la información disponible sobre el uso de aceites esenciales como desinfectantes es aun limitada, apuntando a la necesidad de estudios adicionales para su materialización (MATTOS *et al.*, 2010).

3. MATERIAL Y METODO

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, entre los meses de Septiembre de 2010 y Enero de 2011.

3.1. Cepas indicadoras.

Como cepas indicadoras o sensibles para los ensayos de actividad de las sustancias antimicrobianas se utilizaron *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739, *Salmonella entérica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella entérica* serovar Anatum ATCC 9270 (Laboratorio de Referencia, Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile) y *E. coli enteropatógena* (ECEP) (Laboratorio de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile), las que fueron cultivadas en caldo de soya tripticasa (CST) durante 24h a 37°C. Para su mantención se congelaron a $-18 \pm 1^{\circ}$ C con 1% de glicerol, como crioprotector.

3.2. Material vegetal.

Se seleccionaron especies vegetales cuyo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos patógenos no ha sido estudiado. Esta selección de especies nativas se llevó a cabo utilizando como motor de búsqueda catálogos electrónicos de bosques nativos de la zona centro sur de nuestro país.

Las 13 especies nativas seleccionadas para este estudio fueron recolectadas durante el mes de Septiembre en diversas zonas periféricas de la ciudad de Valdivia. De cada especie se cortaron manualmente aquellas hojas completamente expandidas en la temporada, seleccionando las hojas sanas, sin síntomas de infecciones y libres de daños por insectos o patógenos.

3.3. Obtención de los extractos (Figura 3).

3.3.1. Secado y pulverización. Las hojas de cada especie se dejaron secar en bolsas de papel debidamente identificadas, en un área fresca y seca resguardada de la luz, por un periodo aproximado de 8 días a temperatura ambiente (20°C aproximadamente) hasta que las hojas se quebraran al tacto. A continuación, se cortaron de forma manual hasta un largo aproximado de 1,0 cm y posteriormente se trituraron con una máquina de uso doméstico, Minipimer, marca Electrocom (CLAUSSEN, 2009).

3.3.2. Extracción. Para la obtención de los extractos vegetales se empleo el método de extracción de lípidos Bligh and Dyer (1945), citado por Muñoz (2011)¹ para esto, se siguieron los siguientes pasos:

- Se pesaron 5 gramos de hojas secas pulverizadas en un frasco schott de 250 ml
- Se agregaron los 3 solventes a utilizar: metanol (97%), cloroformo (97%) y agua destilada en la siguiente proporción:

$$5\text{g de hoja} \left\{ \begin{array}{l} 50\text{ml de metanol} \\ 25\text{ml de cloroformo} \\ 20\text{ml de agua destilada} \end{array} \right. \quad \underline{\text{Proporción inicial: (2:1:0,8)}}$$

- Los frascos schott que contenían los solventes más el material vegetal pulverizado, se mantuvieron en agitación en un agitador Orbital Shaker por 1h a 180 rpm.
- Luego de 1 hora de agitación se agregaron nuevamente las siguientes cantidades de solventes:

$$5\text{g de hoja} \left\{ \begin{array}{l} 25\text{ml de cloroformo} \\ 20\text{ml de agua destilada} \end{array} \right. \quad \underline{\text{Proporción final: (2:2:1,8)}}$$

¹ Muñoz, V. (2011). Tesis de Magister en Ciencias mención Microbiología, en desarrollo.

- Luego de cambiar la proporción de los solventes se formaron claramente 2 fases:
 - la superior: metanol+agua
 - la inferior: cloroformo
- Ambas fases fueron coladas para remover el material grueso y centrifugadas a 5000 rpm por 10 min para obtener una mejor separación de fases.
- Finalmente ambas fases fueron filtradas con papel filtro Whatman N°1 sobre embudos, recolectando en un frasco limpio cada fase para posteriormente eliminar el solvente.

3.3.3. Eliminación del solvente. Los solventes de ambas fases fueron eliminados a través de un sistema artesanal que consiste en eliminar el metanol y el cloroformo a baño maría (temperatura no mayor a 45°C) bajo ventilación dirigida con bomba de pecera en una campana de extracción (CLAUSSEN, 2009).

3.3.4. Resuspensión de los extractos. Los extractos fueron resuspendidos al 40%, los extractos metanólicos se disolvieron en agua destilada estéril y los clorofórmicos en metanol.

3.3.5. Esterilización de los extractos. Los extractos se esterilizaron a través de filtración por membrana, utilizando filtros Millipore de 0,22µm y se almacenaron en refrigeración en tubos falcón estériles cubiertos con papel aluminio durante 24 horas, hasta su utilización.

Cabe señalar que los extractos estériles pueden ser almacenados por un periodo máximo de 1 mes a -20° C sin alterar sus componentes activos (ABOABA *et al.*, 2006).

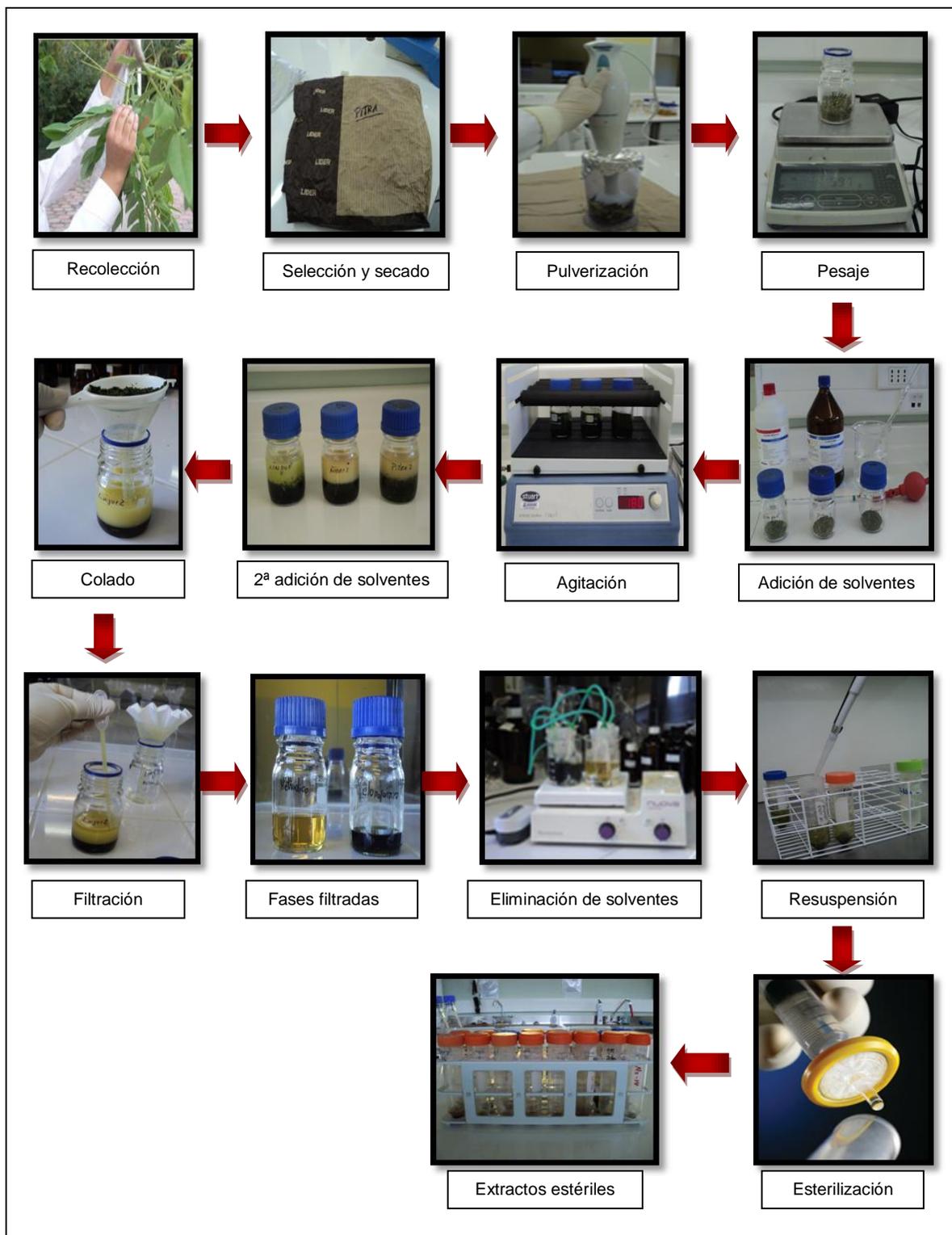


FIGURA 3 Esquema de obtención de extractos vegetales.

Fuente: Elaboración propia

3.4. Determinación de la actividad de los extractos vegetales

3.4.1 Prueba de antagonismo en placa. A partir de un cultivo de 24 h en caldo soya triptica (CST) de cada cepa indicadora (3.1) se realizaron diluciones en buffer fosfato salino, hasta obtener una concentración final de 10^5 ufc/ml en agar semisólido soya triptica (con 0,75% de agar). Este fue vertido sobre placas de 90 mm de diámetro con 30 mL de agar ST y se dejó secar por 30 min bajo campana de flujo laminar. Una vez listo el césped, se hicieron pocillos con un sacabocado de 7 mm de diámetro y se adicionó en cada uno de ellos 25 μ l de extracto. La misma cantidad de agua y cloroformo se depositaron para ser utilizados como control (Figura 4).

Las placas se dejaron secar durante 1h bajo campana de flujo laminar y posteriormente se incubaron en estufa a 30° C por 24 h. La reacción positiva, se determinó por la formación de halos de inhibición alrededor del pocillo en el césped de la cepa indicadora. Con esta prueba de antagonismo se seleccionaron los extractos de plantas nativas que presentaron mayor actividad, para realizar ensayos posteriores de inhibición en caldo.

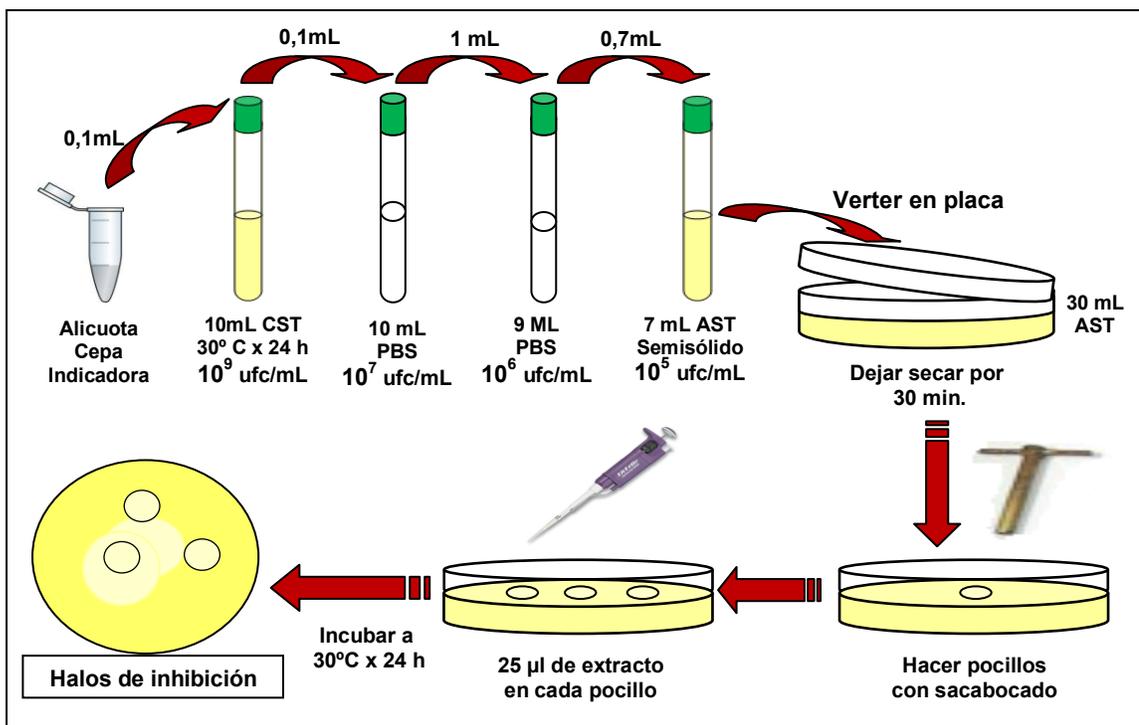


FIGURA 4 Prueba de Antagonismo en placa, para determinar la actividad de los extractos vegetales.

Fuente: Elaboración propia.

3.4.2 Prueba de inhibición en caldo.

3.4.2.1. Preparación de la cepa indicadora. De cada cepa indicadora de *E. coli* y *Salmonella* spp. se inoculó por separado 0,1 mL en 10 mL de CST y se incubaron a 37° C durante 24 h. Transcurrido este tiempo el cultivo fue centrifugado a 4000rpm por 15 min. Una vez obtenido el “pellet” de la célula, éste fue lavado resuspendiéndolo en 10mL de buffer PBS. La cepa resuspendida fue centrifugada nuevamente a 9000rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en 10 mL de buffer PBS. Finalmente se realizaron diluciones en PBS hasta obtener una concentración de 10^5 ufc/mL en caldo soya tripticasa (BELFIORE *et al.*, 2007).

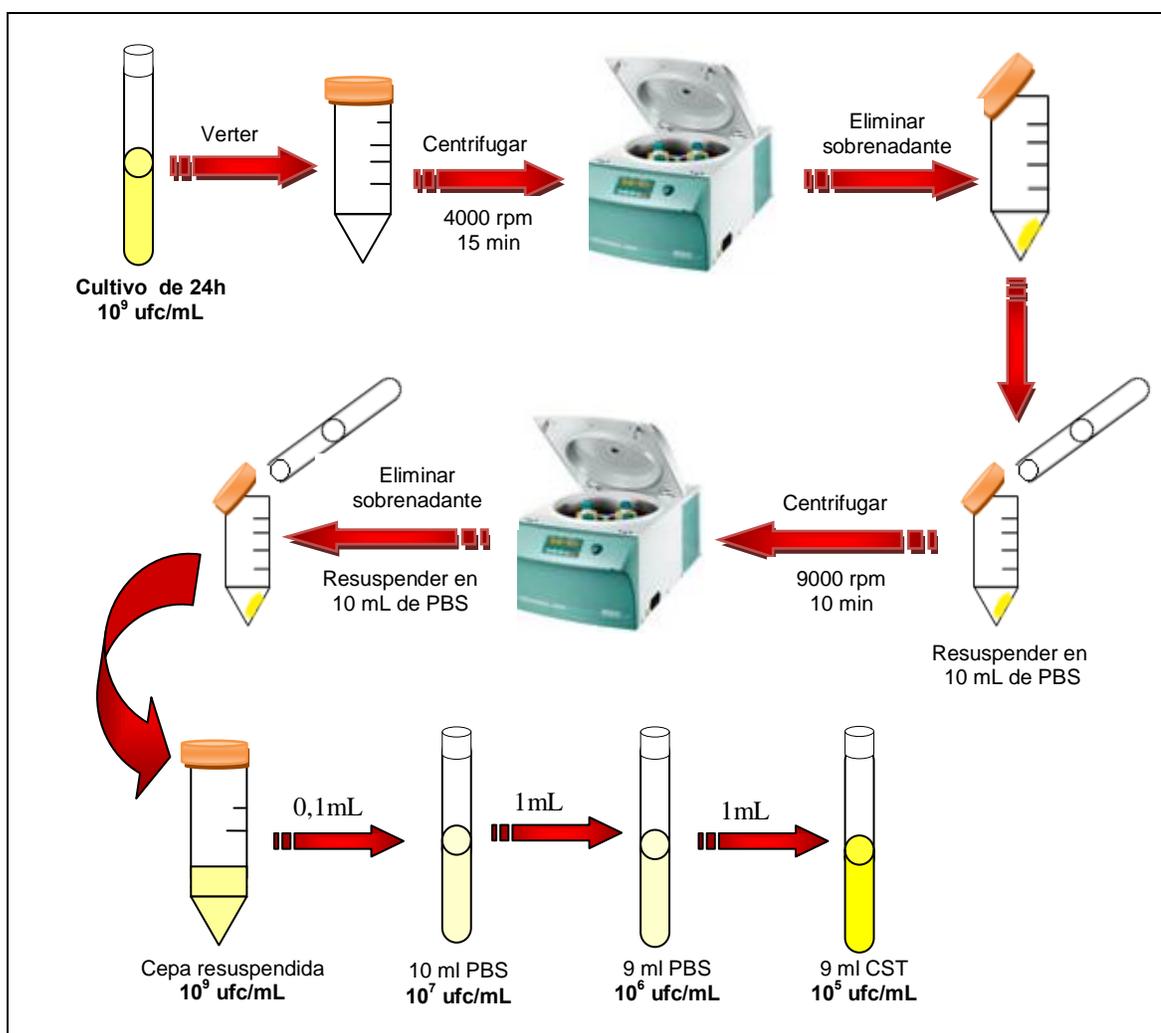


FIGURA 5 Secuencia para la obtención de los inóculos de las cepas patógenas para la prueba de antagonismo en caldo.

Fuente: Elaboración propia.

3.4.2.2. Preparación de los tratamientos. Para esta prueba se utilizaron los 3 extractos que presentaron la mayor actividad antimicrobiana en la prueba de inhibición en placa (3.4.1). Los tratamientos se prepararon como se señala en la Figura 6, mezclando en un tubo eppendorf 600 μ l de extracto y 600 μ l de cepa indicadora con una concentración de 10^5 ufc/mL (3.4.2.1). Los tratamientos se agitaron en un Vortex e identificaron con un número según tratamiento. De cada tratamiento se traspasaron 200 μ l a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos (Figura 6). Adicionalmente se incorporó un control para cada cepa, el cual contenía la cepa indicadora en CST.

TRATAMIENTOS:

Control: Cepa indicadora con una concentración de 10^5 ufc/mL

T1: Cepa indicadora (10^5 ufc/mL) + Extracto 1 (Lingue)

T2: Cepa indicadora (10^5 ufc/mL) + Extracto 2 (Ñirre)

T3: Cepa indicadora (10^5 ufc/mL) + Extracto 3 (Picha)

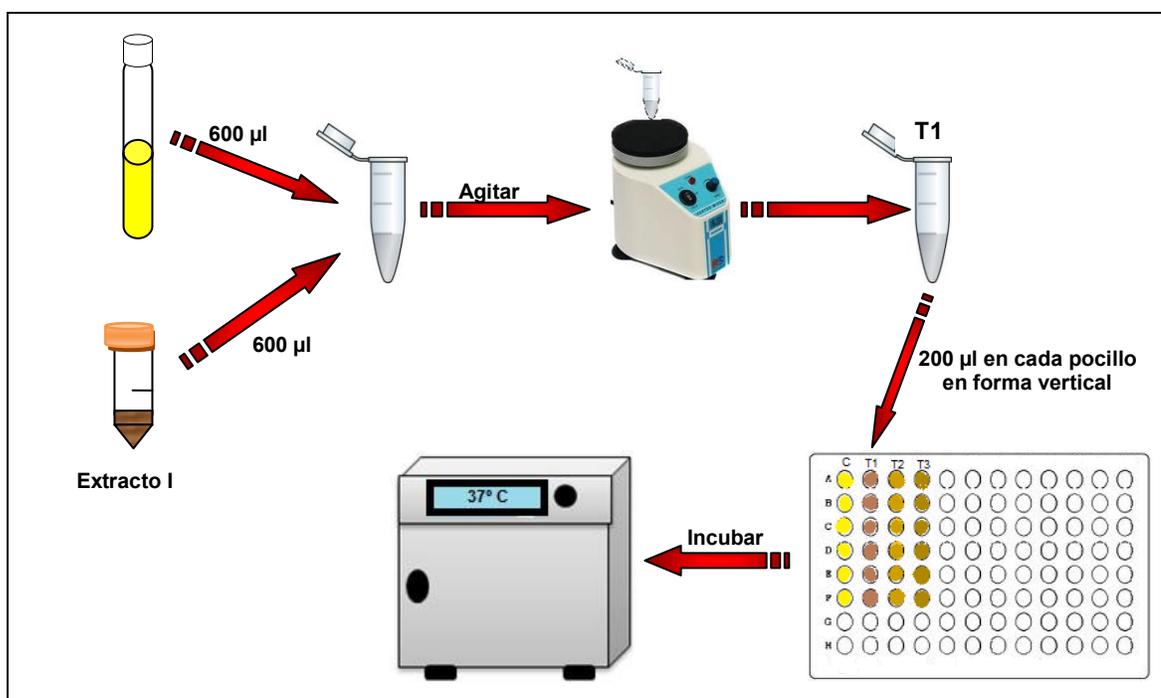


FIGURA 6 Prueba de antagonismo en caldo realizada en placas de microtitulación.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez preparados los distintos tratamientos (cepas + extractos), las microplacas fueron incubadas a 37° C en agitación con un agitador Orbital a 100rpm durante 30h.

3.4.2.3. Recuento de células viables. Para verificar el efecto bactericida o bacteriostático de los extractos seleccionados se realizaron recuentos en placa a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 y 30 horas de incubación. Para llevar a cabo el recuento de células viables se tomaron 50 μ l de cada tratamiento y del control, se realizaron diluciones en 5ml de buffer fosfato salino, para luego ser sembradas en superficie sobre placas con agar soya tripticasa. Estas placas fueron incubadas a 37° C por 48h. Las siembras se realizaron con 3 repeticiones.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados de los halos de inhibición obtenidos por cada extracto, se analizaron estadísticamente, mediante un análisis de varianza multifactorial con un nivel de confianza de 95%, utilizando como variable independiente los halos de inhibición en mm y como factores los tratamientos y las repeticiones. Al registrarse diferencia significativa se aplicó la prueba de Comparación Múltiple de Tukey, para determinar los extractos más efectivos.

Los resultados de los recuentos de las cepas de *E. coli* y *Salmonella* se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza multifactorial con un nivel de confianza de 95%, utilizando como variable independiente el recuento de bacterias en Log ufc/ml y como factores los tratamientos, el tiempo y las repeticiones. Al registrarse diferencias significativas entre los distintos tratamientos se aplicó la prueba de Comparación Múltiple de Tukey.

Estos análisis se realizaron utilizando el software Statgraphics Centurion plus XV.I.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de los extractos de plantas con actividad antagonista frente a *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

La primera etapa de este trabajo consistió en la selección de los extractos con actividad antagonista frente a *E. coli* y *Salmonella* spp. Para estudiar este efecto se diseñó un experimento en el cual se comparó la capacidad de los extractos vegetales de inhibir el crecimiento de estos microorganismos realizando pruebas de sensibilidad antimicrobiana en placa, utilizando como control negativo agua en el caso de los extractos metanólicos y metanol en los clorofórmicos.

De los 14 extractos metanólicos analizados, 7 mostraron actividad frente a cepas de *E. coli* y *Salmonella* (ANEXO 2), aunque 2 de ellos que corresponden a los extractos de Radal y Notro sólo presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. Typhimurium* ATCC 14028.

En cuanto a los 14 extractos clorofórmicos estos no presentaron actividad antimicrobiana frente a las cepas de patógenos (ANEXO 2), esto se puede deber al método de extracción utilizado, ya que en la fase clorofórmica se obtienen principalmente lípidos, por lo que se puede inferir que en la fase metanol+agua se logra recolectar la mayor parte de los compuestos activos presentes en las plantas (COBIAN, 2007; GOMEZ, 2010).

Para conocer la relación existente entre la actividad antimicrobiana (tamaño del los halos de inhibición) y el pH de los extractos, se midió el pH de los extractos metanólicos y clorofórmicos de cada especie, obteniéndose los siguientes valores:

CUADRO 4 pH promedio de extractos metanólicos y clorofórmicos de diferentes especies de plantas nativas.

Nº	PLANTA	*extractos metanólicos	*extractos clorofórmicos
1	Lingue	4,1	4,0
2	Ñirre	4,6	4,5
3	Luma	3,5	3,5
4	Sauco	5,0	5,8
5	Canelo	4,4	3,0
6	Temu	4,0	3,1
7	Tineo	4,5	6,1
8	Raulí	4,7	4,1
9	Picha	4,7	4,6
10	Melí	3,5	4,9
11	Radal	5,1	5,3
12	Notro	4,9	5,0
13	Pillo Pillo	5,5	5,4
14	Pillo Pillo (corteza)	4,7	4,8

* Promedio de 3 repeticiones

Como se puede observar en el Cuadro 4 todos los extractos presentaron un pH ácido con valores que oscilaron entre 3,0 y 6,1. Estos valores se encuentran fuera del rango de pH óptimo del desarrollo bacteriano, ya que en general crecen a pH cercanos a la neutralidad (pH 6,5 a 7,5), aunque son capaces de tolerar un rango de pH entre 4 y 9 (RAYBAUDI-MASSILIA *et al.*, 2006). Sin embargo, la presencia de halos de inhibición en los extractos metanólicos y la ausencia de halos de inhibición en los clorofórmicos, permitió comprobar que el efecto del pH ácido no fue un factor determinante en las inhibiciones observadas, ya que los extractos clorofórmicos, que presentaron los valores de pH más bajos que corresponden a las especies de Canelo, Temu y Luma, no presentaron actividad antagonista.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por REYES, (2007), quien analizó el efecto antimicrobiano de extractos de hojas y bayas de diversos ecotipos de murta, donde todos los extractos estudiados presentaron pH ácido, con valores entre 2,74 y 4,25. Sin embargo, los resultados de la capacidad antimicrobiana de los extractos frente a *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bifidobacterium longum* ATCC 1570, *Streptococcus thermophilus* Th4, *Lactobacillus acidophilus* LA5, *Aspergillus niger* ATCC 20447 y *Penicillium expansum* indicaron que el pH de los extractos de hoja de murta no representó un efecto importante en el tamaño de los halos de inhibición para los distintos microorganismos utilizados.

4.1.1. Resultados de prueba de antagonismo en placa de extractos frente a cepas de *Escherichia coli*. En este experimento la capacidad antimicrobiana fue medida a través del diámetro del halo de inhibición (mm) de los extractos vegetales frente a las cepas de *E. coli*. En el cuadro 5 se agrupan los valores promedios de 3 repeticiones con su respectiva desviación estándar por cepa.

CUADRO 5 Diámetros de halos de inhibición (mm) de extractos frente a cepas de *E. coli*.

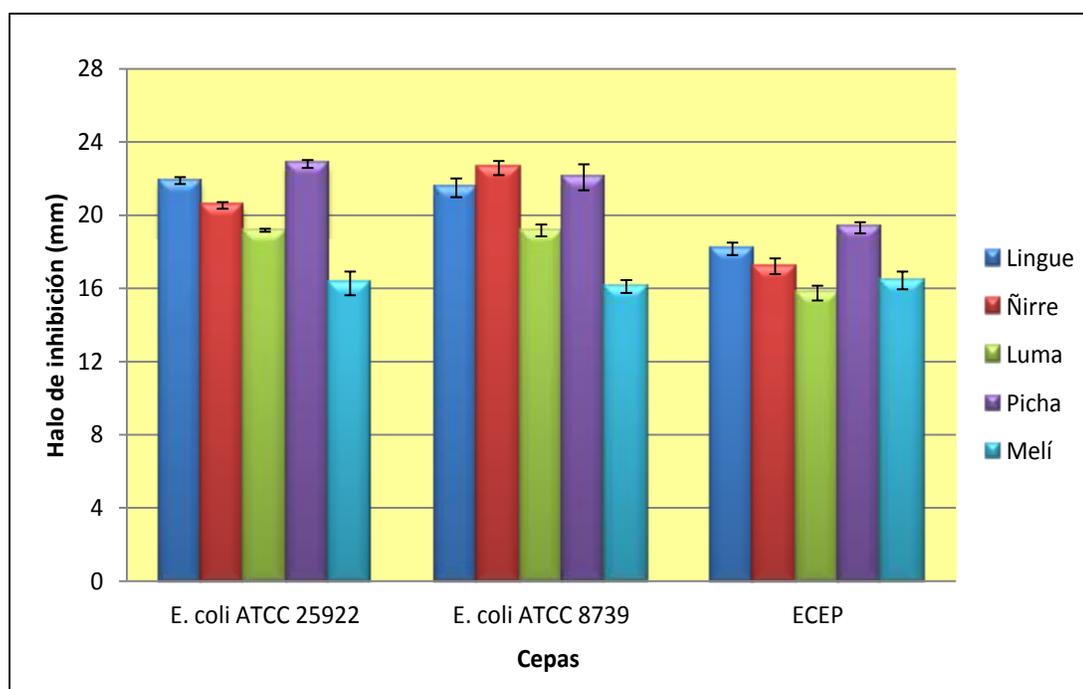
Extracto	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>E. coli</i> ATCC 8739		<i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP)	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
Lingue	21,89	0,18	21,50	0,52	18,17	0,34
Ñirre	20,53	0,19	22,57	0,38	17,21	0,43
Luma	19,18	0,08	19,17	0,32	15,74	0,40
Picha	22,80	0,22	22,07	0,71	19,31	0,31
Melí	16,26	0,65	16,10	0,35	16,43	0,49

* Valores corresponden al promedio de tres repeticiones con extractos obtenidos en diferentes fechas.

DS: Desviación estándar.

De los 14 extractos metanólicos estudiados, sólo 5 mostraron actividad frente a las cepas de *E. coli* (ANEXO 2). En el CUADRO 5 se pueden observar los halos de

inhibición promedio, donde el extracto que presentó el mayor halo de inhibición tanto para la cepa ATCC 25922 como para *E. coli* enteropatógena (ECEP) fue la Picha con un promedio de 22,80mm y 19,31mm respectivamente. En el caso de la cepa ATCC 8739 el Ñirre obtuvo el mayor halo de inhibición con un promedio de 22,57 mm. También se puede observar que el extracto con menor efecto antagonista frente a las 3 cepas de *E. coli* corresponde al extracto de Meli.



* Valores corresponden al promedio de tres repeticiones con extractos obtenidos en diferentes fechas.

FIGURA 7 Inhibición de *E. coli* en presencia de extractos de plantas nativas mediante la prueba de antagonismo en placa.

Como se puede observar en la Figura 7 con respecto a los microorganismos utilizados en el ensayo experimental, la cepa de *E. coli* que presentó mayor sensibilidad al ser analizado con todos los extractos vegetales fue la cepa ATCC 25922, seguida por la ATCC 8739 y finalmente *E. coli* enteropatógena (ECEP). En relación a los extractos se puede apreciar que los con mayor potencial fueron Lingue, Ñirre y Picha, tanto para las

cepas ATCC 25922, ATCC 8739 y para la cepa enteropatógena (ECEP), aunque en menor medida.

Para estimar, a que especies de plantas nativas pertenecen los 3 extractos con una mayor actividad inhibitoria, los valores de los halos de inhibición obtenidos en las 3 repeticiones fueron sometidos a un análisis de varianza multifactorial utilizando como variable de respuesta los halos de inhibición (mm) y como factores los extractos y las repeticiones.

El análisis estadístico no indicó diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las repeticiones de las pruebas de antagonismo en placa frente a las 3 cepas de *E. coli* (ANEXO 3.2, 4.2 y 5.2). En cuanto al factor extractos se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos frente a todas las cepas analizadas (ANEXO 3.2, 4.2 y 5.2). La prueba de comparación múltiple de Tukey, identificó que los extractos de Lingue, Ñirre y Picha fueron significativamente mayores a los demás extractos frente a todas las cepas (ANEXO 3.3, 4.3, 5.3). Sin embargo, se pudo observar que no existieron diferencias significativas entre los extractos de Lingue y Picha con la cepa ATCC 25922 (ANEXO 3.3).

Esta actividad de extractos frente a *E. coli* también fue estudiada por autores como CLAUSSEN (2009), quien realizó un estudio comparativo de 41 especies vegetales, donde este patógeno fue sensible a 7 de los 50 extractos etanólicos y sólo a 3 de los 50 extractos acetónicos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por MOREIRA *et al.* (2005), quienes demostraron la actividad antimicrobiana de 10 especies vegetales frente a 4 cepas de *E. coli*, 2 cepas ATCC y 2 aislados de productos cárnicos, las que fueron sensibles a todos los extractos con halos de inhibición entre 16 y 60mm. Sin embargo, examinando la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra las 4 cepas de *E. coli* (ATCC 25158, ATCC 32922 y 2 cepas de *E. coli enteropatógena* aisladas de productos cárnicos), se pudo observar que las cepas ATCC mostraron una sensibilidad similar, mientras que las cepas aisladas de productos cárnicos presentaron halos de inhibición un poco menores frente a la acción de los aceites esenciales.

4.1.2. Resultados de prueba de antagonismo en placa de extractos de planta nativas frente a cepas de *Salmonella* spp. Los resultados fueron similares a los obtenidos con las cepas de *E. coli*, sin embargo, como se puede observar en el Cuadro 6 los extractos de Notro y Radal también presentaron efectos de inhibición, aunque sólo frente a una de las cepas.

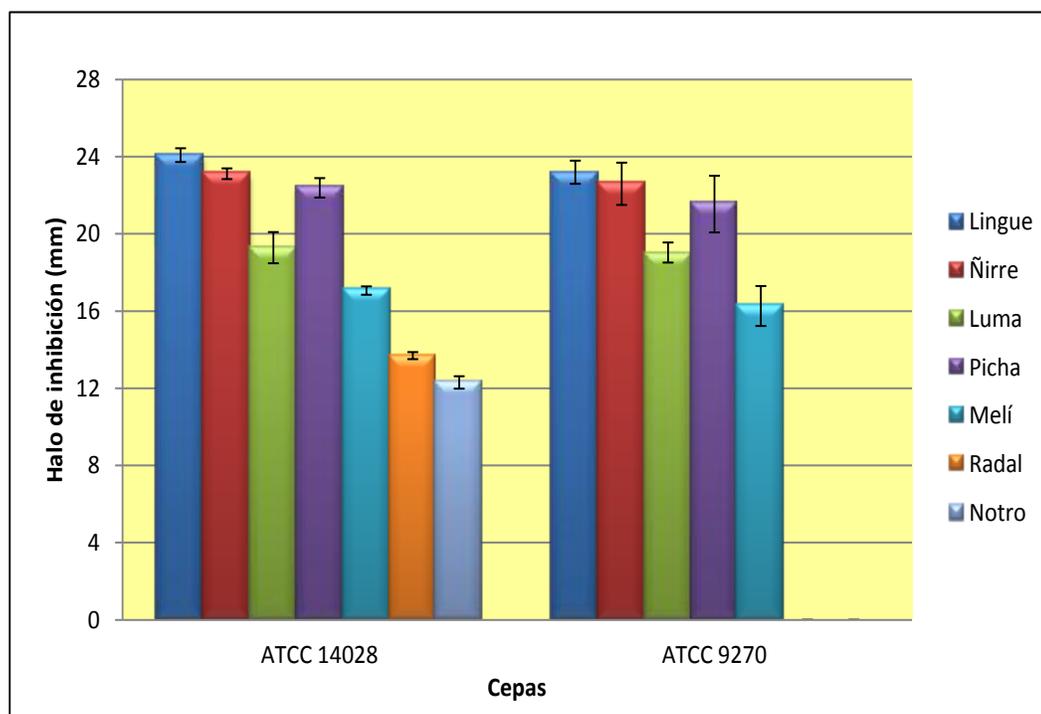
CUADRO 6 Diámetros de halos de inhibición (mm) de extractos frente a *Salmonella* spp.

Extracto	<i>Salmonella</i> ATCC 14028		<i>Salmonella</i> ATCC 9270	
	Promedio	DS	Promedio	DS
Lingue	24,45	0,35	23,29	0,60
Ñirre	22,89	0,28	22,97	1,10
Luma	18,44	0,81	19,29	0,53
Picha	22,03	0,51	21,55	1,47
Melí	17,00	0,21	16,27	1,04
Radal	13,87	0,19	—	—
Notro	12,62	0,32	—	—

* Valores corresponden al promedio de tres repeticiones con extractos obtenidos en diferentes fechas.

— Ausencia de halo de inhibición.

En el Cuadro 6 se pueden observar los halos de inhibición promedio obtenidos, donde el extracto que presentó el mayor halo de inhibición tanto para la cepa ATCC 14028 como para la ATCC 9270 fue el Lingue con un promedio de 24,45mm y 23,29mm respectivamente. En el caso de la cepa ATCC 14028 presentó sensibilidad frente a los extractos de Radal y Notro aunque el tamaño de los halos de inhibición fueron menores en comparación a los demás extractos. En cuanto al extracto con menor efecto antagonista frente a la cepa ATCC 9270 al igual que frente a las cepas *E. coli* corresponde al extracto de Meli.



** Valores corresponden al promedio de tres repeticiones con extractos obtenidos en diferentes fechas.

FIGURA 8 Inhibición de *Salmonella* spp. en presencia de extractos de plantas nativas mediante la prueba de antagonismo en placa.

Como se puede observar en la Figura 8 con respecto a los microorganismos utilizados en el ensayo experimental, la cepa de *Salmonella* que presentó mayor sensibilidad al ser analizado frente a todos los extractos vegetales fue la cepa ATCC 14028 con los mayores diámetros de halo de inhibición, en comparación con la cepa ATCC 9270 que fue más resistente y presentó ausencia de halos de inhibición para los extractos de Radal y Notro.

En esta etapa se seleccionaron los 3 extractos que presentaron los mayores halos de inhibición por medio del análisis estadístico de los valores obtenidos en las 3 repeticiones. Estos datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANEXO 6 y 7), utilizando como variable de respuesta los halos de inhibición (mm) y como factores los extractos y las repeticiones.

El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las repeticiones de las pruebas de antagonismo frente a ambas cepas de *Salmonella* (ANEXO 6.2 y 7.2). Entre extractos se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) frente a las 2 cepas analizadas (ANEXO 6.2 y 7.2).

Para identificar los 3 extractos más efectivos, se realizó el test de comparación múltiple de Tukey con un intervalo de confianza de un 95%. Este test identificó los halos correspondientes a los extractos de Lingue, Ñirre y Picha como los significativamente mayores frente a ambas cepas (ANEXO 6.3 y 7.3). Sin embargo, se pudo observar que en la cepa ATCC 14028 los extractos de Lingue y Picha presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) (ANEXO 6.3). En relación al análisis realizado a la cepa ATCC 9270 se puede apreciar que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los extractos de Lingue, Ñirre y Picha (ANEXO 7.3).

La actividad de extractos vegetales frente a cepas de *Salmonella* también fue estudiada por autores como LEE *et al.*, (2006), donde 22 especies de hierbas medicinales usadas tradicionalmente para las infecciones gastrointestinales en Corea fueron probados contra tres serotipos de *Salmonella*. De los extractos de hierbas evaluados, nueve presentaron actividad antibacteriana contra al menos una de las cepas de *Salmonella*, obteniendo halos de inhibición de 8 a 19 mm. Por otra parte, el extracto acuoso y el metanólico de *Schizandrae fructus* exhibió actividad frente a las tres cepas de *Salmonella*. Luego los extractos acuoso y metanólico de esta especie frente a otras 13 cepas de *Salmonella* de 6 serotipos diferentes, donde todas las cepas de *Salmonella* fueron afectadas por estos extractos presentando halos de inhibición de 11 a 25 mm.

4.2 Prueba de inhibición en caldo de los tratamientos con extractos.

Una vez seleccionados los extractos con mayor actividad antimicrobiana se realizaron recuentos en placa de los tratamientos y los controles positivos correspondiente a las cepas de *E. coli* y *Salmonella* en caldo soya tripticasa incubados a 37°C. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de tres repeticiones de recuentos

realizados a los tratamientos con extractos y al control a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 y 30 horas de incubación (ANEXO 8).

Los resultados fueron analizados estadísticamente por medio de un ANOVA multifactorial para cada cepa, indicando que no existían diferencias significativas ($P>0,05$) entre las repeticiones (ANEXOS 9.1; 10.1; 11.1; 12.1; 13.1), por lo cual los datos fueron analizados en conjunto.

4.2.1 Inhibición de *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo. Esta segunda etapa consistió en conocer el efecto bactericida o bacteriostático de los extractos de Lingue, Ñirre y Picha frente a la cepa *E. coli* ATCC 25922 en caldo soya tripticasa (CST).

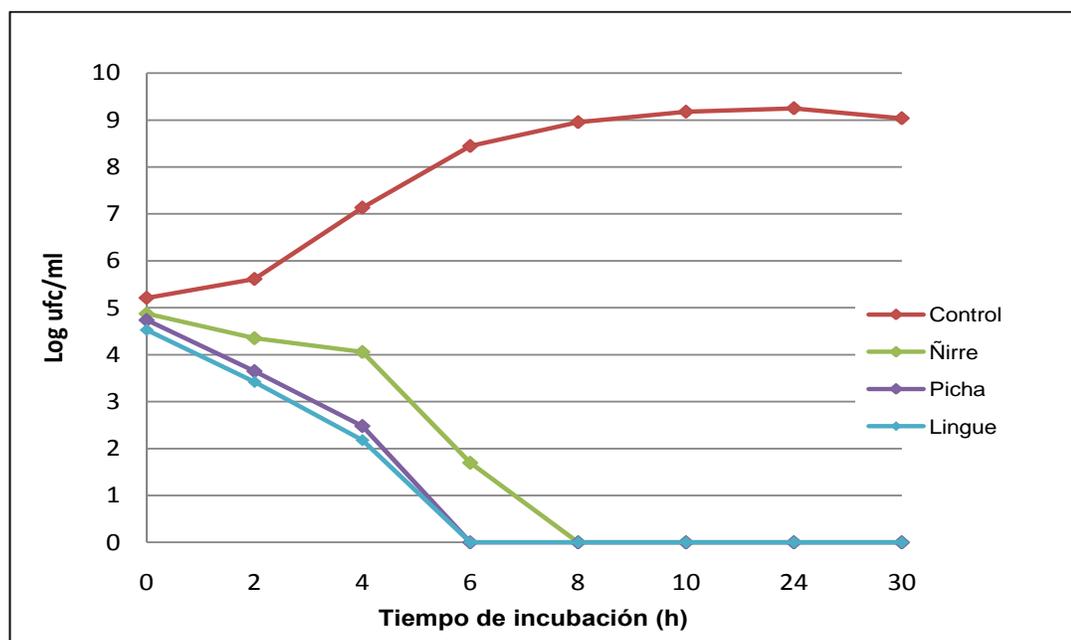


FIGURA 9 Acción antagonista en caldo soya tripticasa de tres extractos de plantas nativas frente a *E. coli* ATCC 25922, a 37 °C.

En la FIGURA 9 se presentan los recuentos de *E. coli* ATCC 25922 que corresponden al promedio de tres repeticiones (ANEXO 8.1), obtenidos a través del tiempo de incubación a 37°C, donde se puede observar claramente que los tres tratamientos con

extractos registraron una drástica disminución en los recuentos a través del tiempo con respecto al control del cultivo de la cepa sin extracto.

El análisis de varianza aplicado arrojó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos y entre tiempos (ANEXO 9.1). Se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control del cultivo de *E. coli* ATCC 25922 y los cultivos de esta cepa en presencia de extractos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos con Lingue y Picha, pero si entre estos y el Ñirre. (ANEXO 9.2).

Como se puede apreciar en la Figura 9 los tratamientos más efectivos para inhibir el crecimiento de la cepa de *E. coli* ATCC 25922, fueron en presencia de los extractos de Lingue y Picha, presentando una reducción de 4,5 y 4,7 ciclos Log respectivamente desde su concentración inicial, dando como resultado una completa inhibición de la cepa a las 6 h de incubación, lo que se mantuvo en las horas posteriores.

El tratamiento con extracto de Ñirre, presentó un efecto de inhibición más lento en comparación con los demás, sin embargo, también se observaron diferencias significativas con respecto al control (ANEXO 9.2). El análisis estadístico reveló una reducción significativa de la cepa *E. coli* ATCC 29522 a las 6 h de incubación, disminuyendo 3,2 ciclos Log desde su concentración inicial, para finalmente presentar una completa inhibición de la cepa en la hora 8 que se mantuvo en el tiempo.

El análisis estadístico demostró que la disminución de este patógeno, fue significativa ($p < 0,05$) a las 2, 4 y 6 h respecto al valor inicial (tiempo 0) (ANEXO 9.3). Lo anteriormente descrito indica que los tres tratamientos presentaron una rápida acción bactericida sobre el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922.

4.2.2 Inhibición de Escherichia coli ATCC 8739 en caldo. El análisis estadístico de los recuentos realizados de esta cepa (ANEXO 8.2) indicaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los Tratamientos y entre los Tiempos (ANEXO 10.1).

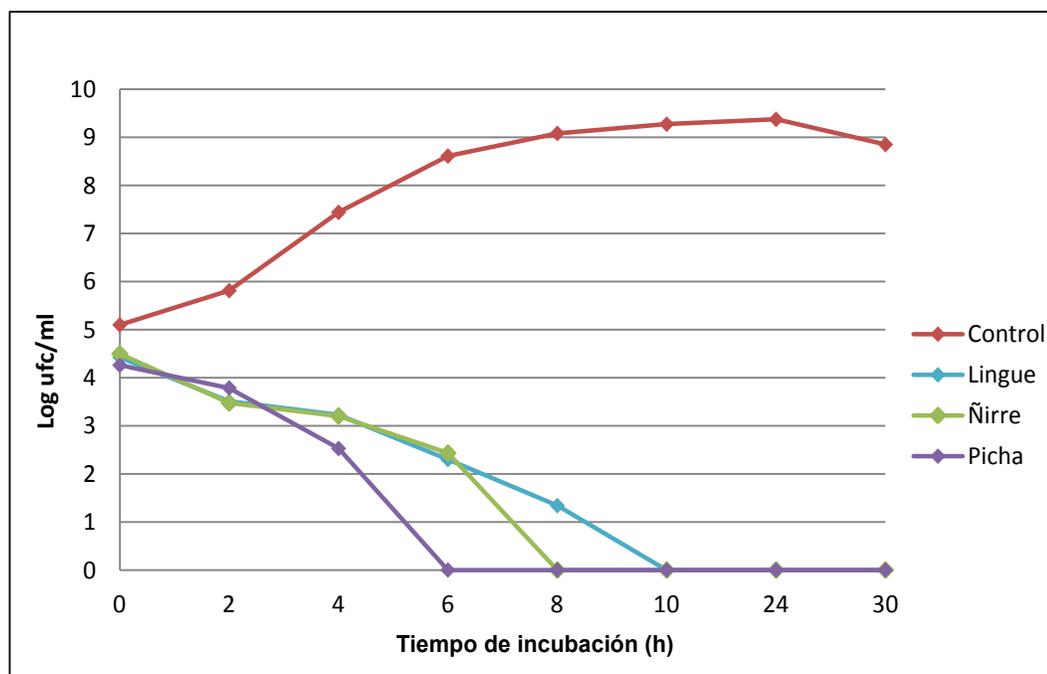


FIGURA 10 Acción antagonista en caldo soya tripticasa de tres extractos de plantas nativas frente a *E. coli* ATCC 8739, a 37 °C.

Como se puede observar en la FIGURA 10 los tres tratamientos con extractos registraron una disminución considerable en los recuentos a través de las horas de incubación con respecto al control del cultivo de *E. coli* ATCC 8739 sin extracto. El análisis estadístico indicó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control del cultivo de *E. coli* ATCC 8739 y los cultivos de esta cepa en presencia de extractos. Al realizar el test de comparación múltiple de Tukey se pudo observar que además existían diferencias significativas entre los 3 tratamientos con extractos (ANEXO 10.2).

En la Figura 10 se puede apreciar que el tratamiento más efectivo para reducir el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 8739, fue en presencia del extracto de Picha, el cual reveló una reducción significativa ($p < 0,05$) después de las 6 h de incubación con una reducción de 4,3 ciclos Log, en relación a la población inicial, obteniendo como resultado la completa inhibición de esta cepa. El extracto de Ñirre, fue el segundo tratamiento más efectivo, reduciendo significativamente ($p < 0,05$) la población en 4,5 ciclos logarítmicos, desde su recuento inicial a la inhibición total de esta cepa a las 8 h

de incubación. El tratamiento con Lingue fue el que presentó un efecto más lento sin embargo, también se observaron diferencias significativas con respecto al control. En este tratamiento la población de *E. coli* registró una disminución progresiva de aproximadamente 1 ciclo Log cada dos horas en relación a la población inicial de 4,4 Log UFC/ml, hasta lograr la completa inhibición de esta cepa a las 10 h de incubación.

El análisis estadístico demostró que la disminución de este patógeno, fue significativa ($p < 0,05$) para todos los tiempos respecto al valor inicial (tiempo 0) (ANEXO 10.3). Lo anteriormente descrito indicaría que los tres tratamientos tuvieron una acción bactericida sobre el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 8739.

4.2.3 Inhibición de Escherichia coli enteropatógena (ECEP) en caldo. Los resultados de los recuentos realizados para esta cepa, correspondientes al promedio de las tres repeticiones (ANEXO 8.3) analizadas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los Tratamientos y entre los Tiempos (ANEXO 11.1).

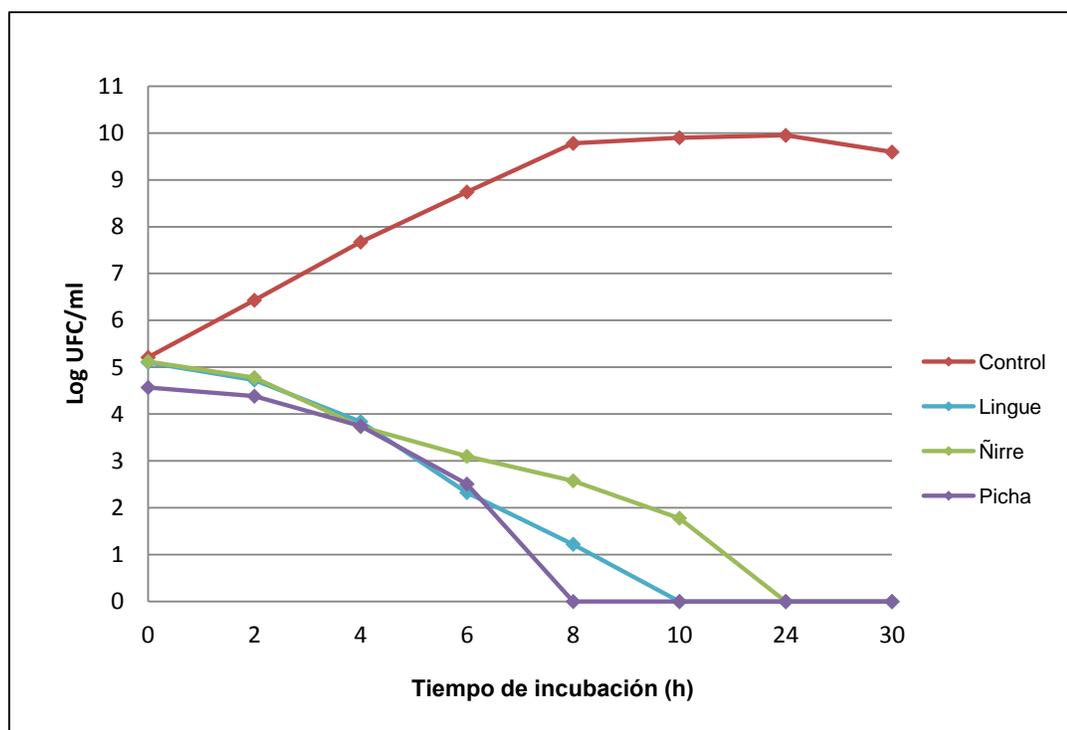


FIGURA 11 Acción antagonista en caldo soya tripticasa de tres extractos de plantas nativas frente a *E. coli* enteropatógena (ECEP), a 37 °C.

En la figura 11 se puede observar que el tratamiento más efectivo para inhibir *E. coli* enteropatógena fue con el extracto de Picha, presentando una reducción de 4,6 ciclos Log desde su población inicial hasta obtener una completa inhibición a las 8 horas. En cuanto al tratamiento con Lingue este disminuyó desde una población inicial de 5,1 Log UFC/ml hasta obtener una completa inhibición de la cepa a la hora 10 y finalmente el extracto de Ñirre que obtuvo un efecto bactericida a las 24 h de incubación.

El análisis estadístico de los recuentos de *E coli* enteropatógena (ANEXO 8.3) indicó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos (ANEXO 11.1). Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Tukey se estableció que tal diferencia se encontraba entre el control y los tratamientos con extractos, además se pudo observar que existieron diferencias significativas entre los tres tratamientos con extractos (ANEXO 11.3). En cuanto al tiempo la prueba de rangos múltiples de Tukey registró diferencias significativas a las 4, 6, 8 y 10 h de incubación (ANEXO 11.4). Además se puede mencionar que los recuentos del tratamiento con Picha fueron significativamente menores que los demás, presentando una ausencia de colonias de *E coli* enteropatógena a las 8 h de incubación, en comparación con los tratamiento con Lingue y Ñirre que registraron una inhibición total de la bacteria a las 10 y 24 h respectivamente.

4.2.4 Inhibición de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium ATCC 14028 en caldo. En la FIGURA 12 se presentan los recuentos de *Salmonella* ATCC 14028 en caldo soya tripticasa en presencia de los extractos incubadas a 37°C. Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones, de los recuentos de *Salmonella* ATCC 14028 en el cultivo con los extractos y el control (ANEXO 8.4).

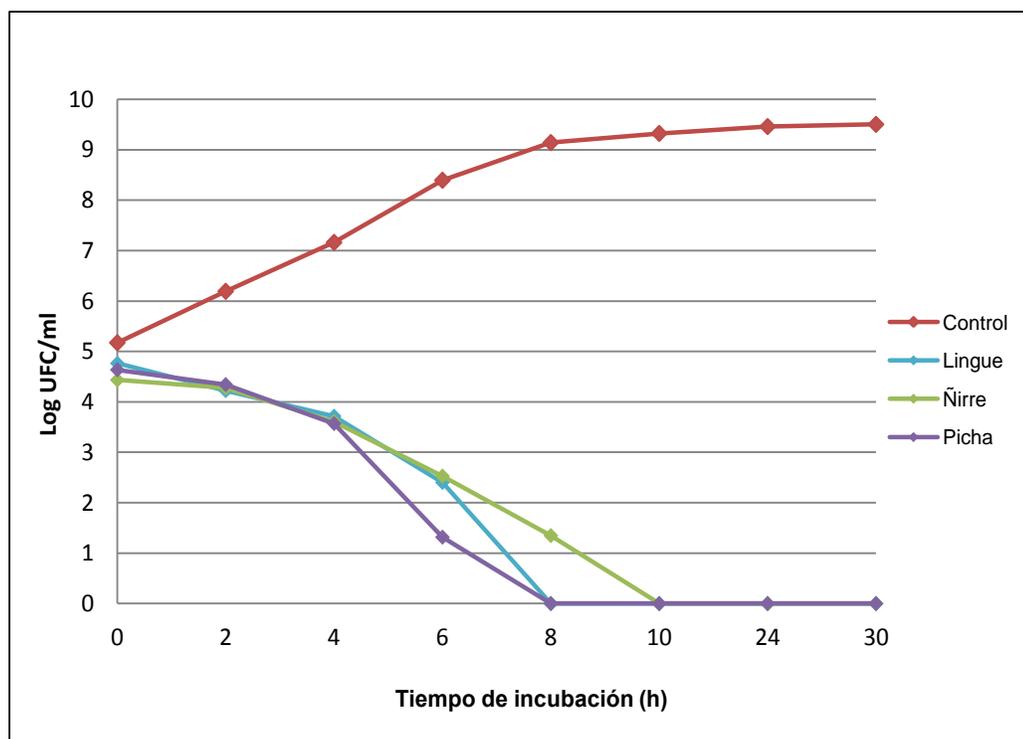


FIGURA 12 Acción antagonista en caldo soya triptica de tres extractos de plantas nativas frente a *Salmonella* ATCC 14028, a 37 °C.

El análisis de varianza presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos y entre los tiempos (ANEXO 12.1). Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Tukey se estableció que tal diferencia se encontraba entre el control y los tratamientos con extractos, además se pudo observar diferencias significativas entre los tres tratamientos con extractos (ANEXO 12.2).

Como se puede apreciar en la Figura 12 los tratamientos más efectivos en para inhibir el crecimiento de la cepa de *Salmonella* ATCC 14028, fueron en presencia de los extractos de Lingue y Picha, presentando una reducción de 4,8 y 4,6 ciclos Log respectivamente desde su concentración inicial, dando como resultado una completa inhibición de la cepa a las 8 h de incubación, lo que se mantuvo en las horas posteriores.

El tratamiento con extracto de Ñirre, fue el tratamiento menos efectivo en comparación con los demás, sin embargo, también se observaron diferencias significativas con respecto al control (ANEXO 12.2). El análisis estadístico reveló una reducción significativa de la cepa *Salmonella* ATCC 14028 a las 10 h de incubación, presentando una completa inhibición de la cepa, la cual se mantuvo en el tiempo.

En relación al tiempo la prueba de rangos múltiples de Tukey registró diferencias significativas a las 0, 2, 4 y 6 h de incubación (ANEXO 12.3). Lo anteriormente descrito indicaría que los tres tratamientos tuvieron una acción bactericida sobre el crecimiento de la cepa *Salmonella* ATCC 14028.

4.2.5 Inhibición de *Salmonella entérica* serovar *Anatum* ATCC 9270 en caldo. En la FIGURA 13 se presentan los recuentos obtenidos en las pruebas de antagonismo de los extractos en caldo sobre la cepa de *Salmonella* ATCC 9270 (ANEXO 8.5). Se utilizó como control caldo ST sin extracto, inoculado solo con la cepa.

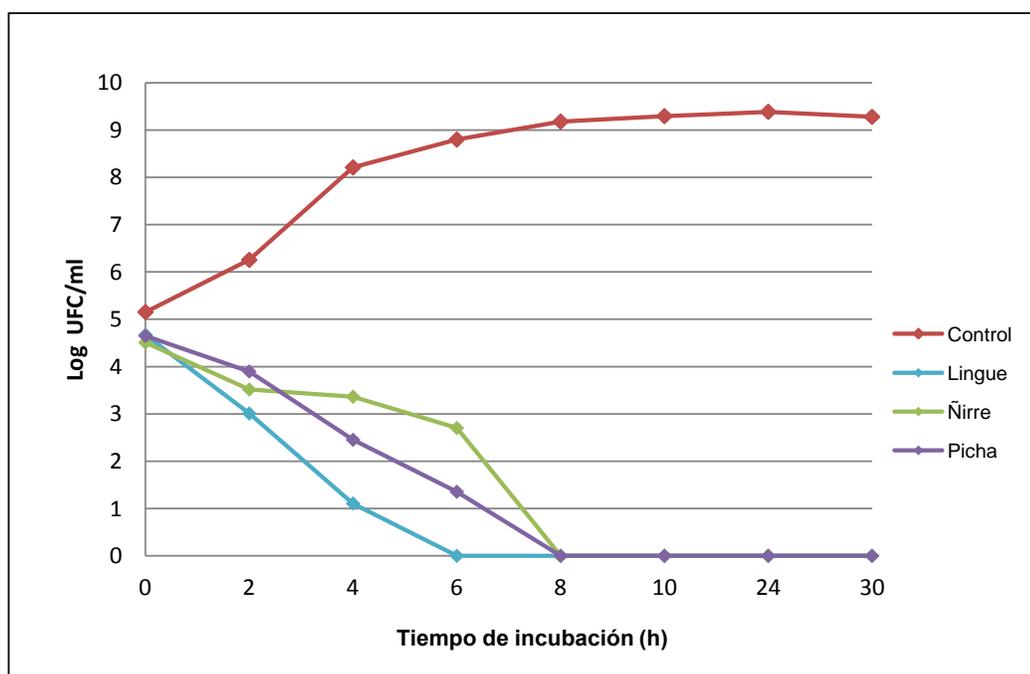


FIGURA 13 Acción antagonista en caldo soya tripticasa de tres extractos de plantas nativas frente a *Salmonella* ATCC 9270, a 37 °C.

El análisis de varianza indicó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos y el control. Así como también entre los tiempos de incubación (ANEXO 13.1).

Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Tukey se estableció diferencias significativas entre el control y los tratamientos con extractos, además se pudo observar que existieron diferencias significativas entre los tres tratamientos con extractos (ANEXO 13.2).

El tratamiento más efectivo para reducir *Salmonella* ATCC 9270, fue en presencia del extracto de Lingue, el cual arrojó recuentos inferiores al límite de la detección para la técnica de siembra en superficie a las 6h. En este tratamiento la población de esta cepa se redujo en su totalidad a las 6h, lo que se mantuvo en las horas posteriores.

Los extractos de Picha y Ñirre presentaron una completa inhibición de *Salmonella* ATCC 9270, a las 8 horas de incubación desde una población inicial de 4,7 y 4,5 Log UFC/ml respectivamente.

El análisis estadístico demostró que la disminución de este patógeno, fue significativa ($p < 0,05$) para los tiempos 2, 4 y 6 respecto al valor inicial (tiempo 0) (ANEXO 13.3). Lo anteriormente descrito indicaría que los tres tratamientos tuvieron una rápida acción bactericida sobre el crecimiento de la cepa *Salmonella* ATCC 9270.

Los resultados de todas las pruebas de inhibición en caldo arrojaron que, a partir de las 2 h de incubación el desarrollo de las bacterias presentó una drástica y continua disminución frente a los tres extractos vegetales. Los extractos de Lingue, Ñirre y Picha presentaron un efecto bactericida frente a las cinco cepas en estudio, donde el extracto metanólico de Picha registro el más amplio y rápido efecto bactericida, observándose a las 6 h de incubación una completa inhibición de la cepa *E. coli* ATCC 8939 y a las 8 h de las demás cepas utilizadas.

Una de las especies que presentó un fuerte poder de inhibición fue *Persea lingue* (Lingue) que es una de las especies endémicas chilenas de la familia *Lauraceae* al igual que *Cryptocarya alba* Looser (Peumo). Existen escasos estudios fitoquímicos y

biológicos de esta especie, por lo que constituyeron una interesante fuente vegetal para la investigación. En medicina popular se utilizan las hojas de *Persea lingue* como astringentes y de *Cryptocarya alba* en enfermedades reumáticas y como rubefaciente. En un estudio realizado por AVELLO *et al.*, (2012), *P. lingue* presentó una actividad moderada, con diámetros de halos de inhibición de 10 a 14 mm, frente a *Pseudomonas aeruginosa* por el método del pocillo, lo cual coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación.

El estudio del efecto antimicrobiano de extractos de plantas nativas de Chile, también se puede comparar con estudios realizados por MØLGAARD *et al.*, (2011), donde se estudiaron 40 especies de plantas chilenas utilizadas para el tratamiento de heridas e infecciones, asociadas a la medicina natural del pueblo huilliche. Su efecto antimicrobiano fue evaluado contra los hongos *Penicillium expansum*, *Candida albicans* y las bacterias *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pneumoniae*. Los resultados obtenidos indicaron que 13 de las especies de plantas evaluadas presentaron actividad antimicrobiana, entre ellas destacan: *Acaena argentea* (Cadillo), *Aristotelia chilensis* (Quélón) *Blechnum chilense* (Costilla de vaca), *Francoa appendiculata* (Palqui), *Gevuina avellana* (Avellana) y *Laureliopsis philippiana* (Laurel).

Los autores antes mencionados, concluyen que la información recolectada en relación a la composición química de las especies estudiadas es un aporte al conocimiento de la biodiversidad química de las especies vegetales chilenas, así como a la actividad biológica de sus metabolitos, los cuales representan una gran alternativa para combatir bacterias patógenas que provoca estragos en la población provocando intoxicaciones alimentarias.

Es por esto que resulta imperioso realizar estudios acabados con recursos sustentables que constituyan una alternativa al uso de antimicrobianos, que cada vez desarrollan más resistencia por parte de patógenos. Una futura proyección sería concentrar esfuerzos en el desarrollo de productos a través de la utilización de nuestra amplia gama de especies nativas.

5. CONCLUSIONES

- Los extractos metanólicos de hoja de Lingue (*Persea lingue*), Ñirre (*Nothofagus antártica*), Luma (*Amomyrtus luma*), Picha (*Myrceugenia planipes*) y Meli (*Amomyrtus meli*) presentaron actividad antimicrobiana frente a todas las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* utilizados en este estudio. Los extractos metanólicos de Radal y Notro, sólo presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. Typhimurium* ATCC 14028.
- Los extractos clorofórmicos de las 13 especies vegetales evaluadas mostraron nula actividad frente a las cepas de *E. coli* y *Salmonella*, debido a la baja capacidad de arrastre de compuestos bioactivos de este solvente o a la poca cantidad de compuestos apolares en las especies vegetales evaluadas.
- El pH ácido que presentaron los 28 extractos no arrojó efectos significativos en la inhibición del crecimiento de los distintos microorganismos.
- Los tres extractos que presentaron mayor efecto antimicrobiano en la prueba de inhibición en placa fueron los extractos metanólicos de las especies de Lingue (*Persea lingue*), Ñirre (*Nothofagus antártica*) y Picha (*Myrceugenia planipes*). Mediante la prueba de inhibición en caldo, se pudo observar que los tres extractos presentaron un efecto bactericida frente a todas las cepas utilizadas en este estudio.
- El extracto metanólico de Picha presentó el más amplio y rápido efecto bactericida, obteniendo a las 6 horas de incubación una completa inhibición de la cepa *E. coli* ATCC 8939 y a las 8 horas de las cepas *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* enteropatógena (ECEP), *Salmonella* ATCC 14028 y *Salmonella* ATCC 9270.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABAD, X. 2009. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorence* (matico), *Lepechinia mutica Benth* (Turuyante), *Fuschia ayavacensis* (Pena Pena), *Niphogeton dissecta* (Culantrillodel cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración mínima inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial. Memoria de título Doc. Ecuador. Universidad Técnica particular de Loja, Escuela de Bioquímica y Farmacia. 92p.
- ABOABA O.; SMITH, S. AND OLUDE, F. 2006. Antibacterial effect of edible plant extract on *Escherichia coli* 0157:H7. *Journal Nutrition* 5:325-327.
- ARANGO, G. J. 2010. Introducción al metabolismo secundario compuestos derivados del ácido shikimico Universidad de Antioquia. Facultad de química farmacéutica. Medellín. 42p. (On line) Disponible en: <<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/shikimico.pdf>>
- AVELLO, L.; LOPEZ, C.; GATICA, C.; BUSTOS, E.; BRIEVA, A.; PASTENE, E.; BITTNER, M. 2012. Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17(1)73-83.
- BELFIORE, C.; CASTELLANO P.; VIGNOLO, G. 2007. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. *Food Microbiology*. 24:223-229.
- BELL, C. 2002. Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Food Microbiology*. 78:197-216.
- BHUNIA A. K. 2008. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. 275p. (On line) Disponible en: <<http://es.scribd.com/doc/66496066/Foodborne-Microbial-Pathogens>>
- BURT, S. 2004. Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review *International Journal of Food Microbiology* 94 (3): 223-253.
- CAREY, C.; KOSTRZYNSKA, M.; OJHA, S. AND THOMPSON, P. 2008. The effect of probiotics and organic acid on shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology methods*. 73:125-132.

- CARNEIRO, L.; LINS, M.C.; GARCIA, F.A.; SILVA, P.S.; MAULLER, P.M.; ALVES, G.B.; ROSA, A.; ANDRADE, J.R.C.; FREITAS-ALMEIDA, A.C.AND QUEIROZ, M. 2006. Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk. *International Journal of Food Microbiology*. 108: 15-21.
- CHILE BOSQUE, 2010. Conociendo y disfrutando de la Flora Nativa de Chile. (On line) <<http://www.chilebosque.cl/>> (17 agosto 2010).
- CHILE FLORA, 2009. Introducción a la flora chilena. (On line) <www.chileflora.com> (17 agosto 2010).
- CLAUSSEN, B. 2009. Actividad biológica de extractos crudos de flora nativa del bosque valdiviano sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Tesis Agronomía, Santiago. Universidad Católica de Chile. Facultad de agronomía e ingeniería Forestal. 60p.
- COBIAN, G. 2007. Evaluación de extractos de las hojas de *Gliricidia sepium* (jacq.) en la inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Tesis Maestro en tecnología avanzada. Mexico. Instituto Politecnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. 52p. (On line) Disponible en: <http://www.cicata.ipn.mx/FILES/PDF/PTA_M_20071218_002.PDF>
- CUADROS, A. 2010. Evaluación antibacteriana de metabolitos secundarios de extractos de cepas híbridas de *Pleurotus* spp. Tesis Ingeniero Farmacéutico. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. 82p. (On line) Disponible en: <http://www.biotecnologia.upibi.ipn.mx/recursos/posgrado/Tesis/mc_acm.pdf>
- DE ANCOS, B.; MUÑOZ, M.; GÓMEZ, R.; SÁNCHEZ-MORENO, C. Y CANO, M. 2006. Nuevos sistemas emergentes de higienización en el procesado mínimo de alimentos vegetales. I Simposio Ibero-Americano de Vegetales Frescos Cortados, San Pedro, SP Brazil. 14p. (On line) Disponible en: <http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/begona.pdf>
- DOMINGO, D. y LÓPEZ-BREA, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española Quimioterapéutica*, 16 (4):385-393.
- DRAUGHON, F. A. 2004. Use of botanicals as biopreservatives in foods. *Food Technology* 58(2):20-28.
- FLORA CHILENA. Enciclopedia de la flora chilena. (On line) <<http://www.florachilena.cl>> (17 agosto 2010).

- GARCIA, D. E. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y Forrajes 27: 1-12.
- GÓMEZ, C. D. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrciastes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), especies reportadas en peguche – imbabura, sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngeas. Tesis Ingeniera en biotecnología. Escuela politécnica del ejército. Departamento de ciencias de la vida carrera de ingeniería en biotecnología. 167p. (On line) Disponible en: <<http://www3.espe.edu.ec:8700/bitstream/21000/586/1/T-ESPE-029608.pdf>> (29Jun.2010).
- GÚIZA, D.P. y RINCON, L.M. 2007. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Mintostachys mollis* combinado con Inactivación térmica sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Basillus Cerus*. Memoria de título Micr. Ind. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias. 90 p. (On line) Disponible en: <<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis101.pdf>> (27Jun. 2010).
- HERRERA, F. C. y GARCIA, R. O. 2006. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentarios. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 002:13-16 (On line) Disponible en: <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=90340202>> (3 junio 2010).
- ISMAIEL, A. A. AND PIERSON, M. D. 1990. Effect of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. *Journal of Food Protection* 53 (11): 958–960.
- JAY, J. 2000. Microbiología moderna de los alimentos. 4th ed. Zaragoza. Acribia. 615p.
- JAY, J. 2005. Microbiología moderna de los alimentos. 5th ed. Zaragoza. Acribia. 615p.
- JAWETZ, E., J. MELNICK, E. ADELBERG. 2008. Microbiología médica. 19a ed México. 828p.
- KALENBA, D. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10:813-819.
- LEE, M.; KWON, H.; KWON, D.; PARK, H.; SOHN, D.; KIM, Y; EO, S.; KANG, H.; KIM, S.; LEE, J. 2006. Antibacterial activity of medicinal herb extracts against *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. 111(3):270-275.

- LIZCANO, A. J. y VERGARA, J. L. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos. Memoria de título Microbiología Industrial. Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Microbiología Industrial. 131p. (On line) Disponible en: < <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>>
- MATTOS DE OLIVEIRA M.; BRUGNERA D.; GRAÇAS, M.; ALVES E. AND HILSDORF, R. 2010. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. Food Control 21 (4): 549-553.
- MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G. AND DEL VALLE, C. E. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. Food science Technology 38(5): 565-570.
- MØLGAARDA, P.; GITZ, J.; ASAR, B.; LIBERNA, I.; BAKKESTRØM, L.; PLOUG, C.; JØRGENSEN, L.; LAURITZEN, J.; GUZMAN, A.; ADSERSEN, A.; TOFT, H. 2011. Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. Journal of Ethnopharmacology 138: 219– 227.
- MURRAY, P. R. 2009. Microbiología médica. 6ª edición. España. 947p.
- RAYBAUDI-MASSILIA, R.; SOLIVA F.; ROBERT AND MARTÍN BELLOSO. 2006. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. I Simposio Ibero-Americano de Vegetales Frescos Cortados, San Pedro, SP Brazil. 15:21. (On line) Disponible en: <http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf>
- REYES OLIVERO. A. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de murta (*Ugni molinae* Turcz.). Universidad de la frontera Facultad de ingeniería, ciencias y administración Departamento de Ingeniería Química. Trabajo para optar al título de Ingeniero en Alimentos.
- RÍOS, J. L. y RECIO M. C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology. 100 (2): 80-84.
- RODRÍGUEZ DE LEÓN, ARACELY. 2005. Determinación de *Escherichia coli* en ensaladas a base de lechuga preparadas en restaurantes de comida rápida. Tesis Quim. Farmac. Universidad de San Carlos. Facultad de ciencias químicas y farmacia. Guatemala. 57p. (On line) Disponible en: <http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2278.pdf>

- RODRÍGUEZ, ANDREA P.; CORREA, ANDRÉS; SUÁREZ, MARTHA Y LÓPEZ, JAIRO. 2011. Valoración de desinfectantes mediante el método dilución-neutralización en cepas de *Salmonella* spp. aisladas en plantas de beneficio porcino. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2 (1): 187-201. (On line) Disponible en:
<http://www.rvcta.org/Publicaciones/Vol2Num1/ArchivosV2N1/RodriguezTrivino_et_al._RVCTA-V2N1.pdf>
- SANCHEZ, C. 2006. ¿Antibióticos ayer, hoy y mañana...?. Revista Química Viva revista (On line) 5 (2):63-77. Disponible en:
<<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez.html>> (10 agosto 2010).
- SULCA, T. 2010. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Acmella repens* (Botoncillo), *Urtica dioica* (Ortiga negra) y *Sonchus oleraceus* (Kana yuyo), Plantas registradas en la parroquia La esperanza- Imbabura, sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, causantes de enfermedades bucofaríngeas. Tesis Ingeniera en biotecnología. Escuela politécnica del ejército. Departamento de ciencias de la carrera de ingeniería en biotecnología. 167p. (On line) Disponible en:
<<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2648/1/T-ESPE-030037.pdf>> (29Jun.2010).
- TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A. and CLIVER, D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21 (9): 1199-1218.
- ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J. y MOEZELAAR, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, Applied and Environmental Microbiology. 68: 1561–1568.
- VAARA, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiological Reviews 56 (3): 395–411.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Descripción de las especies nativas evaluadas

Nombre común: Luma, reloncaví, luma roja.

Nombre científico: *Amomyrtus luma*

Familia: MYRTACEAE

Género: AMOMYRTUS

Distribución y Hábitat: Especie endémica que vive preferentemente en sitios húmedos, cercano a cursos de agua y en el interior del bosque. Se distribuye desde Colchagua a Aisén (VII a XI región).



Descripción: Árbol siempreverde y aromático. Alcanza hasta 20 metros de altura y su tronco unos 60 cm de diámetro. La corteza es lisa, rojiza a pardo clara, y se descascara en placas redondeadas. Hojas opuestas de forma ovalada a oblonga con ápice agudo que termina en un mucrón de hasta 1mm de largo. Brotes nuevos pubescentes lo que la diferencian del Meli (*Amomyrtus meli*), especie a la cual se parece mucho.

Usos: Los frutos, llamados cauchaos, son comestible y sirven para fabricar mermelada, la madera es extremadamente dura y resistente, muy buena como leña, buena alternativa de manejo para este efecto. También como especie ornamental debido a que florece abundantemente y es muy fragante.

Etimología: *Amomyrtus*, del griego Amo = muy fragante y Myrtus nombre griego de la familia. **Luma**, nombre mapuche de la planta.

Nombre común: Sauco del diablo, traumén, sauco cimarrón, palo mayor.

Nombre científico: *Raukaua laetevirens*

Familia: ARALIACEAE

Género: RAUKAUA

Distribución y Hábitat: Sauco del Diablo crece desde el Maule hasta Magallanes (VI a XII región), también en Argentina. Habita cerca de cursos de agua.



Descripción: Árbol siempreverde, de contextura fina. Se destaca en el bosque por su colorido verde claro. Bajo ciertas condiciones adquiere una forma arbustiva o se asemeja a una liana. Alcanza una altura de hasta 8 metros y su tronco un diámetro de unos 30 cm. La corteza es grisácea y lisa. Sus hojas palmadas bordes aserrados son muy características.

Nombre común: Canelo, boique, voigue, fuñe, foye

Nombre científico: *Drimys winteri*

Familia: WINTERACEAE

Género: DRIMYS

Distribución y Hábitat: Canelo se distribuye desde la IV región hasta la XII, en ambas cordilleras, ocupando una gran variedad de hábitat. Se asocia a ambientes húmedos, cerca de cursos de agua o en laderas sombrías. También está presente en el sur de Argentina.



Descripción: Árbol siempreverde, de copa piramidal, a menudo compacta. Llega a medir hasta 30 metros de altura y su tronco 1 metro de diámetro. La corteza es gruesa, lisa, blanda y de color grisáceo. Sus hojas son de las más grandes en la flora arbórea chilena, miden entre 5 a 15 cm, con una notoria diferencia de coloración entre la cara superior que es verde claro y la inferior, verde grisácea o blanquecina.

Nombre común: Temu

Nombre científico: *Blepharocalyx cruckshanksii*

Familia: MYRTACEAE

GÉNERO: BLEPHAROCALYX

Distribución y Hábitat: Especie endémica de los bosques de Chile central desde el valle Aconcagua hasta Llanquihue (V a X región). Habita en lugares húmedos cercano a cursos de agua. Especie poco frecuente.



Descripción: Árbol pequeño siempre verde que alcanza una altura de hasta 15m y un diámetro de hasta 50cm, corteza lisa de color rojizo a café, los tallos tienen forma cuadrangular. Hojas opuestas, borde entero, de forma elíptica, oblonga u oblanceoladas con ápice obtuso o emarginado, base cuneada o aguda.

Usos: Especie con alto potencial ornamental, debido a su belleza y abundante floración aromática.

Etimología: **Blepharocalyx**, del griego Blepharo = pestañas y calyx = cáliz, debido a la pubescencia que presenta en el cáliz. **Cruckshanksii**, en honor a Alexander Cruckshanks, **Temu**, es el nombre indígena de la planta.

Nombre común: Tineo, tenío, tenú, tinel, madén, palo santo

Nombre científico: *Weinmannia trichosperma*

Familia: CUNONIACEAE

Género: WEINMANNIA

Distribución y Hábitat: Tineo crece desde el Maule hasta la península de Taitáo (VI a XI región), también en Argentina. Habita en sitios húmedos.



Descripción: Árbol siempreverde, de follaje claro y copa rala. Alcanza una altura de hasta 40 metros y su tronco un diámetro de unos 2 metros. La corteza es ligeramente arrugada, gris clara, con fisuras longitudinales y transversales bien marcadas. Sus hojas aparentan encajes bordados, además, posee un racimo cilíndrico compuesto por flores blanco-crema, que luego se torna rosado y rojo al madurar los frutos.

Usos: Ornamental. La madera es hermosa pero muy dura. La corteza machacada se utiliza como cicatrizante y también como curtiembre. Las flores, ricas en néctar, producen una miel de muy buen sabor.

Etimología: *Weinmannia*, en honor a J. A. Weinmann, importante botánico Alemán (1782-1858) *Trichosperma*, del latín = semillas peludas. **Tineo**, nombre indígena.

Nombre común: Raulí

Nombre científico: *Nothofagus alpina*

Familia: NOTHOFAGACEAE

Género: NOTHOFAGUS

Distribución y Hábitat: Raulí crece desde Curicó hasta Fresia (VI a X región), también en Argentina. Habita en lugares con bajas temperaturas y fuertes vientos.



Descripción: Árbol monoico, caducifolio, frondoso, de hasta 40m de altura y 2m de diámetro. Tronco recto y cilíndrico, corteza de color gris agrietada en forma longitudinal. Hojas alternas, pecíolos de 3-10mm de largo, de forma ovado- oblonga, con glándulas y pelos distribuidos regularmente, márgenes ondulados y suavemente aserrados, venación pinada, pilosa y muy notoria, sobre todo en el envés.

Usos: La madera, muy cotizada, es de hermoso tono rosado, muy empleada en todo tipo de construcción.

Etimología: *Nothofagus*, del latín falsa haya. *Alpina*, de la montaña. **Raulí**, nombre Mapuche de la planta.

Nombre común: Meli o luma blanca.

Nombre científico: *Amomyrtus meli*

Familia: MYRTACEAE

Género: AMOMYRTUS

Distribución y Hábitat: Especie endémica de los bosques valdivianos que vive preferentemente en sitios húmedos y sombríos desde Arauco a Chiloé (VIII a X región).

Descripción: Árbol siempreverde, de copa piramidal. Alcanza hasta los 20 metros de altura y su tronco unos 60 cm de diámetro. La corteza es lisa, blanco-cenicienta y se descascara dejando placas irregulares. Las hojas tienen un intenso aroma cítrico. El tronco blanco de esta especie es muy característico, hecho que la hace inconfundible entre las especies de árboles chilenos.

Usos: La madera es extremadamente dura y resistente por lo que se utiliza para fabricar mangos de herramientas y piezas de carretas. También como especie ornamental debido a que florece abundantemente y es muy fragante.

Etimología: **Amomyrtus**, del griego Amo = muy fragante y Myrtus nombre griego de la familia. **Meli**, nombre mapuche de la planta.



Nombre común: Radal

Nombre científico: *Lomatia hirsuta*

Familia: PROTEACEAE

Género: LOMATIA

Distribución y Hábitat: Radal se distribuye desde Coquimbo hasta la isla de Chiloé (IV a X región). También en Perú y Ecuador. Crece en variadas condiciones de suelo y humedad.

Descripción: Árbol pequeño de hasta 15m de altura y 80cm de diámetro, siempreverde. Corteza gris clara con fisuras longitudinales poco profundas. Hojas alternas, ovadas, de base acorazonada, láminas de 5-20 x 4-12cm, de bordes dentados, color verde oscuro lustroso y verde opaco en el envés, con la nervadura bien marcada en el envés.

Usos: La madera es de hermosa veta, parecida a la del avellano, pero de inferior calidad. Las hojas se utilizan para teñir lana de color café oscuro.

Etimología: **Lomatia**, del griego = lomas, por el borde que tienen las semillas. **Hirsuta**, del latín = peludo, eludiendo a sus flores. **Radal**, nombre puche



Nombre común: Pillo pillo, pelu pelu, pillu pillu, palo hediondo

Nombre científico: *Ovidia pillopillo*

Familia: THYMELAEACEAE

Género: OVIDIA

Distribución: Endémico de Chile. Se encuentra entre las provincias de Malleco y Chiloé. Habita sobre todo en la Cordillera de la Costa, desde el nivel del mar hasta los 700 metros de altitud.

Descripción: Árbol siempreverde, de forma alargada y columnar. Crece hasta los 7 metros de altura y su tronco alcanza un diámetro de unos 40 cm. La corteza es de color ceniciento y lisa. En general, despide un olor fuerte y desagradable. Hojas alternas, sésiles, de borde entero, de forma oblongo-elíptica.

Usos: Ornamental, la corteza se utiliza como purgante.

Etimología: *Ovidia*, en honor al poeta Publio Ovidio.



FUENTE: Elaboración propia en base a <http://www.chilebosque.cl/libroarbolesnativos.html>

ANEXO 2

Resultados prueba de antagonismo en placa

— : NO PRESENTA INHIBICIÓN

+ : PRESENTA INHIBICIÓN

Nombre común	Nº	<i>Salmonella</i> ATCC 14028	<i>Salmonella</i> ATCC 9270	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>E. coli</i> Enteropatógena
Lingue	1M	+	+	+	+	+
	1C	—	—	—	—	—
Ñirre	2M	+	+	+	+	+
	2C	—	—	—	—	—
Traumen, Sauco	3M	—	—	—	—	—
	3C	—	—	—	—	—
Luma	4M	+	+	+	+	+
	4C	—	—	—	—	—
Canelo	5M	—	—	—	—	—
	5C	—	—	—	—	—
Temu	6M	—	—	—	—	—
	6C	—	—	—	—	—
Tineo	7M	—	—	—	—	—
	7C	—	—	—	—	—
Raulí	8M	—	—	—	—	—
	8C	—	—	—	—	—
Picha	9M	+	+	+	+	+
	9C	—	—	—	—	—
Melí	10M	+	+	+	+	+
	10C	—	—	—	—	—
Radal	11M	+	—	—	—	—
	11C	—	—	—	—	—
Notro	12M	+	—	—	—	—
	12C	—	—	—	—	—
Pillo Pillo	13M	—	—	—	—	—
	13C	—	—	—	—	—
Pillo pillo (corteza)	14M	—	—	—	—	—
	14C	—	—	—	—	—

Fuente: elaboración propia

ANEXO 3

Análisis estadístico de halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos frente a las cepa de *E. coli* ATCC 29522.

3.1. Prueba de homogeneidad de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,489592	0,743758
C de Cochran	0,77547	0,0127078
Bartlett	2,5785	0,0955625

3.2. Tabla ANOVA para diámetro (mm) halo de inhibición.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Extracto	78,686	4	19,6715	146,50	0,0000
B:Repetición	0,00417333	2	0,00208667	0,02	0,9846
RESIDUOS	1,07423	8	0,134278		
TOTAL (CORREGIDO)	79,7644	14			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

3.3. Contraste Múltiple de Rango para halos de inhibición (mm) según extracto.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Extracto</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Meli	3	16,2633	0,211564	x
Luma	3	19,1767	0,211564	x
Ñirre	3	20,53	0,211564	x
Lingue	3	21,89	0,211564	x
Picha	3	22,7967	0,211564	x

ANEXO 4

Análisis estadístico de halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos frente a las cepa de *E. coli* ATCC 8739.

4.1. Prueba de homogeneidad de Varianza

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,359561	0,831848
C de Cochran	0,440923	0,488491
de Bartlett	1,20287	0,819671

4.2. Tabla ANOVA para diámetro (mm) halo de inhibición.

Análisis de Varianza para Halo de inhibición - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Extracto	85,909	4	21,4772	97,86	0,0000
B:Repetición	0,509693	2	0,254847	1,16	0,3608
RESIDUOS	1,75571	8	0,219463		
TOTAL (CORREGIDO)	88,1744	14			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

4.3. Contraste Múltiple de Rango para halos de inhibición (mm) según extracto.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Extracto</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Meli	3	16,1	0,270471	x
Luma	3	19,17	0,270471	x
Lingue	3	21,4967	0,270471	x
Picha	3	22,0667	0,270471	x
Nirre	3	22,5733	0,270471	x

ANEXO 5

Análisis estadístico de halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos frente a la cepa de *E. coli* enteropatógena (ECEP).

5.1. Prueba de homogeneidad de Varianza

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,0782351	0,987268
C de Cochran	0,306559	1,0
de Bartlett	1,05831	0,976145

5.2. Tabla ANOVA para diámetro (mm) halo de inhibición

Análisis de Varianza para Halo de inhibición - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Extracto	85,909	4	21,4772	97,86	0,0000
B:Repetición	0,509693	2	0,254847	1,16	0,3608
RESIDUOS	1,75571	8	0,219463		
TOTAL (CORREGIDO)	88,1744	14			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

5.3. Contraste Múltiple de Rango para halos de inhibición (mm) según extracto.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Extracto</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Meli	3	16,1	0,270471	x
Luma	3	19,17	0,270471	x
Lingue	3	21,4967	0,270471	x
Picha	3	22,0667	0,270471	x
Ñirre	3	22,5733	0,270471	x

ANEXO 6

Análisis estadístico de halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos frente a la cepa *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028.

6.1. Prueba de homogeneidad de Varianza

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,734072	0,589291
C de Cochran	0,56745	0,175032
de Bartlett	1,56457	0,443762

6.2. Tabla ANOVA para diámetro (mm) halo de inhibición.

Análisis de Varianza para Halo de inhibición - Suma de Cuadrados Tipo III

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Extractos	392,584	6	65,4307	312,89	0,0000
B:Repeticiones	0,0818381	2	0,040919	0,20	0,8249
RESIDUOS	2,50943	12	0,209119		
TOTAL (CORREGIDO)	395,176	20			

6.3. Contraste Múltiple de Rango para halos de inhibición (mm) según extracto.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Extractos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Notro	3	12,3033	0,26402	x
Radal	3	13,69	0,26402	x
Meli	3	17,0633	0,26402	x
Luma	3	19,2833	0,26402	x
Picha	3	22,39	0,26402	x
Ñirre	3	23,11	0,26402	xx
Lingue	3	24,0767	0,26402	x

ANEXO 7

Análisis estadístico de halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos frente a la cepa de *Salmonella enterica* serovar Anatum ATCC 9270.

7.1. Prueba de homogeneidad de Varianza

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,431725	0,782904
C de Cochran	0,426337	0,5415
de Bartlett	1,31231	0,68716

7.2. Tabla ANOVA para diámetro (mm) halo de inhibición.

Análisis de Varianza para Halo de inhibición - Suma de Cuadrados Tipo III

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Extractos	1903,95	6	317,324	440,38	0,0000
B:Repeticiones	1,49155	2	0,745776	1,03	0,3849
RESIDUOS	8,64691	12	0,720576		
TOTAL (CORREGIDO)	1914,08	20			

7.3. Contraste Múltiple de Rango para halos de inhibición (mm) según extracto.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Extractos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Radal	3	0,0	0,490094	x
Notro	3	0,0	0,490094	x
Meli	3	16,2667	0,490094	x
Luma	3	19,03	0,490094	x
Picha	3	21,54	0,490094	x
Ñirre	3	22,6	0,490094	x
Lingue	3	23,19	0,490094	x

ANEXO 8

Resultados de recuento de células viables (Antagonismo en caldo)

8.1. Recuento en placa de *E. coli* ATCC 29522 (Log ufc/ml)

HORA	Control	Lingue	Ñirre	Picha	Control DS	Lingue DS	Ñirre DS	Picha DS
0	5,21	4,53	4,88	4,74	0,01	0,11	0,07	0,11
2	5,61	3,42	4,35	3,65	0,02	0,02	0,27	0,22
4	7,13	2,18	4,06	2,48	0,26	0,06	0,09	0,07
6	8,45	<1,0	1,70	<1,0	0,05	0,00	0,65	0,00
8	8,95	<1,0	<1,0	<1,0	0,02	0,00	0,00	0,00
10	9,18	<1,0	<1,0	<1,0	0,06	0,00	0,00	0,00
24	9,25	<1,0	<1,0	<1,0	0,06	0,00	0,00	0,00
30	9,04	<1,0	<1,0	<1,0	0,04	0,00	0,00	0,00

8.2. Recuento en placa de *E. coli* ATCC 8739 (Log ufc/ml).

HORA	Control	Lingue	Ñirre	Picha	Control DS	Lingue DS	Ñirre DS	Picha DS
0	5,10	4,42	4,50	4,26	0,10	0,05	0,19	0,07
2	5,81	3,51	3,47	3,79	0,04	0,06	0,22	0,08
4	7,44	3,23	3,20	2,53	0,11	0,20	0,14	0,14
6	8,61	2,30	2,43	<1,0	0,07	0,13	0,27	0,00
8	9,08	1,34	<1,0	<1,0	0,08	0,05	0,00	0,00
10	9,28	<1,0	<1,0	<1,0	0,06	0,00	0,00	0,00
24	9,38	<1,0	<1,0	<1,0	0,07	0,00	0,00	0,00
30	8,85	<1,0	<1,0	<1,0	0,14	0,00	0,00	0,00

8.3. Recuento en placa de *E. coli* enteropatógena (ECEP) (Log ufc/ml).

HORA	Control	Lingue	Ñirre	Picha	Control DS	Lingue DS	Ñirre DS	Picha DS
0	5,21	5,10	5,12	4,57	0,01	0,02	0,04	0,09
2	6,43	4,73	4,78	4,38	0,08	0,16	0,15	0,07
4	7,67	3,84	3,73	3,75	0,08	0,10	0,05	0,16
6	8,74	2,33	3,10	2,51	0,23	0,19	0,06	0,18
8	9,78	1,22	2,58	<1,0	0,08	0,10	0,05	0,00
10	9,90	<1,0	1,78	<1,0	0,05	0,00	0,18	0,00
24	9,95	<1,0	<1,0	<1,0	0,04	0,00	0,00	0,00
30	9,59	<1,0	<1,0	<1,0	0,07	0,00	0,00	0,00

8.4. Recuento en placa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 (Log ufc/ml).

HORA	Control	Lingue	Ñirre	Picha	Control DS	Lingue DS	Ñirre DS	Picha DS
0	5,17	4,76	4,43	4,64	0,07	0,20	0,11	0,14
2	6,19	4,22	4,28	4,34	0,09	0,20	0,14	0,08
4	7,16	3,71	3,61	3,57	0,07	0,31	0,34	0,20
6	8,40	2,40	2,53	1,32	0,10	0,29	0,17	0,21
8	9,14	<1,0	1,35	<1,0	0,16	0,00	0,03	0,00
10	9,32	<1,0	<1,0	<1,0	0,10	0,00	0,00	0,00
24	9,46	<1,0	<1,0	<1,0	0,06	0,00	0,00	0,00
30	9,50	<1,0	<1,0	<1,0	0,31	0,00	0,00	0,00

8.5. Recuento en placa de *Salmonella enterica* serovar Anatum ATCC 9270 (Log ufc/ml).

HORA	Control	Lingue	Ñirre	Picha	Control DS	Lingue DS	Ñirre DS	Picha DS
0	5,15	4,67	4,51	4,65	0,04	0,09	0,11	0,10
2	6,26	3,01	3,52	3,90	0,06	0,07	0,09	0,09
4	8,21	1,11	3,36	2,45	0,07	0,10	0,04	0,08
6	8,80	<1,0	2,70	1,35	0,05	0,00	0,05	0,10
8	9,18	<1,0	<1,0	<1,0	0,03	0,00	0,00	0,00
10	9,29	<1,0	<1,0	<1,0	0,04	0,00	0,00	0,00
24	9,39	<1,0	<1,0	<1,0	0,03	0,00	0,00	0,00
30	9,28	<1,0	<1,0	<1,0	0,01	0,00	0,00	0,00

ANEXO 9

Análisis estadístico de recuento de *Escherichia coli* ATCC 29522 con los distintos tratamientos.

9.1. Tabla ANOVA para recuento (UFC/ml).

Análisis de Varianza - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTOS	731,63	3	243,877	11903,23	0,0000
B:TIEMPO	97,5585	7	13,9369	680,24	0,0000
C:REPETICIONES	0,014175	2	0,0070875	0,35	0,7096
INTERACCIONES					
AB	215,758	21	10,2742	501,47	0,0000
RESIDUOS	0,860508	42	0,0204883		
TOTAL (CORREGIDO)	1046,28	95			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

9.2. Contraste Múltiple de Rango para recuento (UFC/ml) según extracto.

Pruebas de Múltiple Rangos para recuento por TRATAMIENTOS

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>TRATAMIENTOS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LINGUE	24	1,265	0,0292178	x
PICHA	24	1,35875	0,0292178	x
NIRRE	24	1,87208	0,0292178	x
CONTROL	24	7,85167	0,0292178	x

9.3. Contraste Múltiple de Rango para recuento (UFC/ml) según tiempo.

Pruebas de Múltiple Rangos para recuento por TIEMPO

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>TIEMPO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
8	12	2,2375	0,0413202	x
30	12	2,26	0,0413202	x
10	12	2,29417	0,0413202	x
24	12	2,3125	0,0413202	x
6	12	2,53583	0,0413202	x
4	12	3,9625	0,0413202	x
2	12	4,2575	0,0413202	x
0	12	4,835	0,0413202	x

ANEXO 10

Análisis estadístico de recuento de *E. coli* ATCC 8739 con los distintos tratamientos.

10.1. Tabla ANOVA para recuento (UFC/ml).

Análisis de Varianza para recuento- Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTOS	722,476	3	240,825	29433,58	0,0000
B:TIEMPO	77,2322	7	11,0332	1348,47	0,0000
C:REPETICION	0,0289521	2	0,014476	1,77	0,1829
INTERACCIONES					
AB	197,338	21	9,39706	1148,50	0,0000
AC	0,137273	6	0,0228788	2,80	0,0222
RESIDUOS	0,343644	42	0,00818199		
TOTAL (CORREGIDO)	997,724	95			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

10.2. Contraste Múltiple de Rango para recuento (UFC/ml) según extracto.

Pruebas de Múltiple Rangos para recuento por TRATAMIENTOS

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>TRATAMIENTOS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
PICHA	24	1,3225	0,0184639	X
ÑIRRE	24	1,70083	0,0184639	X
LINGUE	24	1,84958	0,0184639	X
CONTROL	24	7,94417	0,0184639	X

10.3. Contraste Múltiple de Rango para recuento (UFC/ml) según tiempo.

Pruebas de Múltiple Rangos para recuento por TIEMPO

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>TIEMPO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
30	12	2,21333	0,0261119	X
10	12	2,31917	0,0261119	XX
24	12	2,34417	0,0261119	X
8	12	2,60583	0,0261119	X
6	12	3,335	0,0261119	X
4	12	4,1	0,0261119	X
2	12	4,14667	0,0261119	X
0	12	4,57	0,0261119	X

ANEXO 11

Análisis estadístico de recuento de *E. coli* enteropatógena (ECEP) con los distintos tratamientos.

11.1. Tabla ANOVA para recuento (UFC/ml).

Análisis de Varianza para recuento - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTOS	690,564	3	230,188	15398,02	0,0000
B:TIEMPO	106,832	7	15,2618	1020,91	0,0000
C:REPETICIONES	0,031825	2	0,0159125	1,06	0,3540
INTERACCIONES					
AB	238,904	21	11,3764	761,00	0,0000
RESIDUOS	0,627867	42	0,0149492		
TOTAL (CORREGIDO)	1037,27	95			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

11.2. Contraste Múltiple de Rango para recuento (UFC/ml) según extracto.

Pruebas de Múltiple Rangos para recuento por TRATAMIENTOS

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>TRATAMIENTOS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
PICHA	24	1,94	0,0249576	x
ÑIRRE	24	2,1525	0,0249576	x
LINGUE	24	2,63375	0,0249576	x
CONTROL	24	8,40875	0,0249576	x

11.3. Contraste Múltiple de Rango para recuento (UFC/ml) según tiempo.

Pruebas de Múltiple Rangos para recuento por TIEMPO

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
30	12	2,39833	0,0352954	x
24	12	2,48667	0,0352954	x
10	12	2,91667	0,0352954	x
8	12	3,39333	0,0352954	x
6	12	4,1675	0,0352954	x
4	12	4,82667	0,0352954	x
0	12	5,0	0,0352954	x
2	12	5,08083	0,0352954	x

ANEXO 12

**Análisis estadístico de recuento de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
ATCC 14028 con los distintos tratamientos.**

12.1. Tabla ANOVA para recuento (UFC/ml).**Análisis de Varianza para recuento - Suma de Cuadrados Tipo III**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTOS	684,502	3	228,167	9022,88	0,0000
B:TIEMPO	106,154	7	15,1649	599,69	0,0000
C:REPETICION	0,0228812	2	0,0114406	0,45	0,6392
INTERACCIONES					
AB	218,824	21	10,4202	412,07	0,0000
RESIDUOS	1,06208	42	0,0252876		
TOTAL (CORREGIDO)	1010,92	95			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

12.2. Contraste Múltiple de Rango para recuento (UFC/ml) según extracto.**Pruebas de Múltiple Rangos para recuento por TRATAMIENTOS**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>TRATAMIENTOS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
PICHA	24	1,73292	0,03246	x
LINGUE	24	1,88792	0,03246	x
ÑIRRE	24	2,02417	0,03246	x
CONTROL	24	8,04375	0,03246	x

12.3. Contraste Múltiple de Rango para recuento (UFC/ml) según tiempo.**Pruebas de Múltiple Rangos para recuento por TIEMPO**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>TIEMPO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
10	12	2,33083	0,0459054	x
24	12	2,365	0,0459054	x
30	12	2,37583	0,0459054	x
8	12	2,62167	0,0459054	x
6	12	3,66	0,0459054	x
4	12	4,51417	0,0459054	x
0	12	4,75167	0,0459054	x
2	12	4,75833	0,0459054	x

ANEXO 13

Análisis estadístico de recuento de *Salmonella enterica* serovar Anatum ATCC 9270 con los distintos tratamientos.

13.1. Tabla ANOVA para recuento (UFC/ml).

Análisis de Varianza para recuento - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTOS	819,746	3	273,249	89237,04	0,0000
B:TIEMPO	80,775	7	11,5393	3768,48	0,0000
C:REPETICION	0,00766458	2	0,00383229	1,25	0,2965
INTERACCIONES					
AB	197,145	21	9,38784	3065,86	0,0000
RESIDUOS	0,128606	42	0,00306205		
TOTAL (CORREGIDO)	1097,86	95			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

13.2. Contraste Múltiple de Rango para recuento (UFC/ml) según extracto.

Pruebas de Múltiple Rangos para recuento por TRATAMIENTOS

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>TRATAMIENTOS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LINGUE	24	1,09792	0,0112954	X
PICHA	24	1,54375	0,0112954	X
ÑIRRE	24	1,76083	0,0112954	X
CONTROL	24	8,19333	0,0112954	X

13.3. Contraste Múltiple de Rango para recuento (UFC/ml) según tiempo.

Pruebas de Múltiple Rangos para ATCC 9270 por TIEMPO

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>TIEMPO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
8	12	2,295	0,0159741	X
30	12	2,31917	0,0159741	X
10	12	2,32333	0,0159741	X
24	12	2,34583	0,0159741	X
6	12	3,21417	0,0159741	X
4	12	3,7825	0,0159741	X
2	12	4,16833	0,0159741	X
0	12	4,74333	0,0159741	X