



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE *CAPSICUM* COMERCIAL EN
BACTERIAS GRAM POSITIVAS, GRAM NEGATIVAS Y
LEVADURA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
TÁBATA ANDREA FRANCO VEGA**

ASESORA:

DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mis padres Andrea Vega y Juan Franco, a quienes les debo la vida, gracias por estar siempre a mi lado apoyándome en todo lo que necesito. Los amo mucho.

A ti abuelita Margarita que siempre estarás en corazón, gracias por la vida que me diste.

A mi hermana Nora, eres una gran hermanita. Te amo.

A ti David por el apoyo incondicional, gracias corazón por quererme tanto. Te amo

A toda mi familia (tíos, abuelos, primos) porque siempre han estado a mi lado.

A todas mis amigas, las quiero.

A la Doctora Patricia Miranda, por la paciencia, tolerancia y por todo el aprendizaje, sin palabras Mil Gracias.

Agradecimientos

A la Doctora Clara Inés Alvarez, por su apoyo, sus enseñanzas y por facilitarme algunas de las bacterias utilizadas en la experimentación.

A la M. en C. Gina Benitez Esquivel por la orientación en el tratamiento estadístico.

Al técnico Rodolfo Robles Gómez por el apoyo fotográfico. (Laboratorio de Microscopía Electrónica)

Índice general

Introducción	10
1.Antecedentes	11
1.1 Historia del fruto del chile	11
1.1.1 Anatomía y características químicas del chile	12
1.1.2 Capsaicinoides	13
1.1.3 Capsaicina	15
1.1.3.1 Métodos de cuantificación de capsaicina	17
1.1.3.2 Aplicaciones de la capsaicina	19
1.1.3.3 Productos que contienen capsaicina en su formulación	21
1.1.3.4 Efectos de la capsaicina en los alimentos	22
1.1.3.5 Capsaicina como antimicrobiano	22
1.2 Importancia de la inocuidad alimentaria	24
2.Objetivos	27
3.Cuadro metodológico	28
3.1 Descripción de actividades preliminares	29
3.1.1.1 Actividad preliminar 1	29
Determinación del gram de cada una de las bacterias.	
3.1.1.2 Actividad preliminar 2	29
Evaluación de la cantidad de microorganismos en cada uno de los inóculos de las bacterias: <i>Staphylococcus aureus</i> 25922, <i>Escherichia coli</i> 8739, <i>Salmonella</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus cereus</i> , y la levadura <i>Candida albicans</i> .	
3.1.1.3 Actividad preliminar 3	30
Obtención del extracto etanólico a partir de <i>Capsicum</i> Comercial 650,000 unidades Scoville Institute of Flavors and Fragrances (IFF).	
3.1.1.4 Actividad preliminar 4	31
Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de <i>Capsicum</i> comercial a través de halos de inhibición.	
3.2 Objetivo 1 Actividad Preliminar. Incubar una colonia de cada una de las bacterias.	32
3.3 Objetivo particular 1	32
Determinar la cinética de crecimiento de las bacterias con extracto etanólico de <i>Capsicum</i> comercial contra tiempo a través de conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml).	
3.4 Objetivo 2. Actividad Preliminar. Incubar una colonia de cada una de las bacterias.	33

3.5 Objetivo particular 2	33
Determinar la cinética de crecimiento de las bacterias con extracto etanólico de <i>Capsicum</i> comercial contra el tiempo a través de densidad óptica (D.O.) a 590 nm.	
4. Resultados y discusión	34
4.1 Actividad preliminar 1	34
4.2 Actividad preliminar 2	36
4.3 Actividad preliminar 3	37
4.4 Actividad preliminar 4	38
4.5 Objetivo particular 1	39
4.6 Objetivo particular 2	47
Conclusiones	59
Referencias	60
Anexos	64

Índice de cuadros

Cuadro	Descripción	Página
1	Composición de una mezcla cristalina de capsaicinoides purificados de una muestra de chile de origen japonés.	14
2	Productos con capsaicina. (Nombre. Presentación y uso).	21
3	Características generales de las bacterias y levadura.	26
4	Relación de concentraciones de cada muestra, colocados sobre papel filtro en caja petri.	31
5	Imágenes microscópicas (objetivo 100x) de tinción gram de las bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> 25922, <i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia coli</i> 8739, <i>Salmonella</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus cereus</i> , y la levadura <i>Candida albicans</i> .	34
6	Cantidad de microorganismos presentes en cada inóculo de cada bacteria.	36
7	Diámetros de halos de inhibición de las bacterias gram positivas y negativas a diferentes concentraciones de extracto etanólico de <i>Capsicum</i> .	38
8	Resumen de Resultados de Objetivo Particular 1.	47
9	Promedios de velocidades de crecimiento (Control y con <i>Capsicum</i>).	57

Índice de figuras

Figura	Descripción	Página
1	Anatomía característica del chile.	12
2	Estructuras químicas de los capsaicinoides.	13
3	Estructura química de la capsaicina.	15
4	Colocación en caja petri de cada una de las concentraciones, para prueba con halos de inhibición.	31
5	Cinética de crecimiento de <i>Salmonella</i> vs <i>Salmonella</i> + <i>Capsicum</i> (UFC/ml.).	39
6	Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> vs <i>Pseudomonas</i> + <i>Capsicum</i> (UFC/ml.).	40
7	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> vs <i>Escherichia coli</i> + <i>Capsicum</i> (UFC/ml.).	41
8	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> 8739 vs <i>Escherichia coli</i> 8739 + <i>Capsicum</i> (UFC/ml.).	42
9	Cinética de crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> vs <i>Bacillus cereus</i> + <i>Capsicum</i> (UFC/ml.).	43
10	Cinética de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> vs <i>Listeria monocytogenes</i> + <i>Capsicum</i> (UFC/ml.).	44
11	Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> 25922 vs <i>Staphylococcus aureus</i> 25922 + <i>Capsicum</i> (UFC/ml.).	45
12	Cinética de crecimiento de <i>Candida albicans</i> vs <i>Candida albicans</i> + <i>Capsicum</i> (UFC/ml.).	46
13	Cinética de crecimiento de <i>Salmonella</i> vs <i>Salmonella</i> + <i>Capsicum</i> (Absorbancia) <i>Capsicum</i> .	49
14	Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> vs <i>Pseudomonas</i> + <i>Capsicum</i> (Absorbancia).	50
15	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> vs <i>Escherichia coli</i> + <i>Capsicum</i> (Absorbancia).	51
16	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> 8739 vs <i>Escherichia coli</i> 8739 + <i>Capsicum</i> (Absorbancia).	52

17	Cinética de crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> vs <i>Bacillus cereus</i> + <i>Capsicum</i> (Absorbancia).	53
18	Cinética de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> vs <i>Listeria monocytogenes</i> + <i>Capsicum</i> (Absorbancia).	54
19	Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> 25922 vs <i>Staphylococcus aureus</i> 25922 + <i>Capsicum</i> (Absorbancia).	55
20	Cinética de crecimiento de <i>Candida albicans</i> vs <i>Candida albicans</i> + <i>Capsicum</i> (Absorbancia).	56

Introducción

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío, y por ello se ofrecen como alternativa en diferentes padecimientos.

Deben ser considerados elementos naturales a los que forman la tabla periódica y como ejemplo de antimicrobiano se pueden citar el oxígeno, yodo y el arsénico, empleados para las infecciones por anaerobios, la desinfección, etc. Mención especial merece el uso de sustancias producidas por microorganismos con carácter biocida, haciendo especial mención al papel de los probióticos.

Pero es sin duda el reino vegetal el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables en concreto a las enfermedades humanas, que son producidas por microorganismos (8).

En la actualidad se han descubierto antibióticos que son capaces de matar o inhibir el crecimiento y proliferación de microorganismos, sin embargo, una vez que algún ser humano adquiere el contagio de alguna bacteria o levadura siempre será portador de estas y por tanto la enfermedad puede reincidir en su mayoría con mayor intensidad (4).

Por ello la población está cada vez más interesada en este tipo de terapias alternativas, derivándose de esto la importancia de encontrar inhibidores naturales de microorganismos patógenos (9).

En México como una larga tradición cultural se utiliza el chile en el área gastronómica y en medicina tradicional o alternativa como estimulante, contrairritante y en el tratamiento de malestares digestivos y respiratorios (18).

Como se puede observar son muchos los beneficios que brinda este fruto, es por eso que para este estudio se evaluará un extracto etanólico del chile, *Capsicum* comercial (IFF) como agente antibacterial, el cual contiene un alcaloide llamado capsaicina (8-metil-N-vainillin-6-nonanamida) que se encuentra en la vaina y se concentra en el tejido placentario del chile (30); Este alcaloide es el responsable de provocar el sabor de pungencia en el fruto, la capsaicina ha sido utilizada recientemente en diferentes áreas como farmacia, neurociencia, y drogas antimicrobianas, que han mostrado la inhibición del crecimiento de algunas levaduras y bacterias patógenas(17).

1. Antecedentes

1.1 Historia del fruto del chile

Desde el inicio de la cultura mexicana, el chile ha formado parte importante de muchos alimentos y rituales de México y aunque el chile se ha dado en Centro y Sudamérica, México es considerado uno de los países principales de origen de este fruto.

El nombre viene del náhuatl, *chilli* y se aplica a numerosas variedades y formas de la planta herbácea o subarborescente anual *Capsicum annum*, de la familia de las solanáceas, aunque algunas corresponden a la especie arbustivo perenne *C. frutescens*.

El género *Capsicum* pertenece a la familia *Solanaceae* y está muy relacionada al género *Solanum*.

Son generalmente reconocidas cinco especies domesticadas de *Capsicum*: *C. annum* en Mesoamérica, *C. frutescens* (chile Tabasco), *C. Chinese* (el chile habanero), *C. baccatum* en la zona andina y *C. pubescens* (chile Manzano) (7).

Los frutos *Capsicum* son agrupados de acuerdo al grado de pungencia que tienen como: dulces (no pungentes), moderados o picantes, y por sus formas y tamaños.

Los siguientes chiles se enumeran desde el más picante al menos picante, según la clasificación de "Peppers: Safe Methods to Store, Preserve, and Enjoy" que publicó la universidad de California en 1998. (30)

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 1. Habanero | 19. Sandía |
| 2. Jamaican Hot | 20. Ancho |
| 3. Chiltepini | 21. Chilaca |
| 4. Santaka, Thai | 22. Española |
| 5. Manzano | 23. Pasilla |
| 6. Charleston Hot | 24. Poblano |
| 7. Piquín , | 25. Anaheim |
| 8. Aji | 26. Big Jim |
| 9. Cayenne | 27. Nuevo México |
| 10. Tabasco | 28. Cereza |
| 11. Thai Dragon | 29. Mexi-Bell |
| 12. De árbol | 30. Peperoncini |
| 13. Serrano | 31. Bell |
| 14. Yellow Wax | 32. False Alarm |
| 15. Jalapeño | 33. Pimiento |
| 16. Mirasol | 34. Sweet Banana, |
| 17. Cascabel | 35. Sweet italian |
| 18. Rocotillo | |

1.1.1 Anatomía y características químicas del chile

Se cultiva en tierras templadas y calientes. En general alcanza de 30 a 80 cm. de altura. El tallo es erguido, ramoso y liso. Las hojas son simples, alternas, generalmente aovadas, enteras, lisas, lustrosas, breve o largamente pecioladas, de 5 a 12 cm. de largo. Las flores son hermafroditas, axilares, solitarias, pedunculadas, actinomorfas, gamopétalas rotadas o subrotadas, blancas, verdosas o purpúreas; el cáliz es corto, generalmente pentalobulado; la corola está constituida por cinco pétalos soldados que pueden distinguirse por los cinco lóbulos periféricos; el androceo consta de cinco estambres cortos insertos en la garganta de la corola; el ovario es súpero, bilocular o tetralocular, con los lóculos pluviovulados, y está superpuesto por un estilo simple.

El fruto, también llamado chile, es una planta indehisciente erguida o péndula, incompletamente bilocular o trilocular, de forma y tamaño variable, dulce o picante, rojo o anaranjado cuando maduro y verde, blanco o purpúreo cuando inmaduro; contiene numerosas semillas reniformes pequeñas, las cuales, junto con las placentas (venas) que las unen a la pared del fruto (ver Figura 1), contienen en mayor proporción la oleoresina donde se encuentra una sustancia picante llamada capsaicina (13).

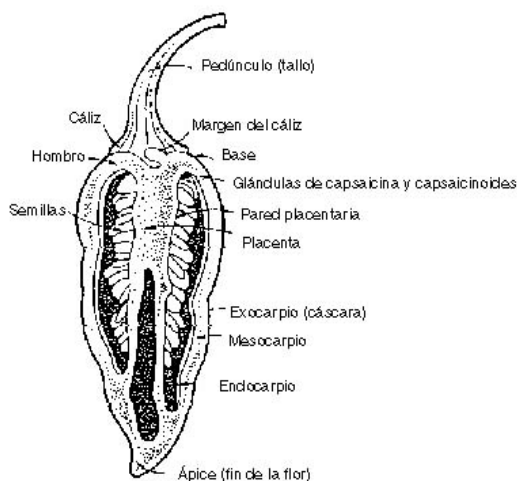


Figura 1. Anatomía característica del chile
www.zarc.com

El sabor característico “picante”, una sensación de dolor quemante, se debe a la cantidad de capsaicinoides que contenga la fruta.

El *Capsicum* comprende un 38% de pericarpio, un 2% de la vaina interior, un 56% de semillas y un 4% de tallos. La propiedad que separa a la familia *Capsicum* de otros grupos vegetales y que es la quinta esencia del pimiento chile, es un alcaloide denominado capsaicina, una sustancia cristalina excepcionalmente potente y acre, que no existe en ninguna otra planta. La capsaicina es la fuente de la acritud y el calor en el pimiento *Capsicum*.

1.1.2 Capsaicinoides

Estos se encuentran en el pericarpio (90%) y en las semillas (10%).

Tienen un grupo vainillin, el enlace ácido amida y la cadena hidrocarbonada con una longitud apropiada, parecen ser indispensables para que se presente la pungencia (5).

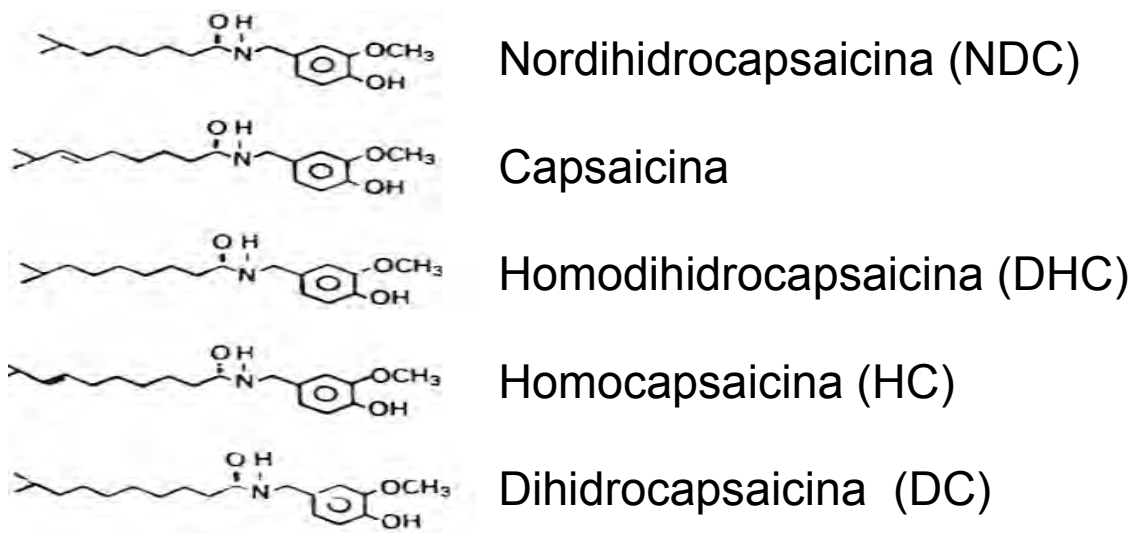


Figura 2. Estructuras químicas de los capsaicinoides
Fuente: Chiang H. Grace, 1986

Cuadro 1. Composición de una mezcla cristalina de capsaicinoides purificados de una muestra de chile de origen japonés.

Capsaicinoide	Composición (%)
Capsaicina	48.6
Dihidrocapsaina	36.0
Nordihidrocapsaicina	7.4
Homodihidrocapsaicina	2.0
Homocapsaicina	2.0
Nonoil vanillilamida	1.0
Decil vanillilamida	1.5

Fuente: Govindarajan 1986

Todos estos capsaicinoides producen un efecto sensorial que se identifica como el sabor picante o pungencia de los chiles.

El sitio biosintético de los capsaicinoides es la placenta del fruto.

El grupo vainillilamida de la capsaicina se deriva de la L-fenilalanina, mientras que la cadena de ácido graso ramificada es derivada de la valina.

Durante la biosíntesis de los capsaicinoides se generan varios intermediarios fenólicos. Algunos experimentos con precursores de la capsaicina sugieren que la biosíntesis de este compuesto en pimientos picantes compite con una acumulación activa de sustancias similares a la lignina en las paredes celulares, que son probablemente derivadas de precursores fenilpropanoides y de la capsaicina en si.

La producción de capsaicinoides aumenta con la madurez del fruto hasta un máximo a partir del cual disminuye en parte por degradación hasta un 60% del contenido máximo.

La capsaicina puede detectarse sensorialmente en diluciones de hasta 1 en 15-17 millones. Es insoluble en agua fría y muy soluble en alcohol, acetona, éter y otros solventes.

1.1.3 Capsaicina

La capsaicina es un compuesto incoloro, cristalino, amargo, presente en el pimiento *Capsicum* (previamente conocido como capsaicina). Tiene un peso molecular de 305.46 g/mol, un punto de fusión de 65°C, un punto de ebullición de 81°C, presión de vapor de 40 N/m² y densidad de vapor de 1.59 kg/m³ (aire = 1). Los límites en contenido de capsaicina en el pericarpio de un pimiento *Capsicum* normal, son de alrededor de 0.17 a 0.58%, y en la vaina interior del 6.6 al 7.7%; El color se concentra mayormente en el pericarpio. Las semillas de chile contienen 19% de aceite con un contenido de capsaicina del 0.024%. El porcentaje de capsaicina en el chile depende de la especie, del origen geográfico y de las condiciones climáticas.

La capsaicina es producida por glándulas que se encuentran en el punto de unión de la placenta y la pared de la vaina. La capsaicina se extiende disparejamente a través del interior de la vaina y se concentra mayormente en el tejido placentario. Las semillas no son fuentes de calor como se cree comúnmente (33).

La fórmula química de la capsaicina es C₁₈H₂₇NO₃ (Figura 3) y el nombre de la molécula establecido por la IUPAC es: N-[(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) metil]-8-metil-nona-6-enamida.

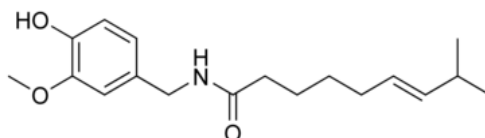


Figura 3. Estructura química de la capsaicina
Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/capsaicina>

Por su estructura es una sustancia que pertenece al grupo de los alcaloides; definidos como bases nitrogenadas producidos por plantas y que tienen un efecto fisiológico sobre los seres humanos.

La capsaicina es una neurotoxina que puede provocar la liberación de transmisores especialmente sustancia P (neurotransmisor del dolor) en neuronas sensoriales, neuronas no adrenérgicas y neuronas no colinérgicas; y si se administra en dosis altas puede producir la destrucción de la neurona.

La capsaicina contiene varios grupos funcionales en su molécula con momento dipolo permanente tales como el grupo éter (1.2 debyes), el grupo hidroxilo (1.7 debyes) y los grupos =N-H (0.8-1.4) debyes y -C=O (2.7 debyes) que conforman al estar unidos, el grupo amida en el cual existe una carga parcial positiva en el átomo de carbono, producto de su unión a un oxígeno y un nitrógeno, ambos átomos más electronegativos y cargados con una carga parcial negativa.

Todos los grupos anteriormente mencionados le confieren a la molécula de capsaicina un cierto carácter polar a pesar de la cadena lateral hidrocarbonada que contiene. Por otro lado, el grupo -OH de la molécula puede fungir como aceptor o donador fuerte de protones, comportándose así como ácido ó como base.

Las amidas con -N-H son donadores medios de protones y pueden actuar también como aceptores, mientras que el grupo éter tiene una ligera capacidad de aceptar protones. Los compuestos fuertemente donadores interactúan con compuestos aceptores de protones (20).

Como ya se mencionó, este alcaloide puede activar un grupo de neuronas sensoriales periféricas que responden al dolor provocado por estímulos químicos, mecánicos o térmicos. Dichas neuronas son llamadas nociceptores pues transmiten información sobre el daño en tejidos en diversas partes del cuerpo hacia la médula espinal y el cerebro. Se cree que estas neuronas nociceptivas liberan en la médula espinal un neurotransmisor de naturaleza peptídica, llamado sustancia p en esta región significa dolor.

En nuestra lengua tenemos terminaciones nerviosas de neuronas nociceptivas que reaccionan a la capsaicina y que transmiten señales hacia la médula espinal en su parte del tallo cerebral. En las membranas de dichas fibras sensoriales se encuentran proteínas que actúan como receptores de la capsaicina, pero que responden no solo a la capsaicina, sino también al calor y a la acidez.

La respuesta del cerebro es la liberación de endorfinas, químicos pertenecientes a la familia de los opiodes endógenos que neutralizan el dolor, probablemente bloqueando la liberación de sustancia p de las neuronas sensoriales primarias. La liberación de estas endorfinas proporciona al cuerpo una sensación de placer lo cual puede hacer que las personas desarrollen tolerancia al dolor y, por llamarlo de alguna manera, un grado de adicción al chile (18).

1.1.3.1 Métodos de cuantificación de capsaicina

Los métodos para determinación de capsaicina son los siguientes:

- Espectrometría
- Cromatografía en papel
- Cromatografía de capa fina
- Cromatografía de gas
- Espectrofotometría de masa
- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (5)
- Grados Scoville

Grados del Picante

En 1912, Wilbur L. Scoville inventó una prueba para determinar el picante relativo de distintos chiles. La capsaicina de un chile de peso determinado fue extraída con alcohol y mezclada en varias concentraciones con agua endulzada. Se les solicitó a probadores humanos que determinaran a que punto neutralizó el agua lo picante. El volumen de agua requerido para cada muestra fue asignado una calificación en unidades Scoville (entre más grande el número, se necesitaba más agua y estaba más picante el chile) (11).

No todos los chiles tienen concentraciones iguales de capsaicina, la prueba más objetiva para cuantificar este compuesto es la cromatografía líquida de alta presión; siendo utilizadas las unidades Scoville. Podemos apreciar que el chile dulce tiene 0-

100 unidades Scoville, mientras que el chile habanero tiene 200,000 a 500,000 unidades Scoville (22).

Para realizar la medición sensorial de la pungencia del chile por unidades Scoville: Se coloca un gramo de puré de chiles y se mezcla con 100 mL de etanol, agitándose por tres horas seguido de una filtración y se lava el residuo con etanol. Como prueba preeliminar se diluye la muestra patrón en solución de sacarosa al 3% en series geométricas mientras que la evaluación final es hecha usando series aritméticas de la dilución de la muestra patrón. La pungencia fue calculada en términos de SHU (Unidades de calor Scoville) de una tabla estándar (1).

Como se ha visto existen variedades que pican menos que otras, esta variación se debe a que el nivel de pungencia de un chile es el resultado de factores ambientales y genéticos que determinan la cantidad (concentración) y el tipo de capsaicinoides que un chile contiene. Esto quiere decir que lo picante de un chile depende de la concentración de capsaicinoides que contenga, pero también del tipo de capsaicinoides ya que unos son más pungentes que otros. Aunque el control genético de la pungencia no está claro, se sabe que los chiles que no pican carecen del gen dominante para la producción de capsaicina (18).

El sabor de pungencia disminuye a causa de la fermentación en algunos alimentos o preparados debido al bajo pH que causa la descomposición de la pungencia de isotiocianatos.

El contenido de capsaicinoides en los chiles no es afectado por la irradiación gama, no afecta los factores de calidad como la pungencia y el color. Lo que si puede provocar la disminución de capsaicinoides es la fermentación, ya que mientras avanza el tiempo se tienen menos capsaicinoides (15).

Actualmente, las técnicas existentes para la extracción de capsaicinoides y colorantes de los ajíes en la industria, requieren del uso de solventes orgánicos que pueden afectar la calidad sanitaria del producto y contribuyen al impacto ambiental (16).

Existen industrias mexicanas de extracción de colorantes para uso alimentario y acuícola que requieren separar los capsaicinoides para disminuir la toxicidad de los colorantes, y aprovecharlos en diversas aplicaciones. Una alternativa a los procesos actuales es el empleo de agentes biológicos como son las enzimas para facilitar el proceso de extracción.

1.1.3.2 Aplicaciones de la Capsaicina

Estos compuestos se aplican tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica, ya que además de sus propiedades organolépticas son bloqueadores de la transmisión del dolor (desensibilizan) y promueven el metabolismo energético. Por otro lado se han evaluado, con resultados positivos, las propiedades anti-inflamatorias de una nueva clase de productos derivados de la capsaicina.

Se sugiere que la capsaicina pudiera ser útil en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (23).

El consumo de chile aumenta el riesgo de desarrollar cáncer estomacal, pero disminuye el riesgo de desarrollar cáncer intestinal y protege a los animales de laboratorio contra los efectos dañinos de nitrosamina y el benzopireno carcinógenos presentes en el tabaco y en el humo del cigarro.

Una de las aplicaciones modernas es el medicamento para la artritis reumatoide y cáncer de boca, sin embargo presentan reacciones secundarias de ardor en la piel. Sería de gran potencial tanto para estas industrias, contar con un compuesto que provocara las reacciones de calor e insensibilidad pero con un efecto picante menor. Si bien este tipo de compuestos se encuentran naturalmente en ciertas variedades de pimientos dulces, su abundancia es limitada y podrían sintetizarse enzimáticamente en un paso a partir de la capsaicina (28).

Es efectiva fitoterapéutica y es ampliamente usado de manera convencional de manera interna para la pobre digestión, vómito crónico, y parálisis lingual y externamente masajes de neuralgia, radiculitis, etc. (25).

Sirve como tratamiento de enfermedades neurodegenerativas Hiperkinesia (movimientos incontrolados) para simular la enfermedad de Huntington que es hereditaria y causa demencia, pero la capsaicina disminuye marcadamente estos movimientos aunque no hay cura.

La capsaicina ha mostrado efectos protectores contra el daño inducido por la aspirina en las mucosas gástricas, también ha inhibido el crecimiento de células de leucemia humana cultivadas en el laboratorio, dicho alcaloide llevó a estas células a sufrir apoptosis un proceso que permite al organismo eliminar las células que no funcionan correctamente.

Además estudios científicos muestran que la capsaicina tiene propiedades antioxidantes en pequeñas cantidades y citotóxicas en mayor cantidad produciendo apoptosis celular, ocasiona en pequeñas cantidades un descenso de la producción gástrica de ácido y en cantidades mayores provoca una hiperacidez ocasionando lesiones a la mucosa, puede servir como analgésico contra sustancias que ocasionen dolor abdominal, interfiere con la respuesta de saciedad mediada por la leptina, disminuye la producción de flujo biliar y proteínas biliares, aumenta los niveles de insulina y en la mucosa intestinal reduce la resistencia eléctrica transepitelial y aumenta la permeabilidad a iones y macromoléculas⁽²²⁾.

La capsaicina tiene un efecto psicofisiológico dando la sensación de dolor quemante y disminuyendo la actividad mioeléctrica del estómago.

Cuando se consume chile, el organismo reacciona incrementando la circulación sanguínea. El chile también actúa como estimulante en el tratamiento de problemas de presión arterial y estimula también la transpiración.

La capsaicina tiene también propiedades anticoagulantes, previniendo de trastornos causados por coágulos en la sangre, e incluso del endurecimiento de las arterias y ataques cardíacos. El gran aporte de vitaminas A y C que proporcionan los chiles

ayuda a prevenir problemas de las mucosas, encías, y dientes y; por supuesto de la vista.

La vitamina C es un antioxidante capaz de neutralizar el daño causado por radicales libres.

También ha sido usado para disminuir y aliviar los dolores causados por las hemorroides (18).

1.1.3.3 Productos que contienen capsaicina en su formulación

Cuadro 2. Productos con capsaicina. (Nombre, presentación y uso)

Nombre del producto	Presentación	Uso
Inquibol	Pomada	Dolor inflamatorio
Salonpaso	Pomada	Alivia rigidez del cuello y hombros.
Salonpaso Large	Pomada	Alivia molestias en la espalda
Salonpaso Hot	Pomada	Dolores lumbares
Salonpaso Aqua Patch	Parche	Torceduras y golpes. Estrés
Salonpaso Gel Patch	Parche	Lesiones por hacer ejercicio o lesiones.
Salonpaso Gel	Gel	Dolor de articulaciones
Air Salonpas	Spray	Dolor de pantorrilla y rodillas
Picasum	Crema	Dolor articular y muscular
Cayena	Granos de cayena	Mejorar circulación, Alivia dolor como de artritis, dolores de espalda y herpes.
No pain	Roll on	Alivio de artritis, reumatismo, dolores de huesos. Neuropatía diabética y Neuralgia Postherpética.
Green Marvel	Pomada	Golpes, torceduras, calambres y golpes leves.

Fuente: 29, 34, 35, 36, 37, 38

1.1.3.4 Efectos de la capsaicina en los Alimentos

Los chiles añaden sabor, aroma, picor, textura y color.

Algunos científicos han dicho que los chiles tienen antioxidantes naturales, que son usados para mantener la calidad en el sabor de los alimentos.

En alimentación, los extractos de *Capsicum* son utilizados en su forma de oleoresina en la preparación de salsas tipo tabasco y en alimentos fuertemente especiados. Se usa además como saborizante en bebidas no alcohólicas y en otros tipos de confitería (16).

Cuando se tienen ciertos alimentos con cantidades de grasa importantes, la capsaicina actúa muy probablemente como portador de la especia permitiéndole que interactúe con los receptores del picor en la lengua y por tanto es percibido como más picante que en los alimentos que pudieran contener menor grasa.

Aunque esto se puede contradecir pues en ciertas salsas de queso se ha determinado que con altos niveles de grasa, la intensidad del picor de la capsaicina disminuye ya que dicen esta actúa como capa protectora para la lengua (10).

En otros estudios se ha encontrado que debido a que la capsaicina es lipofílica, la reducción de grasa en un alimento puede alterar la percepción de la pungencia del componente en la cavidad bucal, por esto la capsaicina es soluble en grasa o bien se dice que tiene una gran afinidad a los lípidos (14).

1.1.3.5 Capsaicina como antimicrobiano

Como una de las aplicaciones más importantes se encuentra el uso de tejidos, extractos y oleoresinas del chile (que pueden contener los capsaicinoides presentes en el fruto); o bien a la capsaicina pura como antimicrobiano.

Existen tratamientos con chile como ingrediente principal, que se emplean en el control o la eliminación de infestaciones parasitarias.

Análisis químicos han demostrado que los frutos de *Capsicum* contienen relativamente altas concentraciones de grandes cantidades de nutrientes esenciales, incluyendo vitamina C (de 4 a 6 veces más que una naranja), y pro-vitaminas A, P, E, B1, B2 Y B3.

Pero los tejidos de *Capsicum* han jugado un importante rol en la farmacopea botánica de la gente Maya. Los tejidos de *Capsicum* han sido usados para tratar una variedad de enfermedades, muchas de las cuales pueden ser causadas o complicadas por infecciones microbianas.

Se han hecho diversos estudios de tejidos de *Capsicum*, éstos enfocados a los posibles efectos antimicrobianos (Cardoso y Santos, 1948; Gotshall et al; 1949; Harris, 1949; Bushnell et al; 1950; MacDonald and Bishop, 1953; Fitzpatrick, 1954; Frisby et al; 1954; Masilungan et al; 1955; Maislungan et al; 1963; Al Delaimy y Ali, 1970; Abdou et al; 1972; Mitscher et al; 1972; Chen et al ; 1985; Caceres et al; 1991).

Una variedad de métodos de ensayo (disco filtro, penicilindros, sembrado en superficie), procedimientos de extracción (etanol, acetona, acuosa), y diferentes tipos de tejidos (predominando variedades comerciales comunes), los cuales fallan al proporcionar evidencia congruente de considerando la eficacia de los tejidos de *Capsicum* y sus propiedades quimioterapéuticas (6).

Con lo anterior y de acuerdo con Molina-Torres, et al; (1999), se ha encontrado que altas concentraciones de capsaicina retardan el crecimiento de *E. coli*, *P. solanacearum*, mientras que el crecimiento de *B. subtilis* fue fuertemente inhibido y la levadura *S. cerevisiae* fue realzado.

1.2 Importancia de la inocuidad alimentaria

Al hablar de inocuidad alimentaria, se debe asegurar que los alimentos puedan ser consumidos sin temor a que cause daño a la salud de los seres humanos. Es por ello que el estudio a las bacterias patógenas y alterantes de alimentos se ha incrementado con el paso de los años.

Dentro de las bacterias patógenas que afectan alimentos se encuentran: la *Salmonella*, la cual puede estar en alimentos tales como leche y sus derivados, mariscos, huevos, alimentos desecados o congelados, carnes de ave y agua principalmente; esta bacteria puede provocar enfermedades febriles, fiebre tifoidea, paratifoidea, enterocolitis, y bacteremia, aunque no altera alimentos, puede provocar la muerte (12).

Otra bacteria patógena importante es la *Listeria monocytogenes*, la cual se puede aislar en leche de vaca y cabra y sus derivados, en algunas hortalizas, en todo tipo de alimentos congelados o que se consuman en frío y en cárnicos; las enfermedades que puede provocar son: meningitis, septicemia, listeriosis neonatal y meningoencefalitis, es peligrosa para embarazadas, diabéticos o inmunodeprimidos (31).

También se habla de patógena al mencionar a la *Escherichia coli* como una del grupo de enteropatógenas que existen, que al proliferarse puede provocar: diarrea hemorrágica, vómitos, dolor abdominal intenso y enterocolitis; Ésta se aísla en alimentos como salmón, queso, sucedáneos del café, carne de cerdo etc.

El *Bacillus cereus* es la única bacteria gram positivas con mecanismo patógeno que se basa en los efectos de enterotoxinas segregadas en la luz intestinal, este bacilo puede provocar también toxinas en los propios alimentos tales como el arroz, productos ricos en almidón, leche y pueden coagular leche azucarada (21).

En cuanto a las no patógenas se encuentra la *Pseudomonas*, que principalmente la encontramos en vegetales crudos, leche sin pasteurizar, en el agua y en la tierra, puede provocar ablandamiento de frutos y hortalizas por pectinasas, además de que

altera alimentos con alto contenido de proteínas; esta bacteria es patógena al hombre únicamente cuando ataca heridas⁽³²⁾.

El *Staphylococcus aureus* puede provocar fuertes intoxicaciones, provocando: diarreas, náuseas, vómito, calambres abdominales, postración, dolor de cabeza, dolor muscular, cambios pasajeros en la presión arterial y en el pulso, esto debido a que, algunas de las cepas son capaces de producir una toxina proteica muy estable al calor ⁽²³⁾.

Podemos encontrarlo en productos de pastelería rellenos con crema, productos avícolas, productos cárnicos, atún, papas, productos lácteos, además de alimentos que requieran una manipulación durante su preparación y son mantenidos a temperaturas ligeramente elevadas después de la misma.

Los estafilococos existen en el aire, polvo, alfombras, el agua y equipos para procesamiento de alimentos, los humanos, y los animales ⁽⁴⁾.

En cuanto a levaduras se refiere, son organismos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; se les aísla de diversos sustratos como vegetales, alimentos, suelo, agua, aire y los principales portadores son los seres humanos, como los alimentos son en su mayoría manipulados por el hombre se debe poner atención en éstos ⁽³⁾.

La levadura del género *Candida*, es uno de los que causa infecciones con más frecuencia y en concreto, la especie *albicans* es la más patógena y aún cuando al principio no lo es, ya que la flora bacteriana beneficiosa y el sistema inmunitario limitan su crecimiento y frenan su excesiva proliferación, manteniendo así su equilibrio, ahora bien si el equilibrio se rompe *Candida albicans* comienza a proliferar y puede dar lugar a un conjunto de enfermedades denominadas candidiasis o micosis candidiásica, que pueden consistir en leves infecciones de mucosas y piel o desencadenar diseminaciones sistémicas graves, pudiendo afectar órganos vitales ⁽²⁴⁾.

A continuación se presenta un cuadro resumen (Cuadro 3) con las características principales de las bacterias y levadura mencionadas con anterioridad, donde de

manera práctica se observan características como: la temperatura óptima a la que crece, pH, fuentes de infección y enfermedades que provoca.

Cuadro 3. Características generales de las bacterias y levaduras.

Bacteria/ Levadura	Gram	Enfermedades que provoca	T°C	pH	Fuentes de infección
<i>Salmonella</i>	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bacteremia ▪ Enterocolitis ▪ Enfermedades febriles ▪ Fiebre tifoidea ▪ Paratifoidea 	37	4-5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua ▪ Leche y derivados ▪ Mariscos ▪ Huevos ▪ Desecados o congelados ▪ Carnes de ave
<i>Pseudomonas</i>	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Es patógena al hombre cuando ataca heridas 	Hasta 43	7-7.4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua y tierra ▪ Alimentos con alto contenido de proteínas
<i>Escherichia coli</i>	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diarrea Hemorrágica ▪ Dolor abdominal interno 	37	7-7.5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sucedáneos del café ▪ Salmón ▪ Queso
<i>Bacillus cereus</i>	+	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gastroenteritis ▪ Toxinas en sangre ▪ Provoca diarreas 	30-49	4.9-9.3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arroz ▪ Leche desnatada
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Meningitis ▪ Septicemia 	4	7-7.4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leche, tierra, hortalizas
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Toxinas en sangre, provoca diarreas ▪ Heridas supuradas ▪ Lesiones de piel 	7-48	4.8-8.0	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Productos de pastelería ▪ Carne de ave ▪ Alimentos cocidos ▪ Huevos ▪ Productos curados
<i>Candida albicans</i>	+	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Toxinas en sangre, provoca diarreas ▪ Heridas Supuradas ▪ Lesiones de piel 	37	3.5-4.5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vegetales ▪ agua ▪ suelo ▪ aire

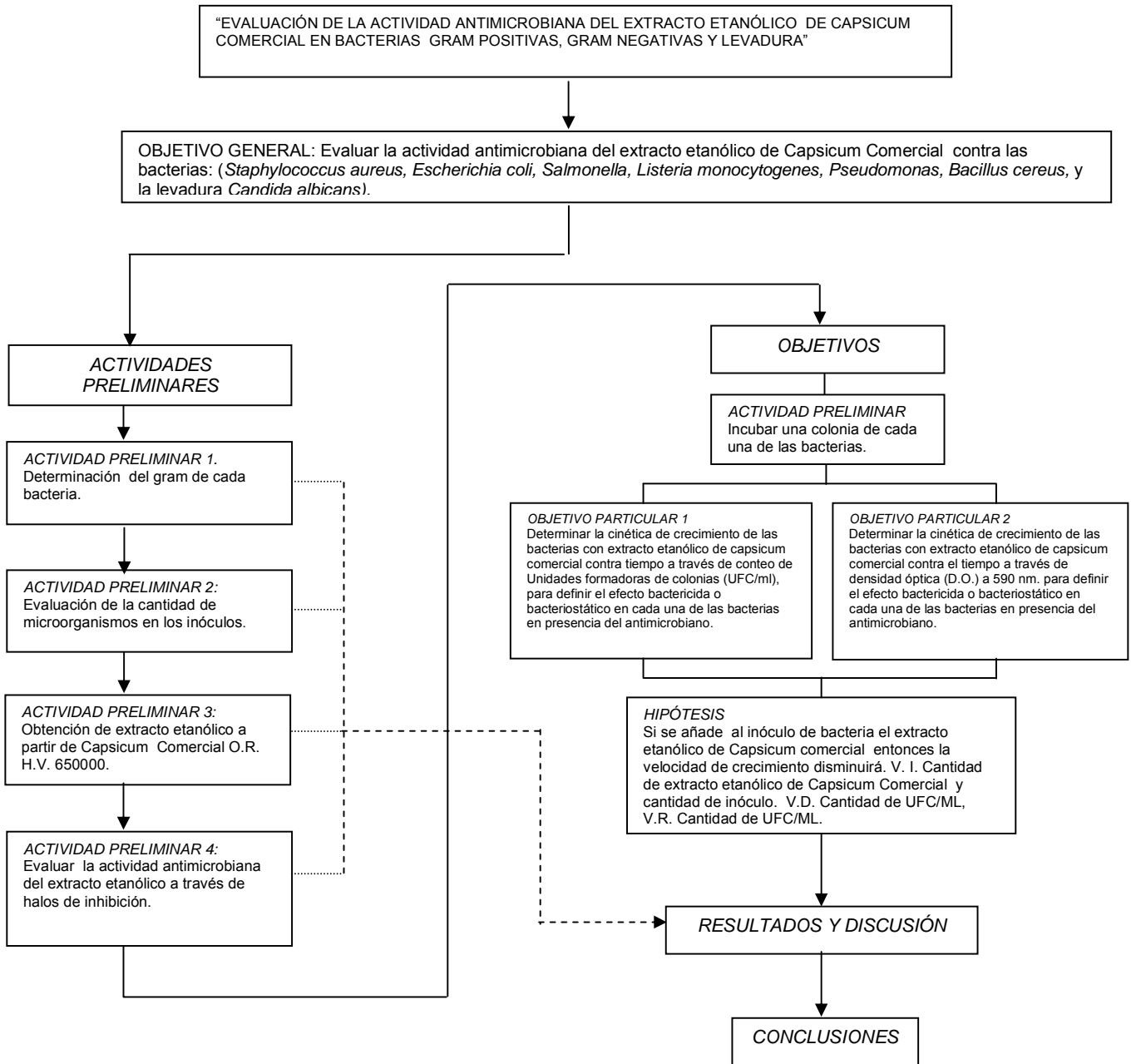
2. Objetivos

Objetivo General.-Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Capsicum* comercial contra las bacterias: *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, y la levadura *Candida albicans*.

Objetivo Particular 1.- Determinar la cinética de crecimiento de las bacterias con extracto etanólico de *Capsicum* comercial a través del tiempo por conteo de Unidades formadoras de colonias (UFC/ml.) para definir el efecto bactericida o bacteriostático en cada una de las bacterias en presencia del antimicrobiano.

Objetivo Particular 2.-Determinar la cinética de crecimiento de las bacterias con extracto etanólico de *Capsicum* comercial a través del tiempo por densidad óptica (D.O.) a 590 nm. para definir el efecto bactericida o bacteriostático en cada una de las bacterias en presencia del antimicrobiano.

3. Cuadro Metodológico



3.1 Descripción de actividades preliminares

3.1.1.1 Actividad preliminar 1

Determinación del gram de cada una de las bacterias.

Las bacterias con que se trabajó en esta experimentación y que no son de colección, como se especifica, fueron obtenidas por aislamiento en Alimentos en el Laboratorio de Bacteriología y Biotecnología de Alimentos de la FES Cuautitlan.

Para la determinación del gram de las bacterias, en un portaobjetos se colocó 1 gota de agua destilada en uno de los extremos del mismo, se tomó 1 colonia de los cultivos en caja petri y se suspendió sobre la gota del agua destilada hasta homogenizar la muestra.

Se dejó secar a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregaron los siguientes reactivos en este orden:

1. Cristal Violeta, dos gotas y se dejó 30 segundos y se enjuagó.
2. Lugol, dos gotas y se dejó 30 segundos sin enjuagar.
3. Alcohol acetona, dos gotas de 3 a 5 segundos como máximo y se enjuagó.
4. Safranina, dos gotas 30 segundos y se enjuagó.

Se dejó secar y se observó en el microscopio (Olympus Optical CO.LTD, Japón) con objetivo 100x.

3.2.1.2 Actividad preliminar 2

Evaluación de la cantidad de microorganismos en cada uno de los inóculos de las bacterias: *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 8739, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 25922, y la levadura *Candida albicans*.

De cada una de las bacterias crecidas en caja con agar Müller Hinton se tomó una colonia y fue colocada en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de caldo de Infusión de Cerebro y Corazón (BHI) a un pH de 7.4, incubadas durante 24 horas (Dry type Bacteriological Incubator, Model 100A, Illinois) a 37°C.

Posteriormente se tomó 1 ml. del inóculo con una micropipeta (Labnet Biopette) y se efectuaron diluciones decimales (hasta 10^{-8}) con solución salina fisiológica (SSF) al 85 %. De cada dilución se tomaron 100 µl. y se sembraron en superficie en cajas de agar Müller Hinton. Se incubaron a 37°C por 18-24 horas y se contaron las Unidades Formadoras de Colonia / ml.

Para el inóculo de *Listeria monocytogenes* se utilizó agar BHI para la siembra en superficie, debido a que el crecimiento de esta bacteria es muy pobre en agar Müller Hinton.

3.1.1.3 Actividad preliminar 3

Obtención del extracto etanólico a partir de *Capsicum* comercial 650,000 unidades Scoville Institute of Flavors and Fragrances (IFF).

A partir del concentrado líquido de *Capsicum* comercial (que se emplea como ingrediente en la formulación de botanas picantes, como sazónador y colorante, con una presentación oleosa) se tomaron 30 ml. de éste y se mezcló con 270 ml. de alcohol etílico (Química Meyer 99.93%) con el fin de extraer de la fase oleosa la capsaicina presente en ese extracto.

Una vez mezclados se colocó en tubos cónicos de centrifuga (IEC Clinical Centrifuge, USA), y la centrifugación se realizó a 2000 rpm. en intervalos de 30 minutos hasta realizarse por 2.5 horas (Tiempo en que no se separaba más líquido de la fase oleosa).

3.1.1.4 Actividad preliminar 4

Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Capsicum* comercial a través de halos de inhibición.

Se repitió el mismo procedimiento que en la Actividad preliminar 3.2.1.2 y posteriormente se colocaron círculos de papel filtro con un diámetro de 0.5 mm. sobre la caja como se muestra en la Figura 4.

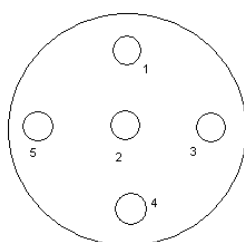


Figura 4. Colocación en caja petri de cada una de las concentraciones, para prueba con halos de inhibición.

Sobre cada uno de los círculos de papel filtro se colocaron los siguientes reactivos y con las concentraciones descritas en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Relación de concentraciones de cada muestra, colocados sobre papel filtro en caja petri.

# En superficie de caja	ml. dimetilsulfóxido (DMSO)	ml. extracto etanólico <i>Capsicum</i>	Etanol
1	1	0.5	-----
2	0.5	1	-----
3	0.25	1.25	-----
4	-----	-----	1.5
5	1.5	-----	-----

Control # 4 negativo de Etanol

Control de solvente DMSO # 5

Se hicieron mezclas de la cantidad en ml. de dimetilsulfóxido (DMSO) y los ml de extracto etanólico de *Capsicum*, de acuerdo a la relación de cantidad de ml. mostrados en el Cuadro 4, se colocaron como controles negativos los solventes utilizados para la experimentación (DMSO y etanol).

Posteriormente de las mezclas de concentraciones (1-3) y de controles (4 y 5) que se obtuvieron de 1.5 ml. se tomaron 100 µl de cada una (1-5) para colocarlas sobre cada uno de los papeles filtro, como se muestra en la Figura 4.

En seguida se incubaron a 37°C de 18 a 24 horas, una vez concluido el tiempo de incubación se hizo la medición de los diámetros de los halos de inhibición con un vernier y se realizó un análisis de varianza con el programa estadístico (SPSS Versión 12.0).

3.2 Objetivo 1. Actividad Preliminar. Incubar una colonia de cada una de las bacterias.

Para cada uno de los inóculos se tomó una colonia y fue colocada en tubos de ensayo conteniendo 5 ml. de BHI a un pH de 7.4, y se incubó durante 24 horas a 37°C.

3.3 Objetivo particular 1

Una vez incubada la bacteria, se tomaron 2 ml. del crecimiento bacteriano del tubo de ensayo y se vaciaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. conteniendo 100 ml. de caldo BHI a un pH de 7.4 y 1.5 ml. de extracto etanólico de *Capsicum* comercial.

Se incubó a 37°C y 150 rpm. en una incubadora orbital (Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, model M52, USA). Se tomó la primer muestra que se le denominó tiempo 0, a la cual se le hicieron diluciones decimales en tubos de ensayo con 9 ml. de SSF al 85%.

Cada dilución se sembró en superficie en cajas de agar Müller Hinton, por triplicado. Se incubaron a 37°C por 18-24 horas y se contaron las Unidades Formadoras de Colonias / ml.

La toma de muestra se realizó cada hora, hasta obtener 5 valores en la gráfica. Los resultados representan el promedio del triplicado y serán expresados en porcentaje

de UFC/ml. Se usó como control un matraz preparado de la misma forma sin extracto etanólico de *Capsicum* para observar el crecimiento de las bacterias sin el agente antimicrobiano a probar.

3.4 Objetivo 2. Actividad Preliminar. Incubar una colonia de cada una de las bacterias.

Para cada uno de los inóculos se tomó una colonia y fue colocada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. conteniendo 50 ml. de caldo BHI a un pH de 7.4, durante 18-24 horas y se incubó a 37°C.

3.5 Objetivo particular 2

Pasadas las 24 horas, después de la incubación se tomaron 5 ml. del matraz y se adicionaron a un matraz Erlenmeyer de 500 ml. conteniendo 100 ml. de caldo BHI a pH de 7.4 y se agregó 1.5 ml. de extracto etanólico de *Capsicum* comercial y se incubaron en una incubadora orbital a 37°C y 150 rpm. Se tomaron muestras cada hora y se llevó a cabo la lectura de densidad óptica a 590 nm. en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb, USA).

Esto se hizo por triplicado para posteriores análisis estadísticos.

Como control se usó un matraz Erlenmeyer de 500 ml. preparado de la misma manera sin adicionarle el extracto etanólico, de igual manera por triplicado.

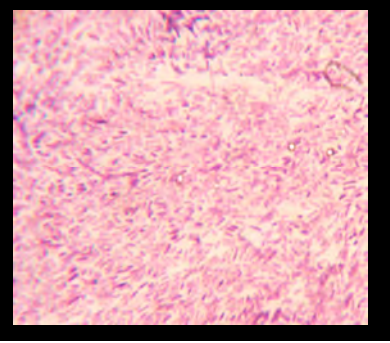
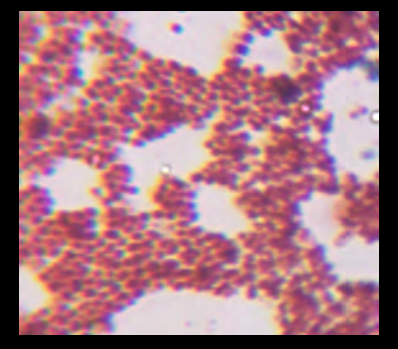
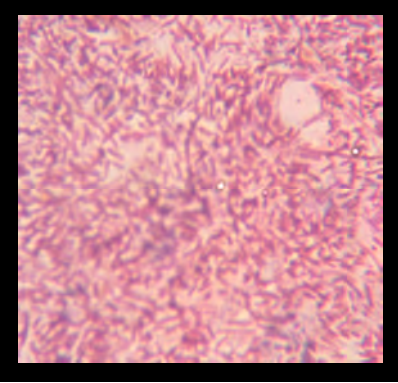
Los resultados se graficaron, se obtuvo el valor de la pendiente al inicio de la fase logarítmica hasta llegar a la fase estacionaria, se realizó la comparación del control y del matraz que contenía el *Capsicum* para obtener los porcentajes de disminución de crecimiento, por último se realizó el tratamiento estadístico de análisis de varianza (con el programa SPSS Versión 12.0) de las velocidades de crecimiento.

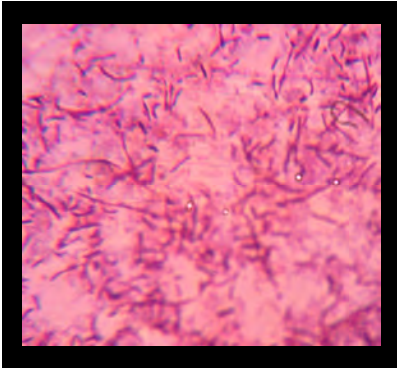
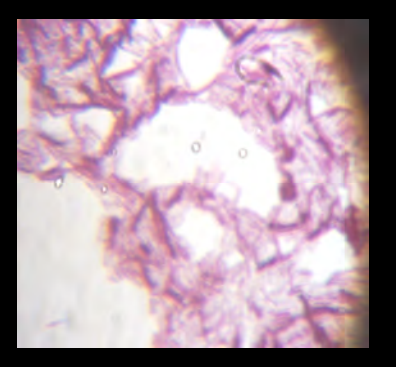
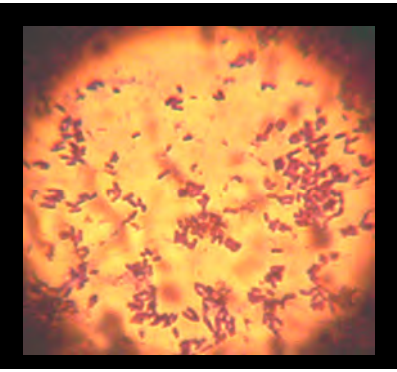
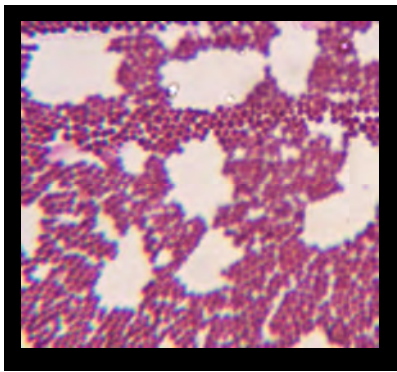
4. Resultados y discusión

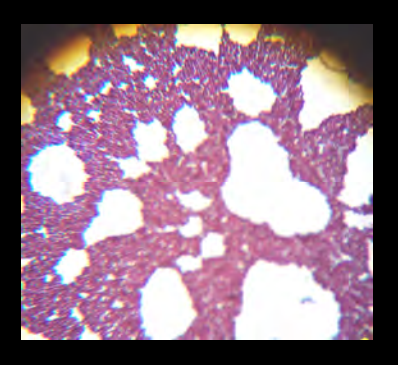
4.1 Actividad preliminar 1

Los resultados de la tinción gram se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 5. Imágenes microscópicas (objetivo 100x) de tinción gram de las bacterias *Staphylococcus aureus* 25922, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 8739, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Bacillus cereus*, y la levadura *Candida albicans*.

Bacteria /Levadura	Gram	Imagen
<i>Salmonella</i>	-	
<i>Pseudomonas</i>	-	
<i>Escherichia coli</i>	-	

<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	
<i>Bacillus cereus</i>	+	
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	+	

<i>Candida albicans</i>	+	
--------------------------------	----------	--

4.2 Actividad preliminar 2

De acuerdo a la metodología planteada, se determinó la cantidad de microorganismos presentes en cada inóculo a través de la medición de unidades formadoras de colonia/mililitro, lo cual se observa en el cuadro 6.

Cuadro 6. Cantidad de microorganismos presentes en cada inóculo de cada bacteria.

Bacteria	Gram	UFC/ml.
<i>Salmonella</i>	-	2.17×10^8
<i>Pseudomonas</i>	-	1.51×10^8
<i>Escherichia coli</i>	-	2.63×10^8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	6.10×10^8
<i>Bacillus cereus</i>	+	7.20×10^6
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	2.32×10^8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	+	3.89×10^7
<i>Candida albicans</i>	+	5.40×10^6

4.3 Actividad preliminar 3

El concentrado comercial del cual se partió en la experimentación se utiliza en la industria como saborizante y sazonador de botanas mismo que se encuentra en fase oleosa, la concentración que se reporta es de 650000 unidades Scoville. Sin embargo por la presentación oleosa se deduce que es la oleorresina y que además de capsaicina puede contener otros capsaicinoides. Esta oleorresina fue probada sin realizar el extracto etanólico para ver el efecto antibacterial contra las bacterias de la cual no se encontró dicha actividad.

Debido a esto se procedió a extraer con etanol puro la capsaicina (de acuerdo a Barbero (2006) donde dice que la capsaicina es soluble en metanol, etanol, acetona, acetyl acetato, y agua) (2).

Se hicieron 5 extracciones con etanol y la parte soluble se conservaba después de la centrifugación, descartando el precipitado. De esta manera se obtuvieron 100 ml. de extracto etanólico de capsaicina, la cual fue probada para actividad antimicrobiana.

4.4 Actividad preliminar 4

De acuerdo con las concentraciones utilizadas para la actividad se muestran los resultados como sigue:

Cuadro 7. Diámetros de halos de inhibición de las bacterias gram positivas y negativas a diferentes concentraciones de extracto etanólico de *Capsicum*

Bacteria/Levadura	Repeticiones	Concentración de extracto etanólico de <i>Capsicum</i> / solvente DMSO		
		1	2	3
		0.25/1.25 ml.	0.50/1.00 ml	1.25/ 0.25 ml.
		Tamaño de halos de inhibición (mm.)		
<i>Salmonella</i>	1	0.6	0.6	0.7
	2	0.6	0.7	0.7
	3	0.6	0.6	0.7
<i>Pseudomonas</i>	1	0.8	0.6	0.8
	2	0.7	0.9	0.7
	3	0.9	0.7	0.7
<i>Escherichia coli</i>	1	0.8	0.6	0.7
	2	0.6	0.6	0.9
	3	0.6	0.6	0.8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1	0.6	0.6	0.8
	2	0.7	0.7	0.7
	3	0.6	0.6	0.7
<i>Bacillus cereus</i>	1	0.8	0.8	0.7
	2	0.8	0.9	1.1
	3	0.9	0.8	0.6
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0.6	0.9	0.8
	2	0.6	0.7	0.8
	3	0.6	0.7	0.8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	1	0.8	0.9	1
	2	0.9	1.1	1
	3	0.8	1.1	1
<i>Candida albicans</i>	1	0.7	0.7	0.6
	2	0.7	0.8	0.8
	3	0.6	0.6	0.8

Para observar si el efecto antimicrobiano se ve influenciado por la concentración, los datos obtenidos en cuanto al tamaño de los halos de inhibición fueron tratados estadísticamente y se observó que las varianzas no son homogéneas. También se realizó la prueba de Tukey donde se puede decir que no hay diferencia significativa de

la concentración 1 y 2, sin embargo entre la concentración 1 y 3 si se presenta la diferencia significativa. Lo cual quiere decir, que las concentraciones utilizadas no muestran esta diferencia debido a que el intervalo de concentraciones es muy pequeño.

4.5 Objetivo particular 1

Como se planteó en la metodología se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias/ ml, una vez obtenidos los valores, se determinaron los porcentajes de disminución del crecimiento, además, se presentan los resultados logarítmicos y un cuadro resumen comparando la actividad bacteriostática y bactericida de cada una de las bacterias y la levadura estudiadas.

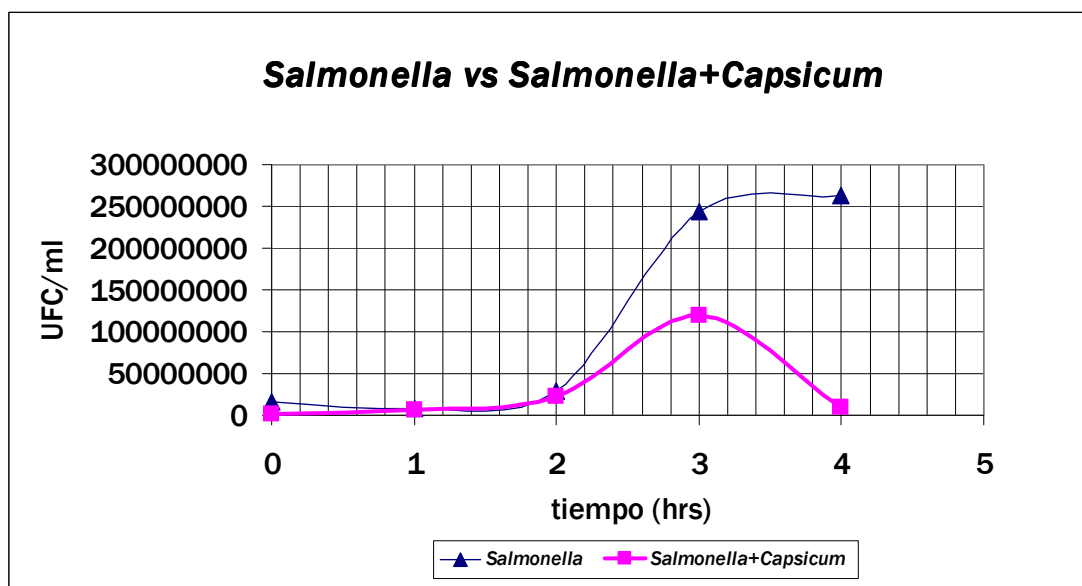


Figura 5. Cinética de crecimiento de *Salmonella* vs *Salmonella* +*Capsicum* (UFC/ml.).

En la cinética de crecimiento para la *Salmonella* (Figura 5) con el *Capsicum* al 1.5% se puede observar que ésta se ve afectada por la presencia del extracto etanólico del *Capsicum* (antimicrobiano). En las dos primeras horas el crecimiento fue muy semejante el control y el que contenía *Capsicum*, sin embargo a partir de la tercer hora la cinética del control continuó creciendo hasta tener 244 000 000 UFC/ml., y en

el que contenía *Capsicum* habían 119 000 000 de UFC/ml. y el mismo, en la hora 4 disminuyó hasta llegar a 10 000 000. De acuerdo con esto disminuyó su crecimiento un 96.2%, y expresado en forma logarítmica se tiene que a la cuarta hora el control tiene 2.4×10^8 , mientras que el que contiene el *Capsicum* es del orden de 1×10^7 es decir un ciclo logarítmico menor.

Contrario a Dorantes (2000) donde la *Salmonella* fue la bacteria más resistente, se usaron extractos isopropanólicos de diferentes especies de chiles (habanero, serrano y pimiento morrón) los capsaicinoides fueron separados por HPLC (ácido orto cumárico, meta cumárico, ácido trans cinámico, capsaicina y dihidrocapsaicina), y probados éstos en círculos de papel filtro, observando halos de inhibición en agar antibiótico, en ese estudio encontraron que el pimiento morrón que contienen ácidos meta cumárico y cinámico pero no capsaicina mostraron una buena acción inhibitoria de las bacterias probadas entre ellas la *Salmonella*.

Esto implica que los diferentes solventes usados para la extracción de los principios activos influyen en el tipo y concentración de estos. Así como el tipo de chiles empleados en la extracción.

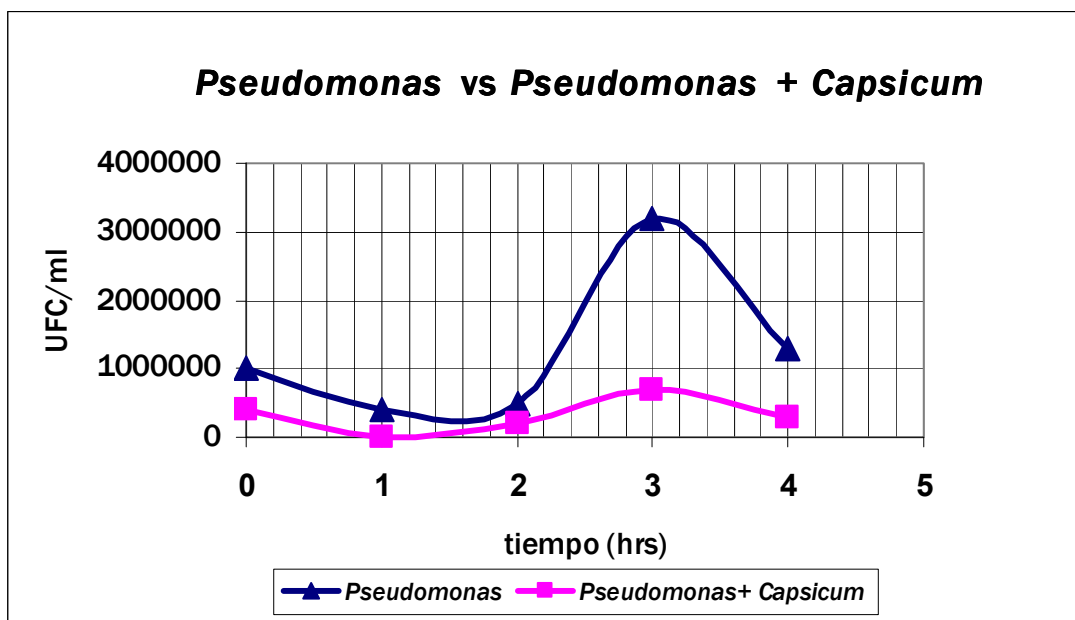


Figura 6. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas* vs *Pseudomonas + Capsicum* (UFC/ml.).

En la Figura 6 la cinética de crecimiento para la *Pseudomonas* con el *Capsicum* al 1.5% se observó que, ésta se ve afectada por la presencia del extracto etanólico del *Capsicum* (antimicrobiano), mostrándose más evidente en la hora tres, debido a que disminuyó el crecimiento de la bacteria en un 97.8%, de 3 200 000 UFC/ml. en el control a 700 000 en el medio con *Capsicum*.

Estos datos expresados en forma logarítmica son: 3.2×10^6 y se reduce a 7.0×10^5 , lo que quiere decir que hay una disminución de aproximadamente 1 ciclo logarítmico.

Contrario a lo expresado en otros estudios Molina et al. (1999) a concentraciones por arriba de 0.2 mg./ml. de capsaicina de Sigma la cual fue diluida en etanol y concentrada, evaporándole el solvente, únicamente se retarda el crecimiento de la bacteria, además que las mediciones de crecimiento fueron hechas a través de la absorbancia a 590 nm (28).

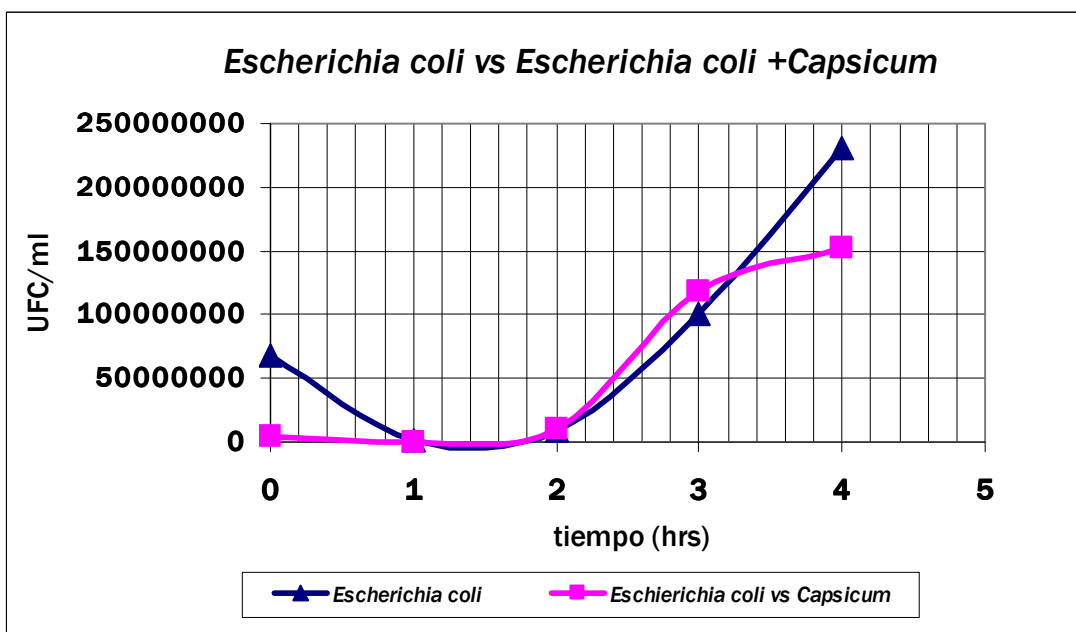


Figura 7. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* vs *Escherichia coli* + *Capsicum* (UFC/ml.).

En cuanto a la *Escherichia coli* presentó un comportamiento diferente con respecto a las demás ya que de acuerdo a los valores que se mostraron en la hora 4 para el control se tenían 231 000 000 UFC/ml., pero en el que contenía el extracto etanólico de *Capsicum* se tenía una proliferación de 152 000 000. Lo cual significa que únicamente disminuyó su crecimiento hasta esta hora un 35%. Expresado en forma logarítmica el control tiene 2.31×10^8 y el medio con *Capsicum* 1.52×10^8 lo que significa que no hubo disminución de ciclos logarítmicos, por lo que como Molina et. al.(1999), lo expresa, la capsaicina de Sigma la cual fue diluida en etanol y concentrada, evaporándole el solvente únicamente retarda el crecimiento de la bacteria, pero en algún momento la bacteria comienza a crecer en presencia del antimicrobiano, por lo que se considera que tuvo un efecto bacteriostático.

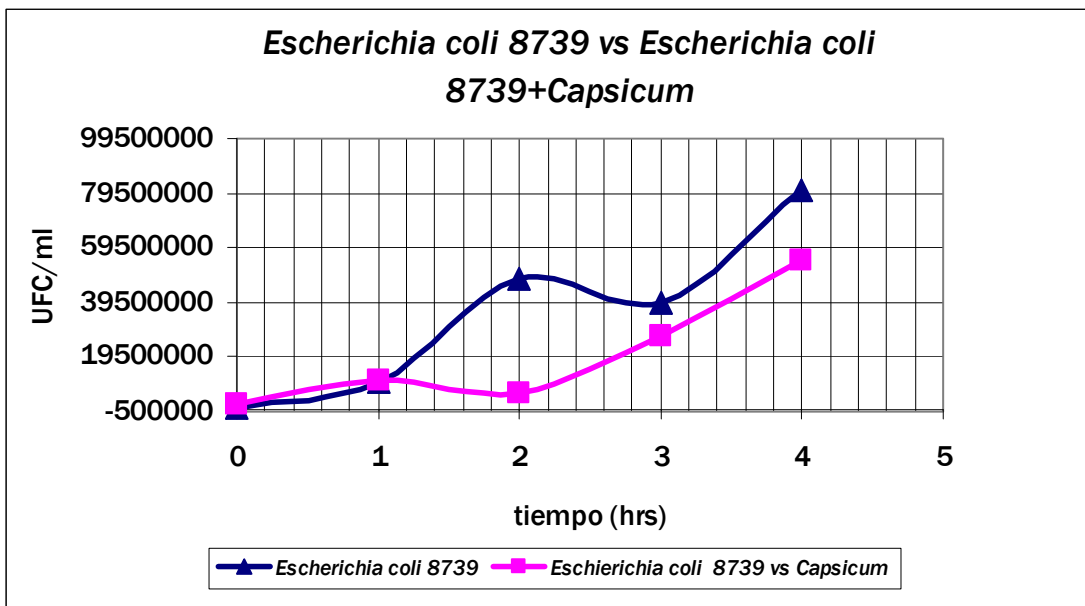


Figura 8. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* 8739 vs *Escherichia coli* 8739 + *Capsicum* (UFC/ml.).

En cuanto a la *Escherichia coli* 8739 el crecimiento se redujo únicamente un 31% ya que como se observa en la Figura 8 en el control se tuvieron 80 300 000 UFC/ml. y en el que contenía el extracto etanólico de *Capsicum* (antimicrobiano) solamente 55 200 000 UFC/ml. Expresado de manera logarítmica el control a la cuarta hora contenía

8.03×10^7 y el medio con el agente antimicrobiano 5.52×10^7 al igual que el otro tipo de *E. coli* no disminuyó ningún ciclo logarítmico.

En el caso de estas dos *E. coli* probadas, se observa ligeramente un retardo sin poderse decir que hubo una inhibición de su crecimiento, esto explicaría que en la dieta del mexicana basada en el chile, la flora bacteriana intestinal no se vea afectada por el consumo de estos ingredientes como el chile en sus diferentes variedades.

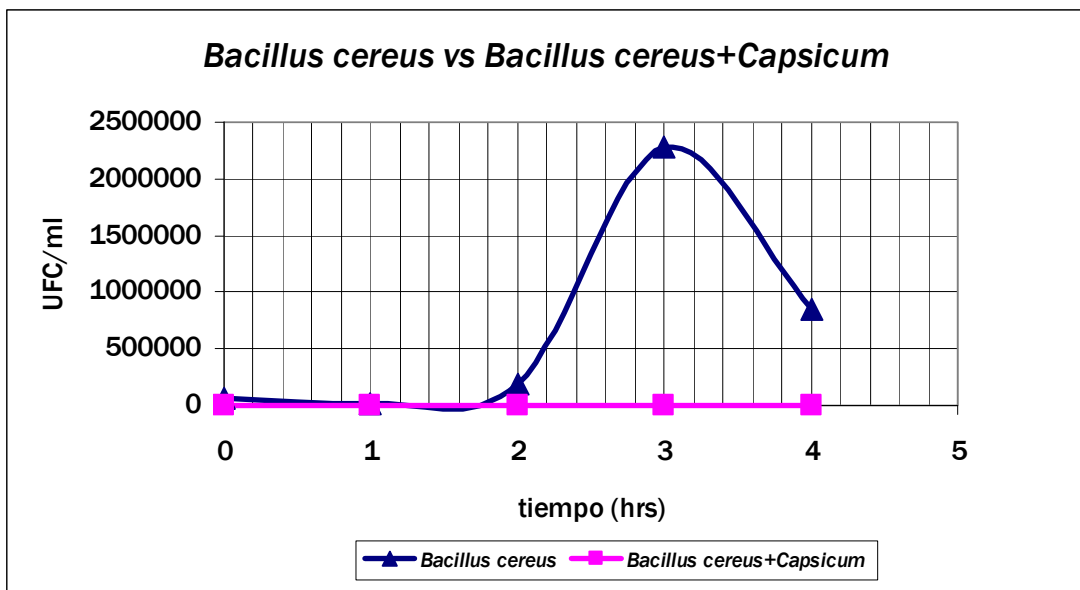


Figura 9. Cinética de crecimiento de *Bacillus cereus* vs *Bacillus cereus* +*Capsicum* (UFC/ml.).

En la cinética de crecimiento de *Bacillus cereus* el extracto etanólico de *Capsicum* (antimicrobiano) tuvo un efecto bactericida ya que desde el tiempo 0 no hubo crecimiento de la bacteria, mientras que el control tuvo una proliferación de 2 280 000 UFC/ml. a la tercera hora. Contrario a lo expresado por Cichewics, et al., (1996) el *Bacillus cereus* mostró incremento en el crecimiento de la bacteria ante la presencia de extractos acuosos de tejidos de *Capsicum annum*, *Capsicum chinese*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum pubescens*, esto puede ser debido al extracto acuoso obtenido, método de trabajo, tipo de *Capsicum* y a las concentraciones utilizadas, ya que para el presente estudio mostró una actividad bactericida (25).

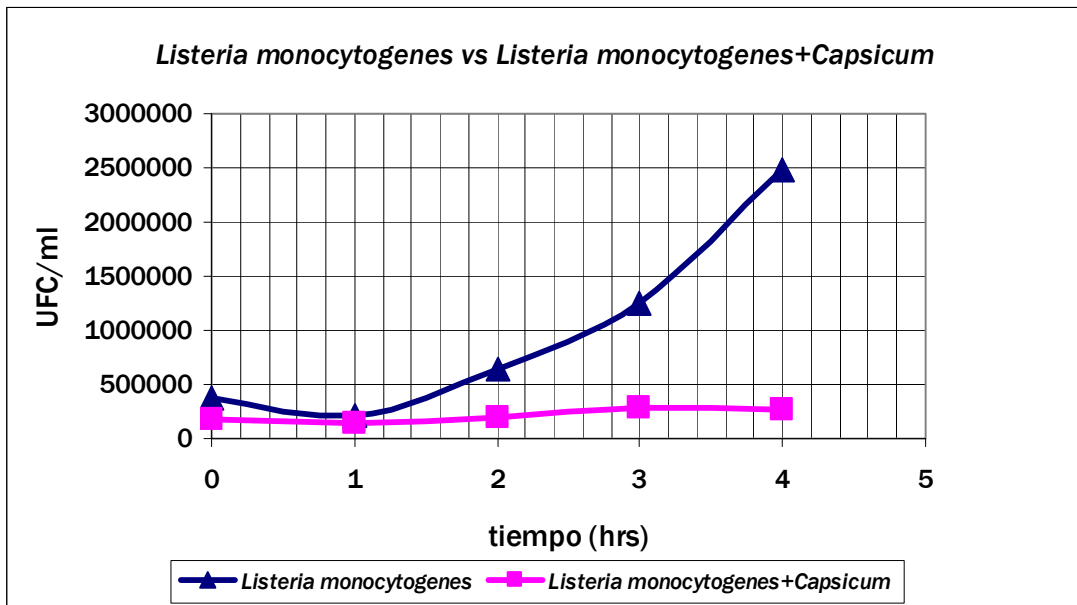


Figura 10. Cinética de crecimiento de *Listeria monocytogenes* vs *Listeria monocytogenes* + *Capsicum* (UFC/ml.).

En cuanto a *Listeria monocytogenes* en la hora cuatro el control tenía 2 480 000 UFC/ml., mientras que en el matraz con extracto etanólico de *Capsicum* (antimicrobiano) únicamente habían 260 000, lo cual significa que en la hora 4 disminuyó un 89.51% en el crecimiento.

Expresado de forma logarítmica el control tenía 2.48×10^6 , Mientras que el que contenía el antimicrobiano 2.6×10^5 . Lo que significa que disminuyó un ciclo logarítmico. Como lo expresan otros autores como Dorantes, et al., (2000) donde se usaron extractos isopropanólicos de diferentes especies de chiles (habanero, serrano y pimiento morrón) los capsaicinoides fueron separados por HPLC (ácido orto cumárico, meta cumárico, ácido trans cinámico, capsaicina y dihidrocapsaicina), y probados éstos en círculos de papel filtro observando halos de inhibición en agar antibiótico, ésta es una de las bacterias más sensibles a los extractos de chile (Ver Figura 10).

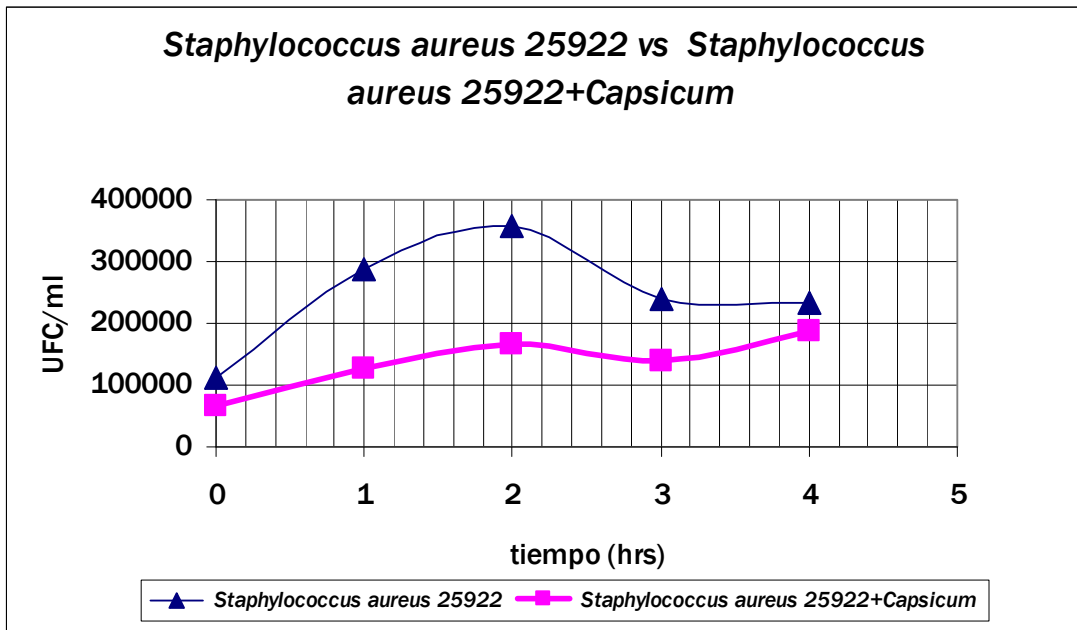


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* 25922 vs *Staphylococcus aureus* 25922 +Capsicum (UFC/ml.).

La inhibición del crecimiento para *Staphylococcus aureus* 25922 debido al extracto etanólico de *Capsicum* (antimicrobiano) fue más evidente en la hora 2 ya que en el control se tenían 357 000 UFC/ml. y en el matraz con antimicrobiano únicamente 168 000 un 52.94% menos de crecimiento. Expresado de manera logarítmica se tiene que en el control había 3.57×10^5 y en el que contenía el agente antimicrobiano 1.68×10^5 . Aunque en algunos artículos Dorantes, et al., (2000), Soetarno et al., (1997), donde se usaron extractos isopropanólicos de diferentes especies de chiles (habanero, serrano y pimiento morrón) y extractos etanólicos de *Capsicum annum* L. var. Longum variedad étnica de Indonesia, se hace mención de que los extractos de chile tienen efectos antibacteriales, medidos a través de halos de inhibición, sin embargo en la cinética de crecimiento para el *Staphylococcus aureus* 25922 no se presenta efecto antimicrobiano del Capsicum, ya que se puede observar que la bacteria continúa creciendo en la hora 4.

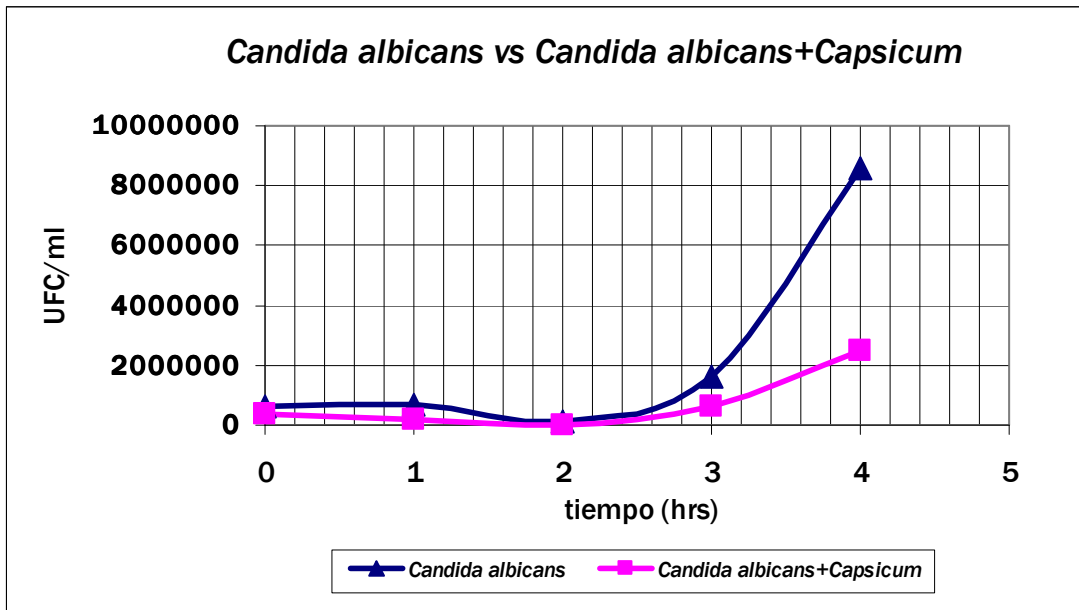


Figura 12. Cinética de crecimiento de *Candida albicans* vs *Candida albicans* +*Capsicum* (UFC/ml.).

En la hora cuatro como se muestra en la Figura 12 la levadura *Candida albicans* mostró un crecimiento de 8 600 000 UFC/ml. mientras que la levadura con el extracto etanólico de *Capsicum* únicamente 2 500 000 UFC/ml. El crecimiento disminuyó un 70.93%. De manera logarítmica se expresa como sigue: en el control 8.6×10^6 , mientras que en el que contenía el extracto etanólico 2.5×10^6 . Lo cual nos indica que no hay disminución de ciclos logarítmicos. En otros estudios hechos por Soetarno, (1997) se muestra que la actividad de los extractos etanólicos de *Capsicum annum* L. var. Longum variedad étnica de Indonesia, la actividad antimicrobiana probada a través de halos de inhibición son muy bajos en comparación con ciertos antibióticos, pero aún así para el caso de la levadura, los extractos pueden servir como antimicrobiano para el tratamiento de úlceras en la boca provocadas por *Candida albicans*.

Cuadro 8. Resumen de Resultados de Objetivo Particular 1

Bacteria/Levadura	Efecto del extracto etanólico de <i>Capsicum</i>	% de disminución crecimiento	Disminución logarítmica (ciclos)
<i>Salmonella</i>	Bacteriostático	96.2	1
<i>Pseudomonas</i>	Bacteriostático	97.8	1
<i>Escherichia coli</i>	Bacteriostático	35	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	Bacteriostático	31	0
<i>Bacillus cereus</i>	Bactericida	99.9	6
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacteriostático	89.51	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	Bacteriostático	52.94	0
<i>Candida albicans</i>	Fungistático	70.93	0

4.6 Objetivo particular 2

La evaluación del crecimiento a través de la absorbancia contra el tiempo de los cultivos bacterianos con y sin *Capsicum*, presentó problemas ya que los blancos utilizados para ajustar el espectrofotómetro marcaban en una longitud de onda un pico máximo para el medio de cultivo y para el medio de cultivo conteniendo *Capsicum* marcaba otro pico máximo.

Esto lo podemos traducir en lo siguiente: el extracto etanólico está afectando de alguna manera la presencia o ausencia de partículas suspendidas. Considerando este fenómeno, se ajustó el espectrofotómetro con un blanco de agua, un blanco de medio de cultivo y un blanco de medio de cultivo con *Capsicum*.

Los cultivos bacterianos se evaluaron hasta que se encontraban en fase estacionaria esto con el fin de poder determinar la velocidad de crecimiento. Para la determinación de la velocidad, se consideró la tendencia en la fase logarítmica y la pendiente resultante se traduce en la velocidad de crecimiento.

Como se muestra en el Cuadro 9 se expresan los promedios de las velocidades de crecimiento tanto de los controles como de los microorganismos con *Capsicum*. Se

observan resultados negativos, lo que puede indicar que si la tendencia era negativa, los microorganismos suspendidos se aglomeraron o finalmente se murieron y se lisaron.

Los datos de velocidad de crecimiento de los inóculos con *Capsicum* fueron tratados estadísticamente con el programa estadístico SPSS Versión 12, donde se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas, lo que indicó que si hay diferencia significativa entre cada uno de los microorganismos, por lo que las varianzas no son homogéneas, lo que significa que el *Capsicum* tiene un efecto diferente de acuerdo al tipo de bacteria o levadura que se haga la prueba.

Posteriormente se realizó la prueba de Tukey, la cual mostró que de acuerdo a las velocidades de crecimiento de cada uno de los microorganismos (bacterias y levaduras), la *Pseudomonas* y la *Escherichia coli* habían sido las bacterias más afectadas y la levadura *Candida albicans* y el *Bacillus cereus* los microorganismos que presentaron resistencia al estar en el medio con *Capsicum*.

Los datos de absorbancia fueron graficados para obtener el valor de la velocidad de crecimiento del control así como del inóculo con el extracto etanólico de *Capsicum* (antimicrobiano), dichas velocidades muestran como el crecimiento de las bacterias disminuye, se retarda o bien se inhibe al estar en presencia del *Capsicum*.

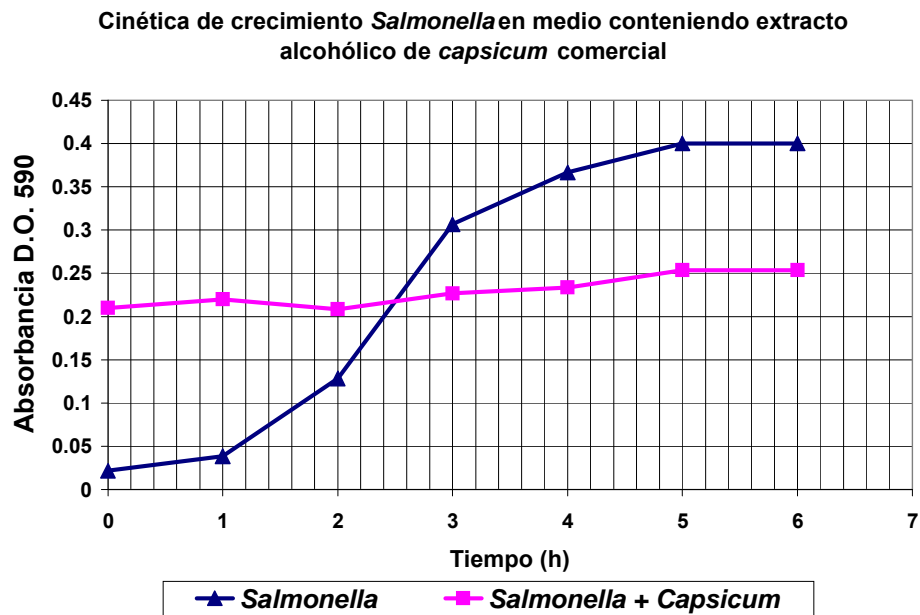


Figura 13. Cinética de crecimiento de *Salmonella* vs *Salmonella + Capsicum* (Absorbancia).

Como se muestra en la Figura 13, al llegar la bacteria a la fase estacionaria en la hora 6, muestra un valor de absorbancia de 0.403 en el control, y para la misma hora en el que contiene el *Capsicum* el valor fue de 0.26 lo que indica que disminuyó un 35.48% el crecimiento de la bacteria, lo cual concuerda con lo expresado por Dorantes, (2000), donde la *Salmonella* fue la bacteria más resistente, donde se usaron extractos isopropanólicos de diferentes especies de chiles (habanero, serrano y pimiento morrón). Y de acuerdo a los datos mostrados la *Salmonella* no presentó inhibición del crecimiento, únicamente lo retardó.

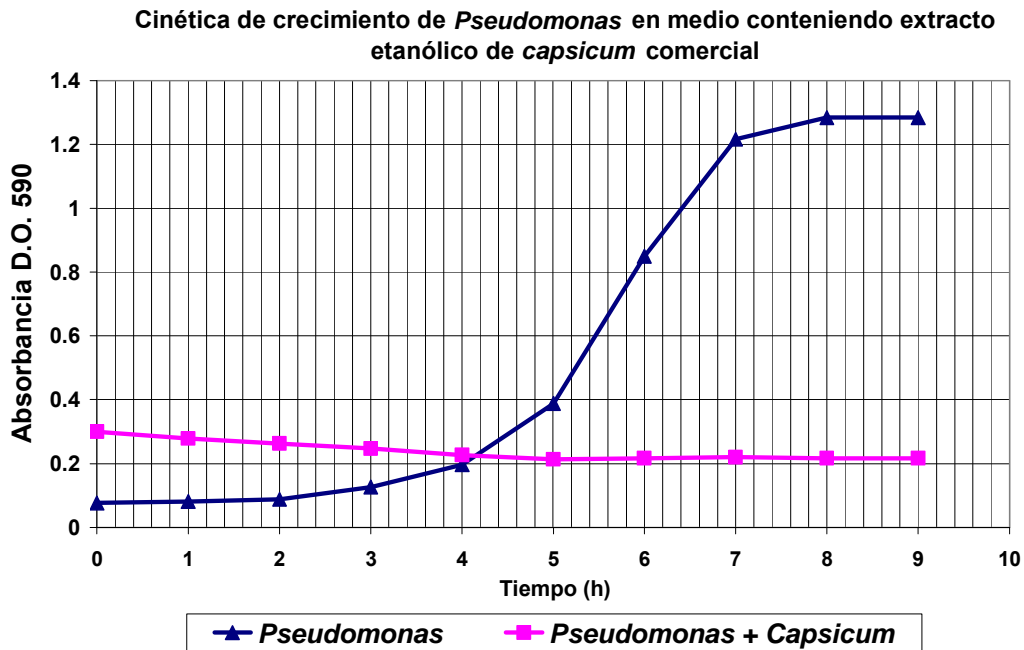


Figura 14. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas* vs *Pseudomonas* + *Capsicum* (Absorbancia).

En cuanto al crecimiento de la bacteria *Pseudomonas*, en la hora 8, se tuvo un valor de absorbancia de 1.28 en el control, sin embargo en el que contenía el antimicrobiano 0.21, lo cual significa que el crecimiento se redujo un 83.59%, siendo ésta una de las bacterias más afectadas ante la presencia de el extracto de *Capsicum*. Contrario al estudio por Molina-Torres et al. (1999), donde se utiliza capsaicina Sigma diluida en etanol, evaluado a una absorbancia de 590 nm., el cual nos dice que el *Capsicum* únicamente retarda el crecimiento de la bacteria.

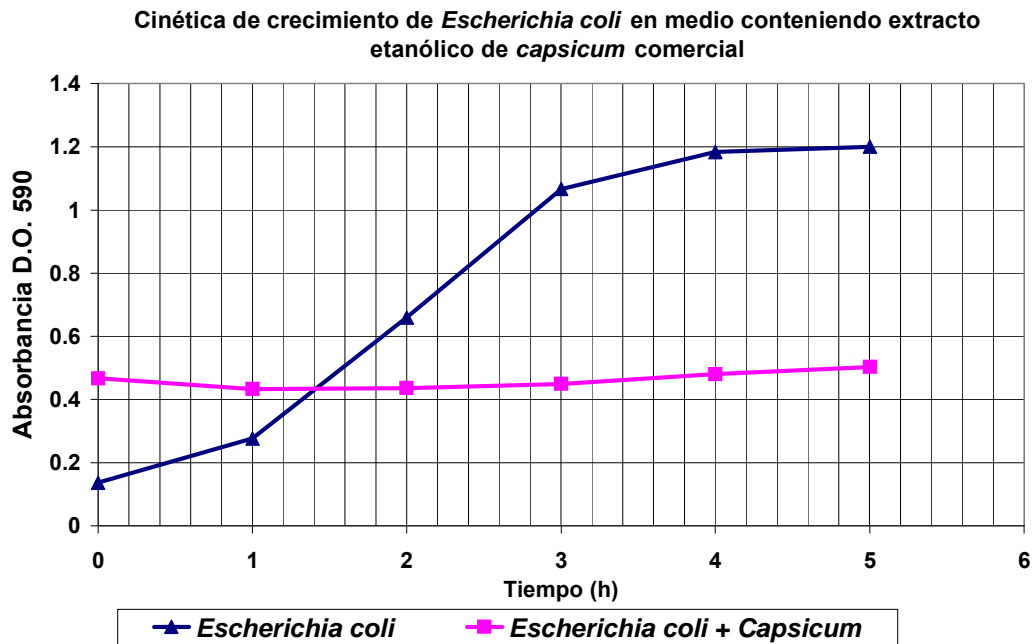


Figura 15. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* vs *Escherichia coli* + *Capsicum* (Absorbancia).

La bacteria *Escherichia coli* se encontró en fase estacionaria a partir de la hora 5, su valor de absorbancia fue de 1.2 en el control, y en el inóculo que contenía extracto etanólico de *Capsicum* 0.503 por lo que se tuvo un 58.08% de disminución en la velocidad de crecimiento. Contrario a lo indicado por Molina-Torres, (1999), donde utilizó capsaicina de Sigma diluida en etanol, este únicamente retarda el crecimiento de la bacteria, en la Figura 15 podemos observar que la bacteria se mantiene en una misma línea de crecimiento, por lo que el efecto que se tuvo fue bacteriostático, ya que se como se observa en la hora 5, el control comienza a crecer nuevamente.

Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* 8739 en medio conteniendo extracto etanólico de capsicum comercial

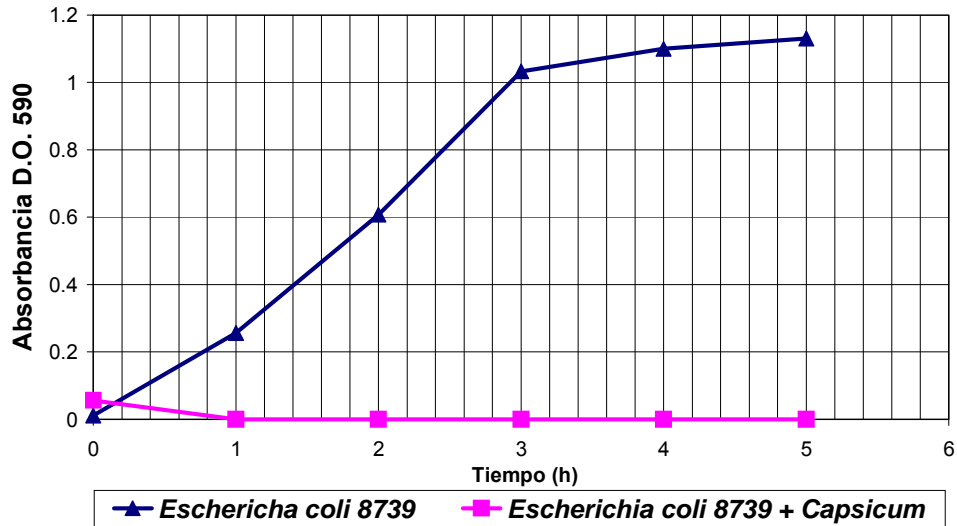


Figura 16. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* 8739 vs *Escherichia coli* 8739 + Capsicum (Absorbancia).

La Figura 16 muestra que la *Escherichia coli* 8739 no tuvo actividad a partir de que se puso en contacto en el medio con *Capsicum*, dando un valor de 0 en absorbancia (en el que contenía el extracto etanólico de *Capsicum*) y en el control el cual muestra un valor de de 1.13. Lo que quiere decir que el crecimiento disminuyó un 100%, siendo en este estudio la bacteria más afectada por el antimicrobiano. Sin embargo en otros estudios realizados por Molina-Torres, (1999) dónde se probó la actividad antimicrobiana sobre una cepa de *E. coli* ATCC 25922 y que utilizó el mismo solvente (etanol) para diluir la capsaicina de Sigma, se afirma que la capsaicina retarda el crecimiento de la bacteria, más no lo inhibe, lo cual puede deberse a que el tipo de cepa es diferente y a la pureza de la capsaicina.

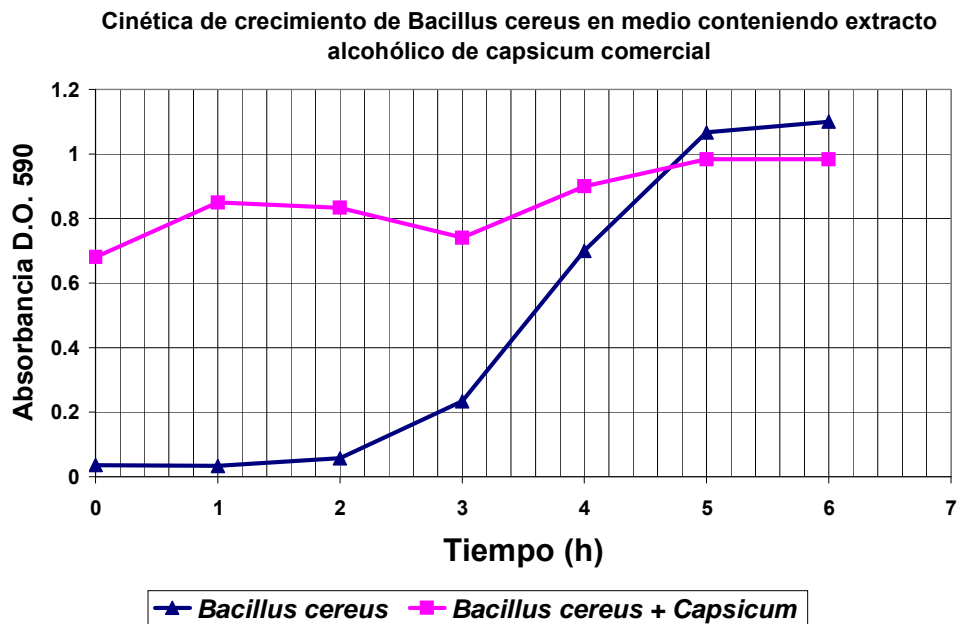


Figura 17. Cinética de crecimiento de *Bacillus cereus* vs *Bacillus cereus* + *Capsicum* (Absorbancia)

La velocidad de crecimiento de *Bacillus cereus*, no disminuyó ante la presencia de el antimicrobiano (extracto etanólico de *Capsicum*), este únicamente disminuyó un 10.90% su crecimiento, lo que significa que la bacteria es muy resistente al *Capsicum*, siendo así coincide con lo expresado por Cichewics, et al. (1996), donde utilizó extractos acuosos de tejidos de *Capsicum annum*, *Capsicum chinese*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum pubescens* e indica que las hojas del chile fresco *Capsicum annum* inhiben parcialmente al *Bacillus cereus*.

Cinética de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en medio conteniendo extracto etanólico de *capsicum*

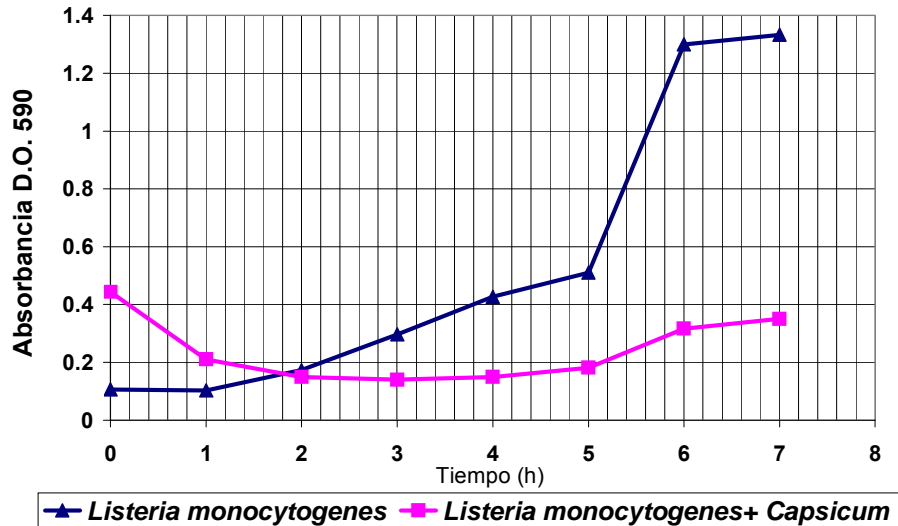


Figura 18. Cinética de crecimiento de *Listeria monocytogenes* vs *Listeria monocytogenes*+*Capsicum* (Absorbancia).

La velocidad de crecimiento para la bacteria *Listeria monocytogenes* muestra que al llegar a la fase estacionaria en la hora 7 la bacteria en el control tiene un valor de absorbancia de 1.33 y en el medio con el extracto etanólico de *Capsicum* un valor de 0.35 lo cual indica un 73.68% de disminución de la velocidad de crecimiento.

En otros estudios hechos por Dorantes, et al. (2000) donde se usaron extractos isopropanólicos de diferentes especies de chiles (habanero, serrano y pimiento morrón) probados éstos en círculos de papel filtro observando halos de inhibición, la bacteria *Listeria monocytogenes* es una de las más sensibles a los extractos de chile mencionados.

Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* 25922 en medio conteniendo extracto etanólico de *capsicum* comercial

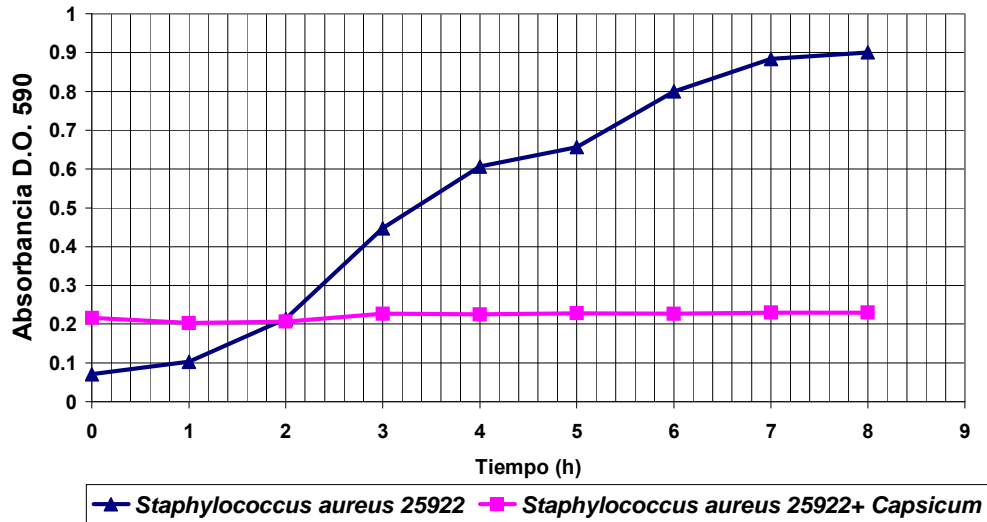


Figura 19. Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* 25922 vs *Staphylococcus aureus* 25922 + *Capsicum* (Absorbancia).

La absorbancia registrada en la hora 8 del control de la bacteria *Staphylococcus aureus* fue de 1.45, y en el medio con *Capsicum* fue de 0.23, indicando que la velocidad de crecimiento disminuyó un 74.44%. Como lo expresan otros autores Dorantes, et al. (2000) donde se usaron extractos isopropanólicos de diferentes especies de chiles (habanero, serrano y pimiento morrón) los capsaicinoides fueron separados por HPLC (ácido orto cumárico, meta cumárico, ácido trans cinámico, capsaicina y dihidrocapsaicina), y probados éstos en círculos de papel filtro observando halos de inhibición en agar antibiótico, ésta bacteria si tiene una ligera disminución en la velocidad de crecimiento, aunque esta se la atribuyen a otros ácidos como al cinámico y meta cumárico, las cuales al igual que en el estudio hecho por Dorantes (2000) pudieran estar presentes en el extracto etanólico de *Capsicum* comercial.

Cinética de crecimiento de *Candida albicans* en medio conteniendo extracto etanólico de *capsicum* comercial

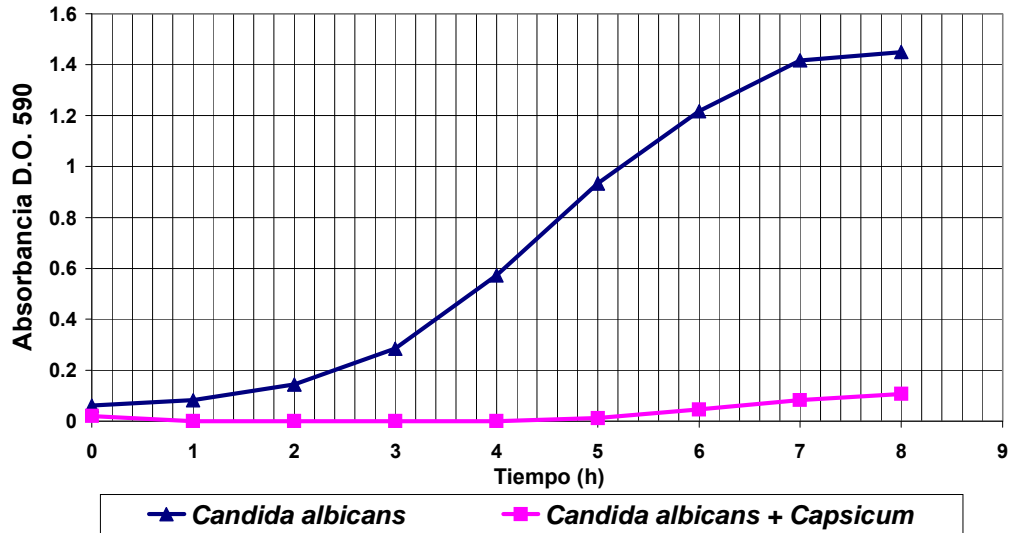


Figura 20. Cinética de crecimiento de *Candida albicans* vs *Candida albicans* + *Capsicum* (Absorbancia).

Como se observa en la Figura 20, la levadura *Candida albicans* al llegar a la hora 8 en el control mostró un valor de absorbancia de 1.45, y en el que contenía en el medio de crecimiento extracto etanólico de *Capsicum* fue de 0.106, esto significa que la velocidad de crecimiento disminuyó un 92.68%.

Contrario a los estudios hechos por Soetarno (1997), donde se muestra que la actividad de los extractos etanólicos de *Capsicum annuum* L. var. Longum variedad étnica de Indonesia, son muy bajos, en este estudio se demuestra que la levadura *Candida albicans* puede inhibirse ante el extracto de *Capsicum* por lo que pudiera servir como antimicrobiano contra esta levadura.

Cuadro 9. Promedios de velocidades de crecimiento (Control y con *Capsicum*).

Bacteria /Levadura	Promedio de Velocidades de crecimiento Control	Promedio de Velocidades de crecimiento con extracto etanólico de <i>Capsicum</i>
<i>Salmonella</i>	0.0962	0.0081
<i>Pseudomonas</i>	0.3522	-0.0106
<i>Escherichia coli</i>	0.395	0.0096
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0.3883	-0.0081
<i>Bacillus cereus</i>	0.3497	0.0456
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.4367	0.0006
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	0.106	0.0006
<i>Candida albicans</i>	0.2907	0.0117

Los resultados de los objetivos 1 y 2 difieren principalmente por la metodología empleada, en el objetivo particular 1 se evaluó la cinética de crecimiento de las bacterias y levadura a través de UFC/ ml., y para el objetivo particular 2 la cinética de crecimiento por medio de absorbancia.

Por lo tanto en cuanto a la *Salmonella* los resultados presentados para cada uno de los objetivos son similares, ya que en el caso de las UFC, hubo un efecto bacteriostático, al igual que en los resultados de absorbancia donde se muestra también haber retardado el crecimiento de la bacteria (bacteriostático).

En el caso de *Pseudomonas* presenta resultados muy similares en ambas metodologías debido a que esta bacteria solamente tuvo un efecto bacteriostático en el medio con *Capsicum*.

La *Escherichia coli* como se mencionó, es habitante estricto del intestino, presentó cierta tolerancia al *Capsicum*, ya que en los resultados de UFC, el antimicrobiano no le afectó al crecimiento, pero en los resultados de absorbancia mostró un efecto bacteriostático. En México, el consumo de picante es fundamental en la alimentación de los habitantes por lo que la bacteria *Escherichia coli* no se ve afectada en su crecimiento.

Sin embargo para la *Escherichia coli* 8739 ocurrió un fenómeno diferente ya que para los resultados de UFC si presentó cierta tolerancia al antimicrobiano, es decir la bacteria únicamente retardó el crecimiento, pero en los resultados de absorbancia el *Capsicum* actuó como bactericida.

El *Bacillus cereus* también tuvo grandes diferencias en los resultados de cada metodología puesto que en el caso del conteo de UFC la bacteria no creció por lo que el *Capsicum* actuó como bactericida, sin embargo en los resultados de Absorbancia no presentó inhibición del crecimiento, es decir la bacteria toleró el antimicrobiano.

La bacteria *Listeria monocytogenes* presentó resultados muy similares ya que en UFC presentó una disminución de crecimiento del 89% y en el caso de Absorbancia del 73%, lo cual indica que tuvo un efecto bacteriostático en ambos resultados.

El *Staphylococcus aureus* tuvo un comportamiento muy diferente, esto es porque en los resultados de UFC tuvo un efecto bacteriostático, sin embargo, en los resultados de absorbancia presentó un efecto bactericida.

Por último la levadura *Candida albicans* en los resultados de ambas metodologías presentó un efecto fungistático muy notable, ya que en los resultados de UFC tuvo una disminución del crecimiento de 70.93% y en los resultados de absorbancia 93%.

Conclusiones

1.- La actividad antimicrobiana del *Capsicum* probado, evaluado a través de tres diferentes metodologías (halos de inhibición (Método de Kirby Bauer), UFC/ml (Técnica de Cuenta Viable en placa) y Absorbancia) contra diversas bacterias y una levadura, mostró diferencias debido muy probablemente a múltiples factores a considerar como son:

-Fuente de obtención del *Capsicum* (tipo de chile, estado de madurez, región, método de extracción, tipos de solventes empleados para la extracción, pureza y concentraciones probadas)

-Microorganismos de prueba (bacterias gram +, gram -, de colección o de aislamiento, hongos).

-Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana (halos de inhibición, UFC/ml. y Absorbancia).

En este caso se probó un *Capsicum* comercial empleado para proporcionar pungencia, color y sabor en botanas.

2.- De acuerdo al *Capsicum* evaluado (comercial), a la metodología empleada y los microorganismos probados, se concluye que el extracto etanólico de dicho *Capsicum*, si tiene actividad antimicrobiana (bacteriostático en la mayoría de las bacterias probadas y bactericida contra *Bacillus cereus*) a las concentraciones establecidas en este trabajo, que la metodología mas adecuada para mostrar esta actividad antimicrobiana es la de Cuenta Viable en Placa (UFC / ml), y que los microorganismos difieren entre si a esta actividad antimicrobiana, debido a la naturaleza misma de cada microorganismo.

Referencias

- (1) **Ahmed** J; Shivare; Debnath (2002); *Colour Degradation and Rheology of Green Chilli Puree during Thermal Processing. International J of Food Science and Technology*, 37, 57-63.
- (2) **Barbero** G; Palma M; Carmelo G (2006); *Determination Of Capsaicinoids in Peppers by Microwave-Assisted-Extraction-High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. Analytica Chimica Acta*.
- (3) **Bazán** E; Sánchez E; Cordoba E; Hernández F; Manzano P; López R (2001); *Hallazgo de Candida albicans en manos de manejadores de alimentos. Rev Mex Patol Clin*, 48, 37-41
- (4) **Brock**, TD, Smith, DW & Madigan, MT 1987, *Microbiología*. 2ª edn, Hispanoamericana, USA, 906 pp.
- (5) **Chiang** G (1986); *HPLC Analysis of capsaicins and simultaneous determination of Capsaicins and Piperine by HPLC-ECD and UV. J of Food Science*, 51, 499-503.
- (6) **Cichewics** R; Thorpe P (1996); *The antimicrobial properties of chile peppers (Capsicum species) and their uses in Mayan medicine. J of Ethnopharmacology*, 52, 61-70.
- (7) **Cruz** A; *El chile indispensable en la comida mexicana, nació en Sudamérica. La Jornada*, Jueves 7 de julio de 2005.
- (8) **Domingo** D; López-Brea M (2003); *Plantas con Acción Antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap*, 16,385-393.
- (9) **Dorantes** L; Colmenero R; Hernández H; Mota L; Jaramillo M; Fernández E; Soto C (2000); *Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by Capsicum annum extracts. International J of Food Microbiology*, 57, 125-128.
- (10) **Emrick** M; Penfield M; Bacon C; Laack R; Brekke C (2005); *Heat Intensity and Warmed-over Flavor in Precooked Chicken Patties Formulated at 3 Fat levels and 3 Pepper Levers. J of Food Science*,70, S600-S604.

- (11)**Escamilla J**; *Ahora es cuando, chile verde, le has de dar sabor al caldo*. *City Life*. Septiembre, 52-53.
- (12)**Frazier**, WC & Westhoff, DC 1993; *Microbiología de los Alimentos*, 4ª edn, Acribia, USA, 522 pp.
- (13)**García M**; Ruelas X; Hernández M; Reboloso O; Reyes M (2004); *Capsaicine Determination on Traditional Sauces from Saltillo, Coahuila*, 236-241.
- (14)**Garden L**; Penfield M; Saxton A (1999); *Perception of heat in cheese sauces as affected by capsaicin Concentration, Fat Level, Fat Mimetic and Time*. *J of Food Science*, 64, 175-179.
- (15)**Jeung L**; Ki-Teak L, Mee K (2005); *Effect of Gamma Irradiated Red pepper Powder on the Chemical and Volatile Characteristics of Kakdugi, a Korean Traditional Fermented Radish Kimchi*. *J of Food Science*, 70, C441-C447.
- (16)**Kurian A**; Starks A (2002); *HPLC Analysis of capsaicinoids extracted from Whole Habanero Chilli peppers*. *J of Food Science* 67, 956-962.
- (17)**Kurita S**; Kitagawa E Kim Ch; Momose Y; Iwahashi H (2002); *Studies on the Antimicrobial Mechanisms of Capsaicin Using Yeast DNA Microarray*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*; 66, 532-536.
- (18)**López G**; Chilli, *La especia del nuevo mundo*. *Ciencias* 69, Enero–Marzo 2003.
- (19)**Molina J**; García A; Ramírez E (1999); *Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin*. *J of Ethnopharmacology*, 64, 241-248.
- (20)**Moreno A** 2000, “Extracción supercrítica de colorantes y capsaicina de *Capsicum Anuum*”. Tesis de licenciatura Químico de Alimentos, UNAM. México.
- (21)**Mossel**, DAA, Moreno, B & Striujk, CB 2000; *Microbiología de los Alimentos*, 2ª edn, Acribia, España. 375 pp.
- (22)**Pérez A**; *Efectos fisiológicos de la capsaicina sobre el aparato digestivo*. *Revista Ministerio de Salud*, Noviembre 2005.

- (23)**Salazar L**; Silva C; Herrera M; *Del chile y sus bondades. Tertio Millenio.*
- (24)**Segundo M** (2006); *Candida albicans, un hongo oportunista. Salud*; Octubre -Diciembre, 56-58.
- (25)**Shakhodoyatov R**; Sagdullaev B (2001); *Capsaicin in Capsicum annum Condensed extract determined by HPLC. Chemistry of Natural Compounds*, 37, 493-494.
- (26)**Soetarno S**; Sukrasno E; Yulinah E (1997); *Antimicrobial Activities of the ethanol extracts of Capsicum fruits with different levels of pungency. JMS*, 2, 57-63.
- (27)**Xing F**; Cheng G; Kejing Y (2006); *Study on the Antimicrobial Activities of the Capsaicin Microcapsules. J of Applied Polymer Science*, 102, 1318-1321.
- (28)AMC 2006, "Aplicaciones del capsicum en alimentos" Revisado 13 noviembre 2006. <http://www.agroindustrial-amc.com>
- (29)Centro de Tecnología Agroindustrial e industrias químicas Inquibol 2001, "Productos en desarrollo clínico" Revisado 11 febrero de 2008. www.cyted.org
- (30)CIAO.GmbH 2006. "Los Chiles ¿Qué es el Chile?" Revisado 10 octubre 2006. www.ciao.es/Faro_Chiles_Serranos__Opinion_1148080
- (31)El ergonomista 2005, "Microbiología de los Alimentos" Revisado 4 diciembre de 2007. <http://www.elergonomista.com/microbiologia/listeria.html>.
- (32)El ergonomista 2005, "Microbiología de los Alimentos" Revisado 4 diciembre de 2007. <http://www.elergonomista.com/microbiologia/pseudomonas.html>
- (33)ZARC 2005, "Tecnología: Capsaicina" Revisado 28 octubre 2006. www.zarc.com/.../tech_info/capsicums_sp.html
- (34)Goldpharma 2007, "Preparados con capsicum y agentes similares" Revisado 11 de febrero de 2008. <http://goldpharma.com>
- (35)Invenia Tags 2003, "Capsaicina" Revisado 11 febrero de 2008. www.invenia.es

(36)Mercado Natural 2006, "Cayena" Revisado 11 febrero de 2008. www.hipermercadonatural.com

(37)No pain 2007, "Alivio de la artritis, reumatismo y lesiones articulares" Revisado 11 febrero de 2008. www.bellezadietas.com

(38)Salonpaso R 2007, "Productos Salonpas" Revisado 11 febrero de 2008. www.salonpas.us.es

(39)Wageningen University 2007, "*Staphylococcus aureus*" Revisado 30 noviembre de 2007.
<http://www.food-info.net/es/bact/staur.html>



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico
de Capsicum comercial en bacterias gram positivas, gram negativas
y levadura.

que presenta la pasante: Tábara Andrea Franco Vega
con número de cuenta: 40301381-6 para obtener el título de:
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Marzo de 2008

PRESIDENTE	<u>Dra. Susana Patricia Miranda Castro</u>	
VOCAL	<u>IBO. Leticia Figueroa Villarreal</u>	
SECRETARIO	<u>MC. María Guadalupe Amaya León</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Julieta González Sánchez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>IA. Miriam Alvarez Velasco</u>	

ANEXOS

Glosario de Términos Científicos

Absorbancia: Se define como la proporción de luz incidente que es absorbida por una sustancia.

Agar: Elemento solidificante muy utilizado para la preparación de medios de cultivos. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él.

Aovada: Ovalada

Bacteria: Organismo unicelular y microscópico. Se reproducen por división celular sencilla.

Bacteriostático: Se detiene el crecimiento o bien se inhibe, pero no tiene lugar la muerte.

Bactericida: Muerte del microorganismo.

Cepa: variante genética específica de un organismo. Conjunto de individuos de una misma especie existente en una colonia o cultivo.
Colonia: Es cuando un microorganismo se reproduce millones de veces, y da origen a una masa celular visible con características especiales.

Cuenta viable en placa (CVP): Método Indirecto de Conteo de Microorganismos realizado en placa, ya que las células viables separadas espacialmente unas de otras por dispersión sobre un medio de agar, originan cada una en su crecimiento colonias independientes y macroscópicamente visibles. Por lo tanto, si se preparan diluciones apropiadas de una población bacteriana y se siembra con ellas un medio conveniente, puede calcularse el número de células viables en al contar el número de colonias que se desarrollan después de la incubación de las placas y al multiplicar dicho valor por el factor de dilución.

Espectrofotómetro: Mide la densidad óptica (D.O.), es decir la absorbancia (una medida de la luz transmitida a través de la suspensión).

Fase Estacionaria: Esta fase se caracteriza porque aún existe crecimiento. En este período se agotan nutrientes esenciales y se acumulan sustancias de desecho. En esta etapa pueden sintetizar metabolitos como antibióticos.

Gram Positivas: Las bacterias se tiñen en azul. Casi el 90% de la pared está constituida por peptidoglucanos, aunque otro tipo de constituyentes, como el ácido teicoico está generalmente presente en pequeñas cantidades.

Gram Negativas: Las bacterias quedan decoloradas y se ven microscópicamente en rojo. Únicamente del 5 al 20% de la pared es de peptidoglucanos; el resto consta de lípidos, polisacáridos y proteínas generalmente presentes en una capa externa, esto es por fuera de la lamina de peptidoglucano.

Inóculo: *inoculum* (microbio) pequeña cantidad de un producto que contiene bacterias y que se toma, por ejemplo, para hacer un cultivo, una resiembra o infectar determinados animales de experimentación.

Levadura: son microorganismos que se encuentran generalmente en forma de células únicas y que se reproducen mediante gemación. Algunas levaduras están formadas únicamente por células individuales y a veces cadenas cortas, mientras que otras se encuentran con un cierto rango de formas celulares, incluyendo diversos tipos de filamentos.

Medio de Cultivo: Medio artificial donde se obtiene un crecimiento de microorganismos.

Probióticos: las sustancias probióticas (bacterias vivas) y las prebióticas (componentes alimentarios de los que viven éstas). Las bacterias buenas o "probióticas" ayudan a mantener un equilibrio bacteriano saludable, estimulan la inmunidad intestinal y evitan la aparición de organismos patógenos que causan las alteraciones estomacales e intestinales.

Pungencia: Picor de los chiles.

Sustancia P: Neurotransmisor de naturaleza peptídica, llamado neurotransmisor del dolor.

UFC: Unidad formadora de Colonias

Vitamina P: Llamada también biflavonoides, antihemorrágica y protectora del corazón y los vasos sanguíneos. Fuentes: cítricos, uvas, grosellas, albaricoques, trigo sarraceno, moras, cerezas, escaramujo, pimientos verdes, tomates, papayas, melón, castaño de indias.

Análisis Estadísticos

Univariate Analysis of Variance Between- Subjects Factors

		N
Concentración	Concentración 1	30
	Concentración 2	30
	Concentración 3	30
Bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	9
	<i>Candida</i>	9
	<i>E. coli</i>	9
	<i>E.coli 8739</i>	9
	<i>Listeria monocytogenes</i>	9
	<i>Pseudomonas</i>	9
	<i>Salmonella</i>	9
	<i>Staphylococcus aureus 25922</i>	9

Descriptive Statistics

Dependent Variable: INHIBICIÓN

Concentración	Bacteria	Media	Desviación Estándar	N
Concentración 1	<i>Bacillus cereus</i>	0.8333	0.05774	3
	<i>Candida</i>	0.6667	0.05774	3
	<i>E. coli</i>	0.6667	0.11547	3
	<i>E.coli 8739</i>	0.6333	0.05774	3
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.6	0	3
	<i>Pseudomonas</i>	0.8	0.1	3
	<i>Salmonella</i>	0.6	0	3
	<i>Staphylococcus aureus 25922</i>	0.83	0.054774	3
	Total	0.7	0.10828	30
Concentración 2	<i>Bacillus cereus</i>	0.8667	0.05774	3
	<i>Candida</i>	0.7	0.1	3
	<i>E. coli</i>	0.6	0	3
	<i>E.coli 8739</i>	0.6333	0.05774	3
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.7667	0.11547	3
	<i>Pseudomonas</i>	0.7333	0.15275	3
	<i>Salmonella</i>	0.6333	0.05774	3
	<i>Staphylococcus aureus 25922</i>	1.0333	0.11547	3
	Total	0.74	0.14527	30
Concentración 3	<i>Bacillus cereus</i>	0.8	0.26458	3
	<i>Candida</i>	0.7333	0.11547	3
	<i>E. coli</i>	0.8	0.1	3

	<i>E.coli 8739</i>	0.7333	0.05774	3
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.8	0	3
	<i>Pseudomonas</i>	0.7333	0.5774	3
	<i>Salmonella</i>	0.7	0	3
	<i>Staphylococcus aureus 25922</i>	1	0	3
	Total	0.78	0.12704	30
Total	<i>Bacillus cereus</i>	0.8333	0.14142	9
	<i>Candida</i>	0.7	0.0866	9
	<i>E. coli</i>	0.6889	0.11667	9
	<i>E.coli 8739</i>	0.6667	0.07071	9
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.7222	0.10929	9
	<i>Pseudomonas</i>	0.7556	0.10138	9
	<i>Salmonella</i>	0.6444	0.527	9
	<i>Staphylococcus aureus 25922</i>	0.9556	0.11304	9
	Total	0.74	0.13051	90

Levene's Test of Equality of Error Variances^a
 Dependent Variable: INHIBICIÓN

F	df1	df2	Sig.
4.182	29	60	0

Test the null hypothesis that the error variance of the dependant variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Concentración + Bacteria + Concentración + Bacteria

Test of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: INHIBICIÓN

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.009 ^a	29	0.035	4.122	0
Intercept	49.284	1	49.284	5836.263	0
Concentración	0.096	2	0.048	5.684	0.005
Bacteria	0.707	9	0.079	9.304	0
Concentración					0.188
Bacteria	0.206	18	0.011	1.357	
Error	0.507	60	0.008		
Total	50.8	90			
Corrected Total	1.516	89			

a. R Squared=0.666 (Adjusted R Squared= 0.504)

**Post Hoc Tests
CONCENTRACIÓN**

Multiple Comparisons

Dependent Variable: INHIBICIÓN
Tukey HSD

(I) Concentración	(J) Concentración	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.
Concentración 1	Concentración 2	-0.04	0.02373	0.219
	Concentración 3	-0.08	0.02373	0.004
Concentración 2	Concentración 1	0.04	0.02373	0.219
	Concentración 3	-0.04	0.02373	0.219
Concentración 3	Concentración 1	0.08	0.02373	0.004
	Concentración 2	0.04	0.02373	0.219

Based on observed means

Multiple Comparisons

Dependent Variable: INHIBICIÓN
Tukey HSD^{a,b}

(I) Concentración	(J) Concentración	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
Concentración 1	Concentración 2	-0.097	0.017
	Concentración 3	-0.137	-0.023
Concentración 2	Concentración 1	-0.017	0.097
	Concentración 3	-0.097	0.017
Concentración 3	Concentración 1	0.023	0.137
	Concentración 2	-0.017	0.097

Based on observed means

*The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

INHIBICIÓN

Tukey HSD^{a,b}

Concentración	N	Subset	
		1	2
Concentración 1	30	0.7	
Concentración 2	30	0.74	0.74
Concentración 3	30		0.78
Sig.		0.219	0.219

Means groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (Error) =0.008.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

b. Alpha = 0.05.

Univariate Analysis of Variance Between- Subjects Factors

		N
Microorganismo	<i>Bacillus cereus</i>	3
	<i>Candida</i>	3
	<i>E. coli</i>	3
	<i>E.coli 8739</i>	3
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3
	<i>Pseudomonas</i>	3
	<i>Staphylococcus aureus 25922</i>	3
	<i>Salmonella</i>	3

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Crecimiento

F	df1	df2	Sig.
3.145	7	16	0.027

Test the null hypothesis that the error variance of the dependant variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Microorganismo

Test of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CRECIMIENTO

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	0.006 ^a	7	0.001	13.509	0
Intercept	0.001	1	0.001	18.489	0.001
Microorganismo	0.006	7	0.001	13.509	0
Error	0.001	16	0		
Total	0.009	24			
Corrected Total	0.007	23			

a. R Squared=0.666 (Adjusted R Squared= 0.792)

**Post Hoc Tests
MICROORGANISMO**

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CRECIMIENTO
Tukey HSD

(I) Microorganismo	(J) Microorganismo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Bacillus cereus	<i>Candida</i>	0.0339	0.00671	0.002	0.0107	0.0571
	<i>E. coli</i>	0.036	0.00671	0.001	0.0127	0.0592
	<i>E.coli 8739</i>	0.0537	0.00671	0	0.0304	0.0769
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.045	0.00671	0	0.0218	0.0682
	<i>Pseudomonas</i>	0.056	0.00671	0	0.0327	0.0792
	<i>Staphylococcus aureus</i> 25922	0.045	0.00671	0	0.0218	0.0682
	<i>Salmonella</i>	0.0375	0.00671	0.001	0.0143	0.0607
Candida	<i>Bacillus cereus</i>	-0.0339	0.00671	0.002	-0.0571	-0.0107
	<i>E. coli</i>	0.0021	0.00671	1	-0.0212	0.0253
	<i>E.coli 8739</i>	0.0198	0.00671	0.127	-0.0035	0.043
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.0111	0.00671	0.714	-0.0121	0.0343
	<i>Pseudomonas</i>	0.0221	0.00671	0.00671	0.069	-0.0012
	<i>Staphylococcus aureus</i> 25922	0.0111	0.00671	0.714	-0.0121	0.0343
	<i>Salmonella</i>	0.0036	0.00671	0.999	-0.0196	0.0268
E. coli	<i>Bacillus cereus</i>	-0.036	0.00671	0.001	-0.0592	-0.0127
	<i>Candida</i>	-0.0021	0.00671	1	-0.0253	0.0212
	<i>E.coli 8739</i>	0.0177	0.00671	0.212	-0.0055	0.041
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.009	0.00671	0.0869	-0.0142	0.0323
	<i>Pseudomonas</i>	0.02	0.00671	0.121	-0.0033	0.0432
	<i>Staphylococcus aureus</i> 25922	0.009	0.00671	0.869	-0.0142	0.0323
	<i>Salmonella</i>	0.0015	0.00671	1	-0.0217	0.0248
E.coli 8739	<i>Bacillus cereus</i>	-0.0537	0.00671	0	-0.0769	-0.0304
	<i>Candida</i>	-0.0198	0.00671	0.127	-0.043	0.0035
	<i>E. coli</i>	-0.0177	0.00671	0.212	-0.041	0.0055
	<i>Listeria monocytogenes</i>	-0.0087	0.00671	0.888	-0.0319	0.0146
	<i>Pseudomonas</i>	0.0023	0.00671	1	-0.021	0.0255
	<i>Staphylococcus aureus</i> 25922	-0.0087	0.00671	0.888	-0.0319	0.0146
	<i>Salmonella</i>	-0.0162	0.00671	0.299	-0.0394	0.0071
Listeria monocytogenes	<i>Bacillus cereus</i>	-0.045	0.00671	0	-0.682	-0.0218
	<i>Candida</i>	-0.0111	0.00671	0.714	-0.0343	0.0121
	<i>E. coli</i>	-0.009	0.00671	0.869	-0.0323	0.0142
	<i>E.coli 8739</i>	0.0087	0.00671	0.888	-0.0146	0.0319
	<i>Pseudomonas</i>	0.011	0.00671	0.726	-0.0123	0.0342
	<i>Staphylococcus aureus</i> 25922	0	0.00671	1	-0.0232	0.0232

	<i>Salmonella</i>	-0.0075	0.00671	0.944	-0.0307	0.0157
<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus cereus</i>	-0.056	0.00671	0	-0.0792	-0.0327
	<i>Candida</i>	-0.0221	0.00671	0.069	-0.0453	0.0012
	<i>E. coli</i>	-0.02	0.00671	0.121	-0.0432	0.0033
	<i>E.coli 8739</i>	-0.0023	0.00671	1	-0.0255	0.021
	<i>Listeria monocytogenes</i>	-0.011	0.00671	0.726	-0.0342	0.0123
	<i>Staphylococcus aureus 25922</i>	-0.011	0.00671	0.726	-0.0342	0.0123
	<i>Salmonella</i>	-0.0184	0.00671	0.177	-0.0417	0.0048
<i>Staphylococcus aureus 25922</i>	<i>Bacillus cereus</i>	-0.045	0.00671	0	-0.0682	-0.0218
	<i>Candida</i>	-0.0111	0.00671	0.714	-0.0343	0.0121
	<i>E. coli</i>	-0.009	0.00671	0.869	-0.0323	0.0142
	<i>E.coli 8739</i>	0.0087	0.00671	0.888	-0.0146	0.0319
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0.00671	1	-0.0232	0.0232
	<i>Pseudomonas</i>	0.011	0.00671	0.726	-0.0123	0.0342
	<i>Salmonella</i>	-0.0075	0.00671	0.944	-0.0307	0.0157
<i>Salmonella</i>	<i>Bacillus cereus</i>	-0.0375	0.00671	0.001	-0.0607	-0.0143
	<i>Candida</i>	-0.0036	0.00671	0.999	-0.0268	0.0196
	<i>E. coli</i>	-0.0015	0.00671	1	-0.0248	0.0217
	<i>E.coli 8739</i>	0.0162	0.00671	0.299	-0.0071	0.0394
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.0075	0.00671	0.944	-0.0157	0.0307
	<i>Pseudomonas</i>	0.0184	0.00671	0.177	-0.0048	0.0417
	<i>Staphylococcus aureus 25922</i>	0.0075	0.00671	0.944	-0.0157	0.0307

Homogeneous Subsets

CRECIMIENTO

Tukey HSD^{a,b}

Microorganismo	N	Subset	
		1	2
<i>Pseudomonas</i>	3	-0.0104	
<i>E.coli 8739</i>	3	-0.0081	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3	0.0006	
<i>Staphylococcus aureus 25922</i>	3	0.0006	
<i>Salmonella</i>	3	0.0081	
<i>E. coli</i>	3	0.0096	
<i>Candida</i>	3	0.0117	
<i>Bacillus cereus</i>	3		0.0456
Sig.		0.069	1

Means groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on type III Sum of Squares
The error term is Mean Square (Error) = .000.

- c. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.
- d. Alpha = 0.05.

PROFILE PLOTS

