



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de un extracto  
de tallo de *Yucca baccata* y su uso potencial como  
conservador en homogenizado de pollo**

Por:

Guadalupe de J. Gutiérrez García

TESIS APROBADA POR LA  
COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

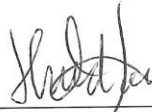
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Guadalupe de Jesús Gutiérrez García, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestría en ciencias.



---

Dr. Luis Quihui Cota  
Director de Tesis



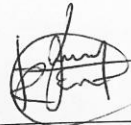
---

Dra. Herlinda Soto Valdez  
Asesora



---

M. en C. Gloria Guadalupe Morales Figueroa  
Asesora



---

Dr. Julián Esparza Romero  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento y la oportunidad brindados para realizar mi Maestría.

Le agradezco además al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) por prestar sus oficinas, aulas y laboratorios para llevar a cabo el proyecto de tesis que aquí desarrollo.

También agradezco al Dr. Luis Quihui Cota por la asesoría brindada durante el periodo del diseño y desarrollo de mi trabajo de tesis.

Le agradezco también a la Dra. Herlinda Soto, por su guía y apoyo para el desarrollo de las distintas metodologías usadas en este trabajo.

A la M. en C. Gloria Guadalupe Morales Figueroa (Lupita), por toda la atención y consejos brindados durante los dos años que convivimos en el laboratorio. Su apoyo moral, académico y de logística fue invaluable.

Al Dr. Julián Esparza, por el tiempo que me dedicó y su asesoría para el análisis de datos de este trabajo.

Al M. en C. Orlando Tortoledo, por su enorme paciencia y gran disposición al ayudarme y permitirme usar algunos equipos del laboratorio en que trabaja.

A la Q. B. Rosalva Pérez Morales por su gran apoyo académico y técnico en el desarrollo de la metodología para determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos usando la difusión por

disco en agar y determinación de la concentración mínima inhibitoria y por microdilución.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por permitirme vivir esta experiencia que si bien no siempre fue feliz, siempre fue muy intensa. Le agradezco por mi familia genética y por mi familia emocional.

A mis padres, por apoyarme siempre y creer en mí. Mamá, gracias por no dejar que me derrumbara en mis días más oscuros, la quiero. Papá, gracias por sus palabras de aliento, lo quiero.

A mis hermanas, por escucharme y sacarme risas cuando más lo necesitaba. Las adoro, tontas.

A mis amigos Diva, Cristina, Tavo, Akemi y Mariela, no tienen idea de lo que los quiero, a pesar de que a veces me estresaran más que esta tesis. Karlita, te quiero muchísimo, gracias por comprenderme y apoyarme siempre, eres de lo que ya no hay. Patty y Manuel, gracias por todas las salidas y las distracciones, pude haber muerto de estrés de no haber sido por ustedes. Los quiero.

A Alex y Carlos, porque las idas al cine y las cantidades industriales de café que bebimos juntos son irremplazables. Son unos frikis y lo saben. Los quiero demasiado.

A Agustín, por ser tan despistado y torpe intencionalmente para que yo pudiera parecer más graciosa. Gracias por ayudarme a estudiar y por tu CASI infinita paciencia. Bendiciones☺.

Finalmente a todas aquellas personas que en menor o mayor medida aportaron algo significativo tanto a esta tesis como a mi formación.

## CONTENIDO

Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xii
Capítulo I. <b>Introducción</b> .....	1
Capítulo II. <b>Antecedentes</b> .....	3
II.1 Pérdidas de Alimentos en el Mundo.....	3
II.1.1 Panorama Actual.....	3
II.1.2 Microorganismos en Alimentos.....	4
II.1.3 Factores Asociados a la Pérdida y Desperdicio de Alimentos.....	5
II.2 Técnicas para la Conservación de Alimentos.....	6
II.2.1 Aditivos en Alimentos.....	6
II.2.2 Métodos de Conservación de la Carne.....	7
II.2.3 Pollo.....	7
II.2.4 Microorganismos Aislados de Carne de Pollo.....	8
II.2.5 Alternativas para la Conservación del Pollo.....	8
II.3 Tecnologías Emergentes para la Conservación de Alimentos.....	9
II.3.1 Envases para Alimentos.....	9
II.3.2 Envases Activos.....	10
II.4 Plantas Medicinales.....	11
II.4.1 Actividad Antimicrobiana de Extractos de Plantas.....	11
II.4.2 Plantas Medicinales en México y Sonora.....	12
II.5 <i>Yucca sp.</i> .....	13
II.5.1 <i>Yucca baccata</i> .....	14
II.5.2 Estudio en Jerbos.....	14
II.5.3 Estudios <i>in vitro</i> .....	15
II.5.4 Saponinas.....	15
II.5.5 Impacto Nutricional del Uso de Saponinas.....	17
Capítulo III. <b>HIPÓTESIS</b> .....	19
Capítulo IV. <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	20
Capítulo V. <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	21
Capítulo VI. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
VI.1 Obtención de Muestras de <i>Yucca baccata</i> y Extracción Butanólica..	22
VI.1.1 Colección de Especímenes de <i>Yucca baccata</i> .....	22
VI.1.2 Método de Secado del Tallo.....	22

## CONTENIDO (continuación)

VI.1.3 Obtención del Extracto del Tallo de <i>Yucca baccata</i> .....	22
VI.2. Fase 1: Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana in vitro de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 frente a los extractos acuoso y butanólico del tallo de <i>Yucca baccata</i> .....	23
VI.2.1. Ensayo cualitativo: Método de difusión en disco de Kirby-Bauer...	23
VI.2.2 Asignación de los Tratamientos.....	24
VI.2.3 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	24
VI.2.4 Ensayo cuantitativo: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo.....	24
VI.3 Fase 2: Prueba del extracto butanólico de <i>Yucca baccata</i> (EBY) en homogenizado de pollo.....	25
VI.3.1 Prueba del EBY al 1% en el Homogenizado de Pollo.....	25
VI.3.2 Cuenta Total Viable de Mesófilos Aerobios.....	26
VI.3.3 Asignación Aleatoria de los Tratamientos.....	26
VI.3.4 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	26
VI.4. Fase 3: Desarrollo de Películas de Polietileno de Baja Densidad (PEBD) con el EBY.....	27
VI.4.1 Prueba de las Películas Adicionadas con el EBY en el homogenizado de pollo.....	27
VI.4.2 Cuenta Total Viable de Mesófilos Aerobios.....	28
VI.4.3 Pruebas de Fusión del EBY.....	28
VI.4.4 Espesor de las Películas con EBY.....	28
VI.4.5 Colorimetría de las Películas con EBY.....	28
VI.7 Asignación Aleatoria de los Tratamientos.....	29
VI.8 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	29
Capítulo VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
VII.1 Rendimiento de la Extracción del Tallo de <i>Yucca baccata</i> con n-butanol.....	30
VII.2 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Butanólico..	30
VII.2.1. Método de Difusión por Discos.....	30
V.II.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	33
VII.3 Prueba del Extracto en el Homogenizado de Pollo.....	35
VII.4 Prueba de los Envases Activos con EBY.....	37
VII.4.1 Punto de Fusión del EBY.....	41
VII.4.2 Espesor de los envases fabricados con EBY y PEBD.....	41
VII.4.3 Transmisión de Oxígeno en los Envases.....	41
VII.4.4. Propiedades colorimétricas del envase control y los envases	

con 5 y 10% de EBY.....	42
Capítulo <b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	45
Capítulo <b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46

### LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Figura 1. Homogenizado de pollo (pechuga) y extracto butanólico añadido y listo para su almacenamiento en refrigeración (4°C ± 1).....	35
2	Figura 2. Proliferación microbiana en el homogenizado de pollo control (0%) y con el extracto de <i>Y. baccata</i> (1%) durante el periodo de refrigeración (4°C/10 días).....	36
3	Figura 3. Envases activos con EBY conteniendo aproximadamente 11g de homogenizado de pechuga de pollo.....	37
4	Figura 4. Gráfica de porcentajes de inhibición de los envases activos en homogenizado de pollo comparados con el control.....	40



## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Tabla 1. Sensibilidad antibacteriana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a los extractos butanólico y acuoso del tallo de <i>Yucca baccata</i> por la técnica de difusión por discos.....	32
2	Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto butanólico del tallo de <i>Yucca baccata</i> para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	34
3	Tabla 3. Unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) y porcentajes de inhibición del envase control y los envases con 5% y 10% añadido de extracto butanólico del tallo de <i>Yucca baccata</i> .....	39
4	Tabla 4. Parámetros de color de los envases.....	43

## RESUMEN

La proliferación microbiana en alimentos tiene gran impacto negativo en el sector salud y en la industria a nivel mundial. Las causas de las pérdidas y el desperdicio de alimentos están relacionados principalmente con limitaciones económicas, deficiencias de infraestructura y almacenamiento, los sistemas de comercialización involucrados y en gran parte por las condiciones de envasado y conservación de los alimentos. El presente proyecto surge del creciente interés en el desarrollo de conservadores naturales efectivos y seguros para alimentos. El objetivo del trabajo fue evaluar el uso de un extracto con actividad antimicrobiana del tallo de *Yucca baccata* como componente activo en un envase para conservación de homogenizado de pollo. La extracción se realizó con agua (extracto acuoso) y con n-butanol (extracto butanólico), el cual fue posteriormente evaporado para obtener el extracto en polvo. El rendimiento del extracto butanólico fue de 6.76 g/100 g de polvo del tallo de *Yucca baccata* (6.7%) y del extracto acuoso fue de 24.69 g/100 g de tallo empleado (24.6%). La evaluación cualitativa de actividad antibacteriana de ambos extractos frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 usando el método de difusión por disco demostró mayor sensibilidad frente al extracto butanólico. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) usando el método de microdilución en caldo, siendo 37.5 mg/mL para *P. aeruginosa*. Para probar los resultados obtenidos *in vitro*, se añadió el 1% en peso del extracto a un homogenizado de pechuga de pollo y se almacenó en refrigeración durante 10 días ( $4^{\circ}\text{C}\pm 1$ ), realizando una cuenta total viable de mesófilos en placa cada 2 días, tanto al homogenizado con el extracto como a un control (0% de extracto). Se encontró que la adición del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* al 1% en peso,

disminuye 91.9% la proliferación microbiana. Se desarrollaron y probaron tres envases de polietileno de baja densidad

aditivados con 0, 5 y 10 % de extracto butanólico como bolsas. El homogenizado de pechuga de pollo fue envasado en las bolsas y se obtuvo un efecto positivo en la disminución del crecimiento de mesófilos aerobios ( $P < 0.05$ ) durante 10 días de almacenamiento a 4°C.

**Palabras clave:** Extracto butanólico, extracto acuoso, antibacteriano, conservador, *Yucca baccata*, pollo.

## ABSTRACT

Microbial growth in food has great negative impact on the health sector and industry worldwide. The causes of losses and food waste are mainly related to economic constraints, poor infrastructure and storage, marketing systems involved and largely by the conditions of packaging and food preservation. This project arises from the increasing interest in the development of effective and safe natural food preservatives. The objective was to evaluate the use of an extract with antimicrobial activity from the stem of *Yucca baccata* as active component in a packaging to preserve homogenized chicken. The extractions were performed with water (aqueous extract) and n-butanol (butanolic extract), which was subsequently evaporated to give a powdered extract. The butanolic extract yield was 6.76 g/100g of *Y. baccata*'s stem in a dry basis (6.7%) and the aqueous extract was 8.15 g per 33 g of stem employee (24.6%). The qualitative evaluation of antibacterial activity of both extracts against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 using the disk diffusion method showed that *P. aeruginosa* was more sensitive to butanolic extract. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth microdilution method, being 37.5 mg/mL) for *P. aeruginosa*. The effect of the butanolic extract on the growth of mesophilic bacteria in a homogenized chicken breast stored for 10 days at 4°C was tested. It was found that the addition of 1% w/w of the butanolic extract decreased 91.9% the mesophilic bacteria compared with a control without extract: the homogenized chicken with extract and a control (0% of extract). It was found that adding the stem butanolic extract of

*Yucca baccata* at the concentration tested (1% per weight), the microbial growth decreases about 91.9%. Three films made of low density polyethylene added with 0, 5 and 10% of the butanolic extract were processed as pouches. Homogenized chicken breast was packed in the pouches and a positive effect on the decrease of aerobic mesophilic growth ( $P < 0.05$ ) was obtained during storage for 10 days at 4°C.

**Keywords:** Butanolic extract, aqueous extract, antibacterial, preservative, *Yucca baccata*, chicken.

## I. INTRODUCCIÓN

La proliferación microbiana en alimentos tiene un gran impacto negativo en la salud del hombre y en la disponibilidad de los mismos a nivel mundial, contribuyendo principalmente a sus pérdidas. Por ello, las actividades y estrategias encaminadas a asegurar la inocuidad de alimentos deben considerarse desde la selección, procesamiento, técnicas de conservación y consumo (Juneja et al., 2012).

Una de las alternativas actuales para reducir la pérdida de alimentos es el uso de envases y tecnologías de conservación de alimentos para prologar la vida útil de éstos y puedan así cumplir con el objetivo de ser consumidos (Gustavsson, 2014).

Las pérdidas y el desperdicio de alimentos también provocan un importante derroche de recursos como agua, tierra, energía, mano de obra y capital, además de producir emisiones de gases de efecto invernadero innecesarias, contribuyendo así al calentamiento global y al cambio climático. Con los alimentos que actualmente se pierden o desperdician en América Latina se podría alimentar a 300 millones de personas (FAO, 2011).

La tendencia en métodos de conservación sugiere el uso conjunto de un método de barrera (envase) y un agente antimicrobiano para asegurar la inocuidad del alimento y alargar su vida de anaquel mediante el retraso o inhibición de la proliferación microbiana (Diez et al., 2009). Como fuente del antimicrobiano, es válido considerar plantas de las cuales se haya reportado que partes o extractos de la misma poseen dicha actividad, como es el caso de la planta nativa del norte de México: *Yucca baccata* (Quihui-Cota et al., 2012).

El presente proyecto surge del creciente interés en el desarrollo de conservadores naturales que sean efectivos y seguros para alimentos. El objetivo del trabajo fue evaluar el uso de un extracto con actividad antimicrobiana proveniente del tallo de *Yucca baccata* como conservador natural en homogenizado de pollo.



## **II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

### **II.1 Pérdidas de Alimentos en el Mundo**

Las pérdidas de alimentos son definidas por la FAO (2011) como: “disminución de la masa alimentaria comestible disponible”. Esto hace referencia a productos que inicialmente fueron procesados con el fin de satisfacer la necesidad alimenticia humana, pero no llegaron a ser consumidos debido a diversas causas, entre ellas el desperdicio y el desecho por alteraciones en los mismos.

El desperdicio de alimentos se refiere al desecho de éstos cuando aún son aptos para consumo. Esto ocurre principalmente en comercios y hogares de países industrializados, mientras que en países en desarrollo las pérdidas debido a diversos factores ocurren en las etapas tempranas de procesamiento y recolección (Bizarri, 2012).

#### **II.1.1 Panorama Actual**

En el mundo, 842 millones de personas padecen algún tipo de desnutrición, mientras que a la misma escala se desperdician aproximadamente 1, 300 millones de toneladas de alimentos por año. De ese total, 100 millones corresponden a América Latina y 10,4 millones de toneladas le corresponden a México (FAO, 2011). Aunque un incremento en la inversión para la producción de alimentos podría generar una mayor cantidad de alimentos disponibles, esto generaría el consumo de una gran cantidad de recursos tanto renovables como no renovables, por lo que esta problemática debe ser abordada desde otra perspectiva.

La pérdida y el desperdicio de alimentos se deben principalmente a limitaciones en cuanto a técnicas de almacenamiento, de conservación y de

aprovechamiento de los mismos (SEDESOL, 2013). La demanda actual de alimentos inocuos y de buena calidad, ha llevado a una reestructuración de la normativa alimentaria, desde la selección y procesamiento, hasta los métodos de conservación (Juneja et al., 2012).

Las pérdidas y el desperdicio de alimentos también provocan un importante derroche de recursos como agua, tierra, energía, mano de obra y capital y producen emisiones de gases de efecto invernadero innecesarias, contribuyendo así al calentamiento global y al cambio climático. Con los alimentos que actualmente se pierden o desperdician en América Latina, se podría alimentar a 300 millones de personas (FAO, 2011).

### **II.1.2 Microorganismos en Alimentos**

Los patógenos en los alimentos son una de las causas principales de enfermedades gastrointestinales y muerte a nivel mundial, con una cifra de aproximadamente 1.8 millones de muertes por año (OMS, 2009). Debido a la evolución de estos patógenos y la generación de resistencia a antibióticos que presentan, cada año aumenta la cantidad de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Bajpai y Chul-Kang, 2011).

Existe una gran cantidad de especies de microorganismos que contaminan los alimentos, además de aquellos capaces de producir metabolitos que resultan tóxicos peligrosos, como en el caso de las enterotoxinas producidas por *Escherichia coli* (Hernández et al., 2001). Otros microorganismos relacionados con problemas gastrointestinales asociados al consumo de alimentos contaminados son *Salmonella*, *Streptococcus*, *Yersinia*, *Clostridium* y *Staphylococcus* (Lee et al., 2011; Hae-Kyong et al., 2014).

La mayoría de los seres humanos no se ven afectados significativamente por la presencia de bacterias a dosis bajas, pero para las personas con el sistema inmunológico débil o durante el embarazo, ésta puede resultar altamente perjudicial para su salud (Lee et al., 2011).

Aunque es preocupante la proliferación microbiana en alimentos desde el punto de vista de la salud (OMS, 2014), lo es de igual manera desde el punto

de vista económico y de seguridad alimentaria, debido a las pérdidas y desecho de éstos por contaminación y/o putrefacción. Las anteriores son la razones principales de la creciente demanda de métodos de conservación de alimentos que impidan o reduzcan significativamente la proliferación microbiana (Bajpai y Chul-Kang., 2011).

### **II.1.3 Factores Asociados a la Pérdida y Desperdicio de Alimentos**

Las causas de las pérdidas y el desperdicio de alimentos están relacionadas principalmente con limitaciones económicas, deficiencias de infraestructura y almacenamiento, por los sistemas de comercialización involucrados y en gran parte por las condiciones de envasado y conservación de éstos. El transporte y distribución juegan un papel importante, ya que si estos ocurren por periodos prolongados de tiempo, éstos consumen parte de la vida útil del alimento en vez de estar disponible para consumo (Bizarri, 2012).

En el comercio minorista se desperdician grandes cantidades de alimentos debido a estándares de calidad que sobrevaloran la apariencia, resultando en hábitos de compra y/o consumo deficientes (FAO, 2015).

El incumplimiento de las normas nacionales e internacionales de calidad e inocuidad de alimentos vigentes puede llevar al descarte de alimentos desde la recolección de la materia prima hasta la disposición final en los hogares de los consumidores (Fonseca, 2014). La inocuidad de los alimentos se ve comprometida por factores microbiológicos, ambientales, falta de higiene durante la manipulación, condiciones de almacenamiento y las técnicas de conservación empleadas (Bizarri, 2012).

Para prevenir la contaminación de los alimentos a nivel industrial, se emplean herramientas como el Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés) en conjunto con normativas de calidad para asegurar la inocuidad e integridad del producto final (FDA, 2014).

Una posible alternativa para disminuir las pérdidas y desperdicio de alimentos es encontrar una disposición final alternativa para los productos ya

descartados, ya que en algunas ocasiones, es probable obtener un beneficio del alimento en vez de desecharlo.

## II.2 Técnicas para la Conservación de Alimentos

La conservación de alimentos se refiere básicamente a la aplicación de técnicas que aseguren la inocuidad y alarguen la vida útil de los alimentos, manteniendo sus propiedades y calidad en un estado aceptable (Diez et al., 2009)

Emplear técnicas de conservación de alimentos que no son efectivas genera gastos en diversas áreas, como la utilización de recursos naturales, energía e insumos en alimentos que no tendrán un periodo de vida útil lo suficientemente largo para llegar a ser consumidos (FAO, 2015). La técnica o método de conservación a emplear dependerá del alimento del que se trate, la infraestructura implicada en el procesamiento de éste y el destino final del alimento.

### II.2.1 Aditivos en Alimentos

La población está tomando conciencia sobre el riesgo de consumir los conservadores químicos de los alimentos, por lo que es necesario el uso de aditivos más seguros (Lee et al., 2011). Los métodos de conservación pueden combinarse para potenciar su actividad de proteger la calidad e inocuidad de los alimentos de una manera más efectiva. Por ejemplo, un antimicrobiano natural puede usarse con otro método de conservación como la radiación con rayos X o gamma, para disminuir la proliferación microbiana y/o inactivar a los microorganismos ya presentes en el alimento (Juneja et al., 2012).

Se han realizado estudios para buscar conservadores de alimentos alternativos en respuesta a la demanda de la población acerca de emplear aditivos alimentarios seguros. Éstos pueden ser de origen natural y que a su vez sean capaces de retardar o inhibir el crecimiento de patógenos, alargar la vida de anaquel y conservar la calidad de los alimentos (Xhimai, 2011).

Los conservadores pueden añadirse al alimento, a la envoltura, como recubrimiento de la superficie o en el ambiente donde se desarrolla el

procesamiento de éste para inhibir o inactivar la proliferación de microorganismos que puedan entrar en contacto con la matriz de interés (Michael et al., 2013).

## **II.2.2 Métodos de Conservación de la Carne**

Un alimento importante en la dieta de gran parte de la población es la carne. Su importancia radica en el alto contenido de proteínas y aminoácidos esenciales comparados con otros alimentos, como algunos de origen vegetal. También es rica en vitamina B12 y hierro (Carvajal, 2001).

La proliferación microbiana es uno de los principales agentes deteriorantes de la carne, siendo las *Pseudomonas*, *enterobacteriaceae* y bacterias ácido lácticas las responsables de estos cambios (Verónike, 2008), los cuales traen como consecuencia la pérdida del alimento y su desecho.

El desperdicio de la carne se da principalmente antes del consumo en los hogares, lo que asciende aproximadamente al 50% de las pérdidas totales de este tipo de alimentos, siendo atribuido principalmente a cambios en las propiedades organolépticas asociado a la poca vida de anaquel que los métodos normalmente empleados para su conservación le confieren (Gustavsson, 2014).

Los conservadores químicos empleados normalmente en carne son nitritos, nitratos, benzoato de sodio y otros aditivos que son precursores de cáncer al asociarse con diversos compuestos que pueden encontrarse en la dieta (Antón, 2014). Esta es una de las grandes preocupaciones de los consumidores y de la industria de alimentos, por lo que en la última década se han impulsado investigaciones para el desarrollo de conservadores de alimentos de origen natural, que sean seguros para consumo humano.

## **II.2.3 Pollo**

El pollo es una importante fuente de proteína en la dieta humana, tanto por su relativamente fácil acceso económico como también por el hecho de que su

consumo es aceptado por la mayoría de las culturas y religiones del planeta (Fenavi, 2014).

Los métodos comúnmente empleados para la conservación de esta carne son: conservación por frío (refrigeración y congelación) y uso de aditivos en productos transformados. Los más utilizados son la refrigeración y congelación. Sin embargo, una de las desventajas de estos métodos es que inactivan a ciertos microorganismos, pero no los eliminan (Castañeda et al., 2013). Por lo que es necesario buscar alternativas para la conservación de éste alimento.

#### **II.2.4 Microorganismos Aislados de Carne de Pollo**

Los microorganismos aislados más comúnmente de la carne de pollo son *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* (Castañeda et al., 2013).

La refrigeración y la congelación son los métodos más empleados para la conservación del pollo (Castañeda et al., 2013). Sin embargo, incluso en condiciones de refrigeración, los microorganismos psicrófilos (capaces de desarrollarse a temperaturas de -5 a +5°C) como los pertenecientes al género *Pseudomonas*, son capaces de proliferar y contribuir al deterioro del pollo (Jiménez et al., 1997; Dainty, 1992). Por lo tanto, debe buscarse un método de conservación más efectivo para este alimento y en especial que sea capaz de controlar la proliferación de estos microorganismos.

#### **II.2.5 Alternativas para la Conservación del Pollo**

Debido a que los métodos de conservación de la carne de pollo no son tan efectivos, se han estado realizando investigaciones para encontrar métodos alternativos para la conservación de esta carne, como el realizado por Chouliara et al. (2007), en el cual se evaluó el efecto combinado de aceite esencial de orégano y el uso de un envase con atmósfera modificada para la extensión de vida útil de carne de pechuga de pollo fresca almacenada a 4°C. En este estudio se prolongó la vida de anaquel de la carne hasta 6 días, pero el

ingrediente activo del envase le impartió propiedades organolépticas que no fueron aceptadas al realizar la evaluación sensorial.

Otro estudio fue realizado por Economou et al., (2009), en el cual se evaluó el efecto de los tratamientos de nisina y EDTA (ácido etilendiaminotetracético) sobre la vida en almacenamiento de la carne de pollo fresco envasado en atmósfera modificada y almacenado en refrigeración a 4 ° C. La carne de pollo fue sometida a distintas combinaciones de tratamientos antimicrobianos, resultando más efectivo el tratamiento con la relación 1500 UI / g-50 EDTA, manteniendo olor y propiedades aceptables incluso hasta por 14 días de almacenamiento.

La tendencia de los estudios se orienta hacia la combinación de métodos y tecnologías para alargar la vida útil de este alimento, y si bien se ha demostrado efectividad en cuanto al aumento de la vida de anaquel, se debe considerar que éstos no deben comprometer las propiedades organolépticas y de calidad del alimento, como en el caso del primer estudio.

### II.3 Tecnologías Emergentes para la Conservación de Alimentos

Se realizan grandes esfuerzos por identificar y controlar los diversos factores que disminuyen o favorecen la inocuidad y calidad de los alimentos. Según la FAO (2015), las preferencias y demandas del consumidor se dirigen hacia el desarrollo de productos “frescos y naturales” (sin químicos añadidos), de alto valor nutricional y con poco o nulo tratamiento tecnológico.

La respuesta de la industria debe adaptarse para satisfacer dichas exigencias y por otro lado al desarrollo del mercado, lo que implica mayores distancias y tiempos de distribución. Todo esto se refleja en los esfuerzos por aumentar la vida útil de los alimentos envasados.

#### II.3.1 Envases para Alimentos

Si la etapa de envasado del alimento se lleva a cabo con éxito, y tanto el envase como las condiciones de almacenamiento son las adecuadas para el

producto, se puede reducir en gran medida la pérdida de alimentos. El impacto que tiene el envase sobre el alimento se refleja a lo largo de la vida de anaquel del producto (Olsmats y Wallteg, 2009).

Mediante el uso de envases en alimentos, es posible prevenir pérdidas de alimentos al garantizar la inocuidad y procurar la estabilidad y larga vida de anaquel de los alimentos, haciendo posible que éstos experimenten periodos de distribución y comercialización más prolongados (Manalili, 2011).

Desde el punto de vista ecológico, podría no ser muy recomendable el uso de envases en alimentos, sin embargo, si con esto se reducen las pérdidas de los productos y se contribuye a aumentar la disponibilidad de alimentos inocuos para la población, es necesario buscar alternativas que hagan posible su uso. Una de ellas puede ser la fabricación de envases biodegradables, además del reciclaje.

### **II.3.2 Envases Activos**

Los envases activos surgen como una combinación de métodos para alargar la vida de anaquel de los alimentos, garantizando así la inocuidad de los mismos y la preservación de las propiedades deseables por el consumidor. Este tipo de envasado es recomendable para impedir o retrasar el efecto de factores que alteren las propiedades sensoriales, nutritivas y de higiene del alimento cuando los métodos tradicionales son ineficaces (Diez et al., 2009)

Mientras que un envase convencional sólo tiene la función de actuar como barrera física, microbiológica y mecánica, el envase activo ejerce un efecto sobre el alimento mediante la modificación de la atmósfera interior o con la liberación o absorción de sustancias, gases, vapores y otros componentes que interactúan con el alimento (Gómez et al., 2009).

Algunos ejemplos de las funciones o beneficios de los envases activos empleados para el control del deterioro y calidad de los alimentos son: regulación de la humedad, liberación de agentes activos que pueden ser de tipo antioxidante o antimicrobiano, regulación del nivel de gases en el interior,



prevención de aparición de colores indeseables y control de la proliferación microbiana (Rooney, 1995).

En el trabajo presentado por Diez y colaboradores (2009), se hace énfasis en la tendencia del uso de envases activos con agentes antimicrobianos, ya que la proliferación de microorganismos en el alimento es la principal causa del deterioro de éstos. Los agentes antimicrobianos pueden provenir de diversas fuentes, y desde hace varios años se estudian con gran interés los provenientes de plantas.

## II.4 Plantas Medicinales

Desde la antigüedad, el ser humano ha empleado fuentes naturales como remedio para afecciones de distintos tipos. Comparado con la cantidad de especies conocidas de plantas, son muy pocas las que se han analizado a nivel fitoquímico para conocer su composición, y son aún menos las que han demostrado ser de interés sanitario o farmacéutico por su actividad biológica (Satish y Mahesh, 2008).

A las sustancias de interés biológico contenidas en las plantas medicinales se les conoce como metabolitos secundarios, y existen más de 30,000 identificados en la actualidad. Estos metabolitos son capaces de inhibir patógenos y proteger al organismo de los radicales libres (Satish et al., 2014).

Existen plantas medicinales de las cuales se toman extractos que presentan agentes con actividad antimicrobiana, siendo las partes más empleadas la raíz, hojas, flores y frutos (Satish y Mahesh, 2008). Se ha confirmado la presencia de compuestos antimicrobianos en extractos provenientes de diversas plantas, los cuales podrían ser empleados para inhibir o disminuir la proliferación de microorganismos en diversas matrices (Juneja et al., 2012).

### II.4.1 Actividad Antimicrobiana de Extractos de Plantas

Es importante conocer las concentraciones a las cuales los metabolitos son eficaces en el desempeño de su actividad biológica sin presentar riesgo para la salud. Para esto se realizan diversos estudios, en base a los cuales se determinan las dosis más viables y seguras para ser usadas (Jie-Lun et al., 2012). Dependiendo del tipo de ensayo que vaya a realizarse, son las exigencias en cuanto a las pruebas que deben hacerse. Las pruebas básicas que se realizan son: concentración mínima inhibitoria, concentración bactericida mínima, ensayos de viabilidad celular y sensibilidad antimicrobiana. Para estos ensayos, es recomendable purificar los extractos, para observar el efecto real ejercido por el compuesto de interés y no el de otros constituyentes del extracto (Saqib et al., 2014; Saravana et al., 2014).

La concentración mínima inhibitoria se refiere a la cantidad mínima de un antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo. La concentración mínima bactericida es la mínima concentración de un antimicrobiano que puede eliminar a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (Susumu et al., 2003).

Es de gran importancia medir ambas concentraciones para conocer el poder del antimicrobiano del metabolito de interés, porque a partir de estos valores, pueden establecerse las cantidades de dosis a evaluar dependiendo del efecto antimicrobiano deseado y el organismo a quien va a administrarse (Jie-Lun et al., 2011).

#### **II.4.2 Plantas Medicinales en México y Sonora**

México es un país con gran diversidad en su flora, en el que cultural y tradicionalmente se usan plantas medicinales para el tratamiento de dolencias y enfermedades. Algunas de estas plantas han despertado un gran interés en el área de la investigación, debido a la actividad biológica observada de sus constituyentes. Incluso con las aplicaciones medicinales, son pocas las plantas empleadas en estudios para identificar a los metabolitos responsables de los efectos benéficos (Rojas y Avellaneda, 2009).

Se han realizado muchos estudios enfocados en medir el poder antimicrobiano de extractos provenientes de plantas medicinales (García y Castellanos, 2011). Uno de los objetivos de ese tipo de investigaciones es el uso de éstos como conservadores de alimentos, lo cual podría ayudar a evitar procesamientos físicos costosos y complicados que, en muchas ocasiones, alteran las propiedades organolépticas de los alimentos.

En la India, por ejemplo, se utiliza una gran variedad de especias como conservadores de alimentos, por lo que se han realizado investigaciones en las que se demuestra su poder para inhibir patógenos (Kakur et al., 2007). La actividad biológica de los antimicrobianos se ve influenciada por los factores del medio donde se encuentren. Al añadirlo a un alimento como conservador, su actividad antimicrobiana se vería afectada por las proteínas, carbohidratos, lípidos y sales presentes en la matriz (Juneja et al., 2012).

Para que un antimicrobiano sea candidato para ser usado como conservador de alimentos, debe ser efectivo a bajas concentraciones, no producir modificaciones en las propiedades organolépticas del alimento y no ser tóxico. Los agentes antimicrobianos ejercen su efecto mediante diversos mecanismos, desde estimular la lisis de la membrana celular, hasta la quelación de una gran cantidad de nutrientes (Michael et al., 2013).

Es importante realizar investigaciones acerca de los mecanismos mediante los cuales los metabolitos provenientes de las plantas ejercen su actividad biológica como antimicrobianos. De esta manera, podrían idearse métodos para aprovechar estas propiedades en el área farmacéutica y en la tecnología de alimentos, como métodos de conservación.

## II.5 *Yucca* sp.

Las plantas pertenecientes al género *Yucca* son aproximadamente 40 especies, las cuales habitan en el sur de Estados Unidos, en el norte de México y en Centroamérica. Son xerófitas. La *Yucca* es una planta perenne, suculenta, arbustiva y de hojas ascendentes. Su fruto puede ser carnoso o seco, siendo

consumido de diversas formas por los pueblos indígenas (Guillot D. y Van der Meer, 2009).

Desde la antigüedad, las plantas pertenecientes a este género han sido usadas de forma artesanal para la fabricación de hilo, como parte de ceremonias indígenas y como ingrediente para la fabricación de jabones a partir de sus raíces. Más recientemente se han investigado extractos de estas plantas y se les han atribuido propiedades farmacológicas y surfactantes de interés para diferentes sectores industriales (Eggli, 2001).

### **II.5.1 *Yucca baccata***

Dentro de la familia de las *agavaceae* se encuentra *Yucca baccata*, la cual es una planta nativa del sur de Estados Unidos y del norte de México, donde en Sonora se encuentra formando parte de la flora del desierto (León, 2012). Desde 1930 se utilizaba el jugo de esta planta como conservador de alimentos de forma artesanal (Groen, 2014).

La palabra *baccata* significa "fructificaron", haciendo referencia a los grandes frutos de la planta. Estas plantas florecen una vez por año entre abril y mayo, aproximadamente (Smith, 2004).

### **II.5.2 Estudio en Jerbos**

En el estudio realizado por Quihui-Cota et al., (2014) se encontró que un extracto proveniente del tallo de *Yucca baccata* tiene actividad antiparasitaria. Este extracto se encuentra constituido por alcaloides, saponinas y demás compuestos involucrados con actividad antimicrobiana. La presencia de saponinas se ha relacionado con propiedades antiinflamatorias, diuréticas y antimicrobianas (Rojas y Avellaneda 2009).

La sensibilidad de inhibición que presenten los microorganismos ante los extractos antimicrobianos dependerá, en cada caso, del contenido y tipo de componentes del extracto. La capacidad antimicrobiana varía dependiendo de la planta usada, parte de la misma, método de procesamiento y presentación final del producto (polvo o líquido) (McMurphy et al., 2014a).

### **II.5.3 Estudios *in vitro***

En un trabajo de Pereo (2015) se demostró que los extractos acuoso y butanólico provenientes del tallo de *Yucca baccata* son ricos en saponinas y poseen actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos para el ser humano (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Se encontró que la concentración de saponinas en el extracto butanólico fue de 23.9%, y en el extracto acuoso de 17.1%, con aproximadamente 8 fracciones de saponinas esteroidales en cada uno.

El poder inhibitorio que ejercen las saponinas frente a los microorganismos, se ve influenciado por la presencia de otros compuestos en el extracto. Esto se debe a las interacciones que se generan entre los metabolitos, las cuales pueden aumentar o disminuir la capacidad antimicrobiana de las saponinas (Bahramineja et al., 2008).

### **II.5.4 Saponinas**

Las saponinas son compuestos que constituyen parte de las defensas naturales de las plantas (Apablaza et al., 2002). El contenido de saponinas en un sistema biológico, puede relacionarse con propiedades antiinflamatorias, diuréticas y antimicrobianas (Rojas y Avellaneda, 2009). Son sustancias de sabor amargo localizadas principalmente en el epispermo de granos, en tallos y otras partes de plantas como la quinoa o la yuca (Lozano et al., 2012). Debido a sus características fisicoquímicas, las saponinas pueden utilizarse para la preparación de emulsiones, cosméticos y bebidas (Apablaza et al., 2002).

El efecto biológico de las saponinas, se atribuye a la sapogenina, que es el núcleo de aglicona esteroideal. El mecanismo de la actividad antimicrobiana de las saponinas no se ha logrado descifrar por completo. Sin embargo, existen mecanismos propuestos como el de la lisis celular, debido a su estructura química que es capaz de interactuar con los lípidos de la membrana, creando poros (Jie-Lun et al., 2012 y Pereo, 2015). Las bacterias Gram positivas, aparentemente, son inhibidas eficazmente mientras que las Gram negativas son

poco afectadas. Así mismo, el mecanismo para inhibir bacterias, es diferente del usado para inhibir hongos (Wang et al., 2000).

Para lograr discernir el efecto particular que ejercen las saponinas, es necesario purificar los extractos antes de ser usados en un estudio. Esto es debido a que contienen una amplia variedad de compuestos que pueden tener efectos modificadores, tales como alcaloides, taninos, terpenoides y azúcares reductores, entre otros (Sagib et al., 2014).

En el área de la salud, las saponinas presentan actividad antihipertensiva, la cual ha comenzado a estudiarse a profundidad en ratas hipertensas (Chen et al., 2013). Otra característica que atrae gran interés sobre las saponinas, es que presenta citotoxicidad frente a células cancerígenas, por inhibición del crecimiento del tumor ya que promueve la apoptosis de este tipo de células malignas (Zhou et al., 2014). También se han realizado estudios donde se demuestra que existen tipos de saponinas que son capaces de suprimir el crecimiento de células tumorales de cáncer en los ovarios humanos (Xue et al., 2014).

Se considera necesario realizar ensayos de viabilidad celular ya que se sabe que las saponinas presentan citotoxicidad a concentraciones muy variadas, dependiendo del origen, concentración y composición del extracto a evaluar. Los ensayos de viabilidad son de inmensa importancia, ya que cambios mínimos en la estructura de las saponinas, como en el acomodo de un grupo hidroxilo, puede variar enormemente la citotoxicidad presentada (Fouedjou, 2014).

Debido a las propiedades benéficas para la salud que ejercen las saponinas, se han realizado ensayos de viabilidad en aquellas células que tienen gran versatilidad en cuanto a su manipulación clínica y farmacológica. Un ejemplo de lo anterior es la línea PC 12 cells, de las cuales se tiene una gran cantidad de información acerca de su diferenciación y proliferación. Las saponinas han sido probadas sobre esta línea celular, para obtener información de su efecto protector sobre células implicadas en enfermedades o daño cerebral ocasionado por anoxia (Xin-Fu et al., 2012).

También se han realizado estudios de viabilidad celular empleando macrófagos de ratón RAW 264.7, ya que existen estudios que reportan que las saponinas pueden inhibir, debido a su citotoxicidad, el crecimiento de macrófagos y células sanas. En el estudio realizado por Jie-Lun et al., (2012) usaron esas células derivadas a partir de un tumor inducido. Ésta es una línea celular que se encuentra presente en casi todos los tejidos de los ratones. Además es un buen blanco para estudiar la toxicidad potencial de las saponinas en células de mamíferos, antes de realizar pruebas en humanos.

La actividad antimicrobiana de las saponinas depende de la aglicona y los azúcares unidos a ésta. Uno de los mecanismos de acción propuestos para el efecto inhibitorio de las saponinas es que debido a su capacidad surfactante, es capaz de interactuar con los lípidos de las membranas celulares (colesterol en las eucariotas), volviéndola porosa y provocando la lisis celular. Para el caso de las procariotas, como las bacterias Gram negativas, el mecanismo de acción propuesto es la interacción de las saponinas con los lípidos que se encuentran presentes en la pared celular, formando parte de los lipopolisacáridos. Estas interacciones lípido-saponina ocasionan la lisis celular (Arabski, 2012).

### **II.5.5 Impacto Nutricional del Uso de Saponinas**

Debido a su actividad surfactante, las saponinas influyen en la absorción de lípidos por su capacidad de formar micelas a partir de las sales biliares segregadas durante el proceso digestivo y el colesterol (Cheeke, 2000). McMurphy y colaboradores (2014a) realizaron un estudio en el cual se demuestra que la adición de saponinas en la dieta de novillos, mejora la eficiencia del proceso de digestión de heno de baja calidad. En este proceso, no sólo ayuda a disminuir la carga microbiana del rumen, sino a mejorar la conservación de nitrógeno y a disminuir la producción de metano. No se sabe exactamente si estos efectos se deben exclusivamente a la reducción de la concentración de protozoarios o a una función no identificada del extracto de *Yucca* comercial empleado por sí mismo.

Los estudios existentes sobre el impacto nutricional de las saponinas al incluirlas en la dieta de animales han encontrado que el incluirlas en dosis específicas, aumenta la actividad ruminal amilolítica y la digestión del almidón (Wang, et al., 2000). Todos los efectos producidos por las saponinas a nivel digestivo en este tipo de estudios, es atribuido principalmente a su capacidad para reducir la población de protozoarios (McMurphy et al., 2014b).

Debido al creciente interés en el aprovechamiento de las características enlistadas anteriormente de las saponinas y de extractos que las contienen, se han realizado investigaciones y actualmente las fuentes comerciales principales de éstas son *Yucca schidigera* y *Quillaja saponaria* (Pereo, 2015).

Algunas de las investigaciones más recientes emplean extractos ricos en saponinas para probar la actividad antimicrobiana de éstos teniendo como fuente vegetal *Yucca baccata*, de la cual se describieron previamente los hallazgos obtenidos (Quihui-Cota et al., 2014 y Pereo, 2015), los cuales la convierten en una fuente de interés para la obtención de estos metabolitos secundarios.



### III. HIPÓTESIS

Fase 1. De los extractos obtenidos del tallo de *Yucca baccata*, el butanólico posee mayor poder inhibitorio para *Pseudomonas aeruginosa* que el acuoso.

Fase 2. El extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* adicionado directamente en homogenizado de pollo es capaz de disminuir el crecimiento de mesófilos aerobios.

Fase 3. La adición del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* a un envase fabricado con polietileno de baja densidad tiene actividad antimicrobiana capaz de disminuir el crecimiento de mesófilos aerobios en homogenizado de pollo.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antimicrobiana de un extracto del tallo de *Yucca baccata* frente a *Pseudomonas aeruginosa* y su efecto en la disminución de mesófilos aerobios durante la conservación de homogenizado de pollo aplicado directamente sobre éste y formando parte de un envase.

## V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto del tallo de *Yucca baccata* para *Pseudomonas aeruginosa*.

Determinar una concentración efectiva de un extracto del tallo de *Yucca baccata* aplicado directamente en homogenizado de pollo para disminuir el crecimiento de microorganismos.

Desarrollar un material de envase con una concentración efectiva del extracto de *Yucca baccata* para disminuir el crecimiento de microorganismos en homogenizado de pollo.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### VI.1 Obtención de Muestras de *Yucca baccata* y Extracción Butanólica

#### **VI.1.1 Colección de Especímenes de *Yucca baccata***

El material vegetal (los tallos de la planta *Yucca baccata*) fue colectado próximo a las coordenadas 30°53'35.8"N 110°42'30.0"O, en Abril del 2013. Se separó el tallo del resto de la planta desde la parte más cercana a la raíz y las hojas fueron removidas. Las muestras se transportaron al herbario de la Universidad de Sonora para su posterior autenticación taxonómica por el responsable del Herbario Universitario.

#### **VI.1.2 Método de Secado del Tallo**

El tallo fue cortado en rodajas de 2 cm aproximadamente, facilitando y disminuyendo el tiempo de secado, el cual se realizó por exposición al sol. Posteriormente, el material seco se pulverizó utilizando un molino Wiley (Molino Thomas-Wiley Model 4, Laboratory Mill USA) hasta que se obtuvo un polvo con un tamaño de partícula aproximado de 2 mm, el cual fue pesado y utilizado para la preparación de los extractos (León, 2012).

#### **VI.1.3 Obtención del Extracto del Tallo de *Yucca baccata***

Para la obtención del extracto del tallo de *Yucca baccata* se utilizó el método descrito por Newbold (1997) y modificado por León (2012). Primero se suspendió el polvo del tallo en agua destilada a una concentración de 33 g/L, mantenido en agitación toda la noche a temperatura ambiente (25-30°C). Se procedió a centrifugar la suspensión a 3000 rpm durante 10 minutos, conservando el sobrenadante y descartando el resto. Después se filtró el

sobrenadante utilizando papel Whatman No. 1 y se añadió n-butanol en relación 1:1, manteniendo en agitación por 30 min a temperatura ambiente. Se dejó reposar durante toda la noche y después se separó el n-butanol de la mezcla. Se repitió la extracción nuevamente con n-butanol para mejorar la eficiencia del método.

Las capas de n-butanol fueron recolectadas y secadas en un rotavapor (ROTAVAPOR BUCHI® 461 Water Bath, Pace Analytical Services, Minneapolis, MN, USA) acoplado a una bomba de vacío a 40°C. Al final, se pesó el sólido extraído y se almacenó en seco a 4 °C.

Para la elaboración del extracto acuoso, no se añadió n-butanol después de la centrifugación, sino que se procedió a liofilizar el sobrenadante.

Para calcular el rendimiento de las extracciones se utilizó la siguiente relación:

$$\frac{\text{Gramos de extracto butanólico/acuoso obtenido}}{\text{Gramos de tallo de } Yucca \text{ baccata} \text{ iniciales}} \times 100$$

VI.2. Fase 1: Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente a los extractos acuoso y butanólico del tallo de *Yucca baccata*

#### **VI.2.1. Ensayo cualitativo: Método de difusión en disco de Kirby-Bauer**

Se utilizó la técnica de difusión en agar de Kirby-Bauer, ya que está estandarizada para *Pseudomonas aeruginosa*.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología del CIAD A. C. Fue cultivada en agar Mueller-Hinton a 37 °C durante 24 h para el ensayo de susceptibilidad de Kirby-Bauer. Para el ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI) fue cultivada en 15 mL de caldo Mueller-Hinton e incubada a 37 °C durante 18 h; fue utilizada inmediatamente después de su incubación.

El análisis cualitativo de la actividad antimicrobiana se realizó según la metodología descrita por Rojas (2005) sobre el método de difusión por discos de Kirby-Bauer, mediante el cual se impregnaron discos estériles de papel filtro Whatman No. 1 de 6 mm de diámetro con 2 concentraciones (6 y 9 mg/disco), de los extractos acuoso y butanólico de *Yucca baccata* usando kanamicina como control positivo (30 µg/disco) y agua destilada estéril como control negativo, para ser probadas frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La variable de respuesta fue la medida del halo de inhibición (mm).

Posteriormente, el disco fue colocado en agar Muellen-Hinton, inoculado previamente con *P. aeruginosa* y se incubaron a 35°C por 16-18 h. La variable de respuesta reportada fue el tamaño del halo de inhibición en milímetros. Para el criterio de interpretación del método de Kirby-Bauer, tomando como referencia a la kanamicina (30 µg/disco), el diámetro de la zona de inhibición para cepas resistentes fue menor o igual a 13 mm, para sensibilidad intermedia de 14-17 mm y para cepas sensibles igual o mayor a 18 mm.

### **VI.2.2 Asignación de los Tratamientos**

La asignación de los tratamientos fue no probabilística, se siguieron las recomendaciones del protocolo descrito por Rojas et al., (2005) para la selección y acomodo de los discos con los tratamientos en las placas con agar Mueller-Hinton.

### **VI.2.3 Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

El diseño experimental fue un arreglo factorial 2x2, siendo el factor A el tipo de extracto (butanólico o acuoso) y el factor B la concentración de extracto empleada (6 y 9 mg/disco). El análisis estadístico se realizó por un ANOVA de dos vías y se realizaron comparaciones de medias por Tukey-Kramer al 95% de confiabilidad usando el paquete estadístico NCSS 2007.

### **VI.2.4 Ensayo cuantitativo: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo.**

En esta prueba se incluyó sólo el extracto butanólico del tallo de *Y. baccata* debido a los resultados obtenidos en la prueba cualitativa.

El ensayo para la obtención de la CMI incluyó 8 concentraciones del extracto butanólico de *Yucca baccata* (0, 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 42.5 y 45 mg/mL) para ser probadas frente a *P. aeruginosa*, además de un control positivo (1mg/mL de kanamicina) y uno negativo (agua destilada estéril). Cada concentración fue probada por triplicado, incluyendo los controles. La variable de respuesta fue la absorbancia.

Se ajustó el inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* a 0.1 de absorbancia a 595 nm con solución salina estéril. Después se preparó la solución madre del extracto del tallo de *Yucca baccata* (250 mg/mL) y se diluyó a 0, 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 42.5, y 45 mg/mL. La concentración de 0 mg/mL fue utilizada como control de crecimiento para el cálculo de la CMI. Como control positivo se incluyó kanamicina (1 mg/mL) y un control negativo constituido por 0.6 mL de agua destilada más 4.4 mL de caldo Mueller-Hinton. Se emplearon placas de 96 pocillos en los cuales se agregaron 200 µL de cada dilución y de los controles a los pocillos (triplicado) y se añadieron 15 µL del inóculo bacteriano ajustado.

Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se agitaron suavemente durante 20 segundos y se midió la densidad óptica a 595 nm. La CMI fue la dilución del extracto que logró inhibir el 90% del crecimiento bacteriano (realizado por triplicado) en comparación al control de crecimiento (0 mg/mL).

### VI.3. Fase 2: Prueba del extracto butanólico de *Yucca baccata* (EBY) en homogenizado de pollo

#### **VI.3.1 Prueba del EBY al 1% en el Homogenizado de Pollo**

Para probar la actividad antibacteriana del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* observada in vitro, se procedió a poner en contacto a éste con el

homogenizado de pollo. Se usó un procesador de alimentos para realizar la homogenización del pollo con el extracto de *Y. baccata*.

La CMI determinada con el experimento anterior se empleó para establecer la concentración del extracto empleada en el experimento con el homogenizado de pollo, en base a la cantidad estimada de microorganismos que el extracto butanólico del tallo de *Y. baccata* es capaz de inhibir y a la cuenta microbiana teórica inicial en carne de pollo (150 000 UFC/g según la NOM-093-SSA1-1994). Se añadió el 1% en peso del EBY al pollo y se homogenizó utilizando un procesador de alimentos, para asegurar la máxima superficie de contacto posible. El homogenizado se envasó en bolsas estériles en porciones de 11 g para facilitar el muestreo. Se almacenaron tres bolsas (réplicas) por cada tiempo de muestreo (0, 2, 4, 6, 8 y 10 días) a 4°C durante 10 días.

### **VI.3.2. Cuenta Total Viable de Mesófilos Aerobios**

Se realizó una cuenta total viable de mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994) cada dos días por triplicado durante el almacenamiento. Para la preparación de la muestra del homogenizado de pollo se siguió la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

### **VI.3.3 Asignación Aleatoria de los Tratamientos**

Se realizó mediante el programa STATA versión 11. Cada tratamiento (control y 1% de EBY) tuvo el mismo número de piezas (18 bolsas por tratamiento) del homogenizado de pollo y repeticiones (3 réplicas por día de muestreo).

### **VI.3.4 Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

Se trabajó con dos tratamientos: el control del homogenizado de pollo y el homogenizado de pollo con el 1% en peso añadido de extracto de *Yucca baccata*. Se realizaron muestreos para medir mesófilos aerobios el día 0, 2, 4,



6, 8 y 10 de almacenamiento a 4°C. Los datos obtenidos se analizaron mediante una prueba de T para muestras independientes por cada día de muestreo usando el paquete estadístico NCSS 2007.

#### VI.4. Fase 3: Desarrollo de Películas de Polietileno de Baja Densidad (PEBD) con el EBY

Se mezclaron gránulos de PEBD (polietileno de baja densidad) al 99% con el extracto de *Yucca baccata* atendiendo las siguientes formulaciones: Para el control (0% EBY) se emplearon 50 g de PEBD. Para el tratamiento con 5% de EBY se emplearon 47.5 g de PEBD y 2.5 g de EBY. Para los envases con el 10% de EBY se mezclaron 45 g de PEBD y 5 g del EBY.

Las formulaciones se procesaron por extrusión utilizando un extrusor a nivel planta piloto (Beutelspacher, México, México, D.F.) acoplado a un dado para filamento; los filamentos resultantes se cortaron en un peletizador y las mezclas resultantes se volvieron a procesar haciéndolos pasar por un extrusor con dado de salida circular. La formulación con 0% de EBY fue el envase control (PEBD sin aditivos).

\*PEBD marca Certene (Muehlstein)®

##### **VI.4.1 Prueba de las Películas Adicionadas con el EBY en el homogenizado de pollo**

El homogenizado de pollo se colocó en los envases fabricados (11 g de homogenizado por envase) con PEBD y EBY (5 y 10%) y se almacenó a 4°C durante 10 días. Se almacenaron 3 réplicas por cada día de muestro (0, 3, 6, 8 y 10 días) siendo en total 12 bolsas por cada tratamiento (0, 5% y 10% EBY) después de la cuenta inicial (día 0). Se realizó una cuenta total viable de mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994) los días 0, 3, 6, 8 y 10 por triplicado durante el almacenamiento.

#### **VI.4.2 Cuenta Total Viable de Mesófilos Aerobios**

Para la preparación de la muestra del homogenizado de pollo se siguió la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. La cuenta total viable de mesófilos aerobios se realizó de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Método Para La Cuenta De Bacterias Aerobias En Placa.

#### **VI.4.3 Pruebas de Fusión del EBY**

Para encontrar el punto de fusión del EBY se utilizó el fusiómetro Fisher Scientific. Se depositó una pequeña muestra (0.5 g aproximadamente) entre dos cristales delgados y se colocó en el fusiómetro cuando la base para muestra se encontraba a temperatura ambiente. Gradualmente fue subiendo la temperatura hasta alcanzar y sobrepasar el punto de fusión, el cual se determinó como el promedio de tres repeticiones.

#### **VI.4.4 Espesor de las Películas con EBY**

El espesor de las películas se determinó usando un micrómetro automático modelo DTT E. J. Cady & Co. Wheeling, IL. Se cortaron rectángulos de 5 cm x15 cm de cada concentración de película y control y se realizaron nueve mediciones de espesor, siendo el promedio de éstas el valor reportado con desviación estándar.

#### **VI.4.5 Colorimetría de las Películas con EBY**

El equipo usado fue un colorímetro (CR-300; Konica Minolta, Ciudad de México, México), el cual proporciona un valor específico de color basado en la cantidad de luz reflejada desde la superficie del envase. Las mediciones se realizaron por quintuplicado para cada envase. Los resultados obtenidos se expresan en unidades CIELab. Para caracterizar el color de los envases se utilizaron distintos términos colorimétricos: L\*, a\*, b\*, chrome, hue y  $\Delta E$  con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2]^{0.5}$$

$\Delta E$  = cambio total de color

$a^*$  = coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde)

$b^*$  = coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul)

$\Delta L$  = Cambio en la capacidad para reflejar blancura

Hue =  $\arctan(b/a)$

Chrome =  $(a^2 + b^2)^{0.5}$

#### **VI.4.6 Asignación Aleatoria de los Tratamientos**

Se realizó mediante el programa STATA versión 11. Cada tratamiento (0%, 5% y 10% de EBY) tuvo el mismo número de piezas (12 bolsas por tratamiento) del homogenizado de pollo y repeticiones (3 réplicas por día de muestreo).

#### **VI.4.7 Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

Se dispusieron 12 envases con homogenizado de pollo por tratamiento (3 excedentes por tratamiento, 39 en total) y se tomaron los muestreos de forma aleatoria. Los datos obtenidos de mesófilos aerobios fueron sometidos a la prueba de normalidad de Kurtosis. Se analizaron de forma separada (por cada día de muestreo) realizando un ANOVA de una vía y la comparación de medias por Tukey-Kramer al 95% de confianza para observar el comportamiento de la población microbiana en los envases usando el paquete estadístico NCSS 2007.

Se realizó también un análisis de los datos con un diseño por bloques aleatorios (bloque: tiempo) para ver la diferencia entre la tendencia de los tres tratamientos (0%, 5% y 10% EBY) y se realizó la comparación de medias por Tukey-Kramer al 95% de confianza, empleando el paquete estadístico NCSS 2007.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.1 Rendimiento de la Extracción del Tallo de *Yucca baccata* con n-butanol

El extracto butanólico obtenido después de la evaporación de las capas orgánicas extraídas con n-butanol consistió en un polvo fino de color café. El rendimiento promedio de la extracción butanólica fue de 0.067g de extracto seco/g del tallo de *Y. baccata* (6.75% del tallo total procesado). Este resultado concuerda con el trabajo de Pereo (2015), que fue de 0.078 g de extracto seco/g del tallo de *Y. baccata* (7.8% del tallo total procesado), en el cual se utilizó la misma técnica de extracción y tallo de la misma especie vegetal.

El rendimiento de la extracción acuosa fue de 0.246 g de extracto seco/g de tallo procesado (24.6%), y el obtenido por Pereo (2015) bajo las mismas condiciones fue de 0.257 g de extracto seco/g de tallo de *Y. baccata* (25.7%).

### VII.2 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto

#### VII.2.1. Método de Difusión por Discos

En el ensayo cualitativo de actividad antibacteriana, la bacteria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mostró sensibilidad moderada frente a la concentración de 6 mg/disco del extracto butanólico y a la de 9 mg/disco del extracto acuoso ( $p < 0.05$ ). Ante la concentración de 9 mg/disco del extracto butanólico, la respuesta de *P. aeruginosa* fue sensible ( $p < 0.05$ ), y a la menor concentración del extracto acuoso (6 mg/disco) presentó resistencia ( $p < 0.05$ ).

La sensibilidad moderada y resistencia mostrada por *P. aeruginosa* ATCC 27853 se ha observado en evaluaciones de sensibilidad antimicrobiana frente a químicos sintéticos (Molier y Rojas, 2007) y frente a diferentes tipos de extractos provenientes de plantas (Pereo, 2015; Corzo, 2012). Esto se atribuye principalmente a su naturaleza como bacteria Gram negativa y los constituyentes de su membrana celular (bicapa lipídica, presencia de porinas para el transporte de material al interior de la célula, etc.).

Como control positivo se usó kanamicina (30 µg/disco), por ser un antibiótico de amplio espectro. Al ser probado con *P. aeruginosa* ATCC 27853 resultó medianamente sensible ( $P < 0.05$ ), obteniendo halos de inhibición muy cercanos entre sí.

Al realizar las comparaciones de medias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Tabla 1) por Tukey-Kramer ( $P < 0.05$ ), se encontró que todas fueron diferentes entre sí, excepto la comparación con el control positivo (kanamicina), en la cual no se encontró diferencia con la concentración más baja (6 mg/disco) del extracto butanólico.

Tabla 1. Sensibilidad antibacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* frente a los extractos butanólico y acuoso del tallo de *Yucca baccata* por la técnica de difusión por discos.

Bacteria	Diámetro de inhibición (mm)				Kanamicina 30 µg/ disco
	Extracto butanólico		Extracto acuoso		
	6 mg/disco	9 mg/disco	6 mg/disco	9 mg/disco	
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> <b>ATCC* 27853</b>	19.27 <sup>a</sup> ± 0.76	22.82 <sup>b</sup> ± 0.27	11.27 <sup>c</sup> ± 0.52	16.22 <sup>d</sup> ± 0.22	19.54 <sup>a</sup> ± 0.62

Media ± Error Estándar de 3 réplicas. Diferente literal entre valores de la misma fila indica diferencias significativas por Tukey-Kramer (P<0.05). \*ATCC: American Type Culture Collection.

Las diferencias de las medias de sensibilidad pueden deberse, además de la concentración empleada (6 mg/disco y 9 mg/disco), al tipo de extracción realizada y a los constituyentes de cada extracto, ya que las interacciones entre los componentes o la presencia/ausencia de metabolitos secundarios como fenoles, taninos o saponinas en los extractos, es capaz de aumentar o disminuir la actividad antibacteriana de éste (Saqib et. al., 2014).

#### **V.II.2.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) sólo se probó el extracto butanólico, debido a que la bacteria de mayor interés (*P. aeruginosa* ATCC 27853) fue más sensible. La CMI fue determinada usando el método de microdilución en caldo. Se obtuvo una CMI del extracto butanólico de *Yucca baccata* (EBY) para *P. aeruginosa* ATCC 27853 de 37.5 mg/mL, encontrando una inhibición del 93% (Tabla 2).

La concentración mínima inhibitoria (37.5 mg/mL) del extracto butanólico encontrada para *P. aeruginosa* ATCC 27853 es ligeramente más alta que la reportada para otros extractos provenientes de plantas, como la obtenida para el extracto etanólico del tallo de *Cestrum buxifolium kunth* (Corzo, 2012), que fue de 30 mg/mL, la cual fue determinada empleando el mismo método.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

<b>Extracto butanólico (mg/mL)</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</b>	
	<b>D. O. 595 nm</b>	<b>Inhibición (%) ± DS</b>
<b>0</b>	0.856	---
<b>30</b>	0.248	71 ± 3.6
<b>32.5</b>	0.128	85 ± 1.7
<b>35</b>	0.111	87 ± 2.6
<b>37.5</b>	0.059	93* ± 1
<b>40</b>	0.042	95 ± 1.7
<b>42.5</b>	0.102	88 ± 1
<b>45</b>	0.094	89 ± 1
<b>C (+)</b>	0.119	86 ± 1.7
<b>C (-)</b>	0.963	---

\*Concentración mínima inhibitoria. DS: Desviación estándar de cada concentración realizada por triplicado. ATCC: American Type Culture Collection. D. O.: Densidad óptica.



### VII.3. Prueba del extracto butanólico en el homogenizado de pollo

Tras realizar la homogenización y el empacado de la pechuga de pollo en las bolsas estériles, se obtuvieron las unidades experimentales como se observan en la Figura 1.



Figura 1. Homogenizado de pollo (pechuga) con extracto butanólico añadido y listo para su almacenamiento en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}\pm 1$ ).

Los resultados de la cuenta total viable de mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994) mostraron una tendencia de disminución de las unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) del homogenizado de pollo con la concentración añadida de extracto con respecto al control (Figura 2).

Se encontraron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre el control y el tratamiento (1% EBY) en cada día de muestreo analizado. En el día 0 no se observaron diferencias debido a que la cuenta inicial se tomó como la misma ya que provenía de la misma matriz de alimento.

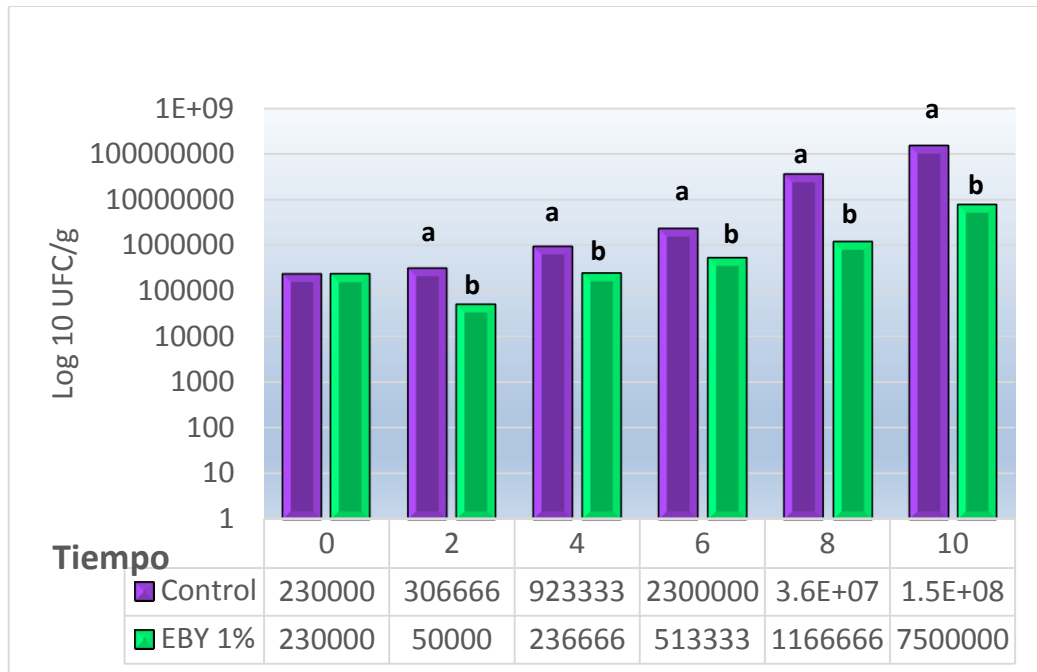


Figura 2. Proliferación microbiana en el homogenizado de pollo control (0%) y con el extracto butanólico de *Yucca baccata* (1%) durante el periodo de refrigeración (4°C/10 días).

EBV: Extracto butanólico de *Yucca baccata*.

\*Diferente literal indica diferencias entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Al carecer de una norma específica para los mesófilos aerobios en carne de pollo, se comparó el resultado con el límite máximo permisible de mesófilos aerobios de la NOM-034-SSA1-1993 para productos cárnicos, el cual es de  $5 \times 10^6$  UFC/g. Este valor fue rebasado por el control en el día 8 de experimento o muestreo, mientras que el homogenizado de pollo con 1% en peso de extracto butanólico de *Y. baccata* lo alcanzó hasta el día 10 de almacenamiento.

La diferencia de los valores a los 10 días entre el tratamiento y el control fue de  $1.4 \times 10^8$  UFC/g, lo cual indica que el crecimiento de microorganismos en el homogenizado de pollo con el extracto del tallo de *Yucca baccata* añadido es únicamente del 5% del crecimiento en el control. Esta actividad concuerda con la reportada en el estudio de Santos et al., (2005), en el cual emplearon

extractos ricos en saponinas frente a bacterias del rumen de ganado y encontraron que éstos inhibían el crecimiento de bacterias Gram negativas.

Esta actividad observada en el alimento puede deberse a que hayan ocurrido interacciones entre los compuestos del extracto y también con los componentes del homogenizado de pollo, tanto por sinergismo, antagonismo o una combinación de éstas.

La actividad antibacteriana del extracto rico en saponinas está relacionada directamente con la estructura de la saponina (aglicona y azúcares unidos a ésta), ya que debido a la propiedad surfactante que tiene, es capaz de desestabilizar la membrana celular al formar complejos con los lípidos presentes en ésta, volviéndola porosa y ocasionando lisis celular (Arabski et. al., 2012).

Al ser probada la actividad antimicrobiana del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* en el homogenizado de pechuga de pollo, se continuó con la elaboración de los envases activos con EBY al 5% y 10%.

#### VII.4. Prueba de los Envases Activos con EBY

Los envases obtenidos para las dos concentraciones del EBY y el control se observan en la figura 3.



Figura 3. Envases activos con EBY conteniendo aproximadamente 11g de homogenizado de pechuga de pollo.

Como puede observarse en la Tabla 3, los resultados de la comparación de medias entre los envases por el método de Tukey-Kramer a un nivel de significancia del 5%, detectó diferencias entre el control y ambas concentraciones (5 y 10%), pero no entre los últimos dos envases, a excepción del día 6. En el día 6, no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el envase con el 5% del EBY y el control. En el día 0, al ser la cuenta inicial, no es posible calcular diferencias entre los envases y el control.

Al realizar los contrastes de medias por cada día, se facilita la interpretación de los resultados al observar en qué tratamientos hubo diferencias y en cuál día.

Al comparar las UFC/g obtenidas por la técnica de mesófilos aerobios con la NOM-034-SSA1-1993 ( $5 \times 10^6$  UFC/g), se encontró que tanto el control como los envases con el extracto de *Yucca baccata* rebasan la límite permisible por la norma anterior hasta el último día de almacenamiento (día 10). Sin embargo, las UFC/g del envase con el EBY 5% fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) que aquellas del control. Las UFC/g del envase con el 10% de EBY fueron aproximadamente una cuarta parte del valor de las encontradas para el control (Tabla 3).

En el estudio realizado por Assefa y Admassu (2013) se plantea también uso de saponinas (extracto) como componente activo en envases para disminuir la proliferación microbiana, y encontraron de igual forma que a la concentración de 10% de saponinas en el envase, éste inhibía el crecimiento de bacterias como *E. coli*, *Salmonella thypi* y *Enterobacter erogenous*. Aunque la fuente vegetal de extracto rico en saponinas sea distinta (alubias), la actividad antimicrobiana inhibitoria de éste tiene una tendencia similar a la encontrada en el presente estudio.

Tabla 3. Unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) y porcentajes de inhibición del envase control y los envases con 5% y 10% añadido de extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* de cada día de muestreo.

Muestra	Día 0		Día 3		Día 6		Día 8		Día 10		% inhibición
	Promedio* UFC/g Desviación estándar*	% Inhibición	Promedio UFC/g Desviación estándar	% Inhibición	Promedio UFC/g Desviación estándar	% Inhibición	Promedio UFC/g Desviación estándar	% Inhibición	Promedio UFC/g Desviación estándar	% Inhibición	Promedio del % de inhibición ± Desviación estándar
<b>Control</b>	1.98 ± 0.19 x10 <sup>3</sup>	N/A	2.29a ± 0.14 x10 <sup>4</sup>	N/A	3.06a ± 0.32 x10 <sup>5</sup>	N/A	3.93a ± 0.89 x10 <sup>6</sup>	N/A	2.83a ± 0.72 x10 <sup>7</sup>	N/A	<b>N/A</b>
<b>5%</b>	1.98 ± 0.19 x10 <sup>3</sup>	N/A	1.08b ± 0.19 x10 <sup>4</sup>	52.7	2.34a ± 0.14 x10 <sup>5</sup>	23.6	1.25b ± 0.11 x10 <sup>6</sup>	68.0	1.30b ± 0.02 x10 <sup>7</sup>	53.9	<b>49.5 ± 18.6</b>
<b>10%</b>	1.98 ± 0.19 x10 <sup>3</sup>	N/A	9.08b ± 1.41 x10 <sup>3</sup>	60.3	1.34b ± 0.25 x10 <sup>5</sup>	56.0	9.13b ± 0.55 x10 <sup>5</sup>	76.7	7.61b ± 0.90 x10 <sup>6</sup>	73.1	<b>66.5 ± 9.9</b>

\*Promedio y Desviación Estándar de las UFC/g de la cuenta total viable de mesófilos aerobios en homogenizado de pollo almacenado a 4°C durante 10 días en envases activos a dos concentraciones de EBY. Diferente literal por columna indica diferencias en la comparación de medias por Tukey-Kramer con 95% de confianza.

En la Figura 4 puede observarse el porcentaje de inhibición de los envases con el 5 y 10% de EBY comparados con el control.

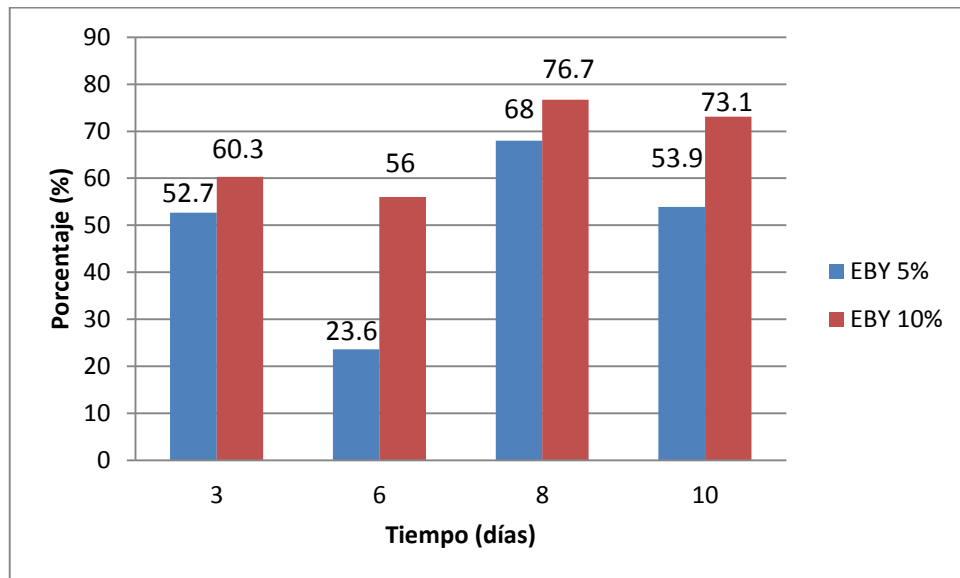


Figura 4. Gráfica de inhibición de los envases activos en homogenizado de pollo comparados con el control.

En el día 6 se observa la diferencia más grande en el porcentaje de inhibición de los envases con el EBY, sin embargo, esa diferencia no es significativa ( $p < 0.05$ ).

Para realizar el análisis de los datos bloqueando el tiempo para observar el efecto antimicrobiano del extracto durante los 10 días de almacenamiento se trabajó con el logaritmo natural ( $\ln$ ) de los datos, para asegurar la normalidad de los mismos y realizar las pruebas paramétricas. Se encontró que los tratamientos fueron significativos ( $p < 0.05$ ) con el ANOVA de 2 vías y al realizar los contrastes de medias por Tukey-Kramer al 95% de confianza, se observó que todas fueron diferentes entre sí, por lo que la actividad del extracto resultó efectiva durante el período de almacenamiento (10 días). Los resultados de los análisis estadísticos presentaron variaciones debido a que para el análisis de los datos utilizando el tiempo como factor de bloqueo las UFC/g fueron transformadas empleando el  $\ln(x)$  para normalizarlos y emplear dicha prueba paramétrica.

Al realizar un análisis por bloques (tiempo), lo que podemos apreciar es el efecto de los tratamientos durante el almacenamiento, pero disminuyendo la variabilidad de los datos al construir los bloques escalonados por los días de muestreo.

Al trabajar con  $\ln(x)$ , la variabilidad entre cada dato se reduce drásticamente, por lo que las pruebas para realizar las comparaciones de medias se vuelven muy sensibles para detectar diferencias entre los grupos o bloques, ya que las diferencias entre datos en el interior de estos disminuye, pero de un bloque a otro es mayor. El efecto de envases con los tratamientos del extracto de *Yucca baccata* fue diferente ( $p < 0.05$ ) entre ellos.

#### VII.4.1 Punto de Fusión del EBY

El punto de fusión del extracto butanólico de *Yucca baccata* fue de  $82 \pm 3^\circ\text{C}$ . Se encontró también que incluso a los  $130^\circ\text{C}$  el extracto continuaba en estado líquido.

#### VII.4.2 Espesor de los envases fabricados con EBY y PEBD

Los valores de espesor obtenidos son resultado de 9 repeticiones de las mediciones. El espesor promedio de los envases control (sólo PEBD) fue de  $0.91 \pm 0.26$  mills. Para el envase con el 5% de extracto butanólico de *Y. baccata* fue de  $1.51 \pm 0.09$  mills y para el envase con el 10% de EBY fue de  $2.53 \pm 0.30$  mills.

Debido a las diferencias obtenidas en el espesor al fabricar los envases, decidió realizarse el cálculo de transmisión de oxígeno.

#### VII.4.3 Transmisión de Oxígeno en los Envases

Se realizó el cálculo de transmisión de oxígeno con los promedios de los tres envases, obteniendo que para el control, la transmisión de oxígeno se estimó como  $8931.86 \text{ cc/ m}^2/\text{día}$ . Para el envase con EBY 5% el valor estimado fue de  $5382.78 \text{ cc/ m}^2/\text{día}$  y finalmente para el envase con EBY 10% la estimación del valor fue de  $3212.64 \text{ cc/ m}^2/\text{día}$ .

Se observan diferencias en la transmisión de oxígeno en los tres envases, lo cual se teoriza que tuvo un efecto sobre la cuenta total viable de mesófilos aerobios en el homogenizado de pollo, ya que la cantidad de oxígeno que es capaz de atravesar el envase tiene un efecto directo en el aumento o disminución de la población microbiana. Sin embargo, en la prueba de diferencias de medias de Tukey-Kramer al 5% de confianza, se obtuvieron diferencias entre el control y los envases con el EBY, pero no se encontró diferencia entre estos últimos al interior de los envases durante el experimento. Si el crecimiento hubiera estado influido por el oxígeno que se difundía a través del envase, se hubieran presentado diferencias estadísticas entre estos dos tratamientos. Con este resultado se descartó un efecto determinante del oxígeno que se difundía.

#### VII.4.4. Propiedades colorimétricas del envase control y los envases con 5 y 10% de EBY

Después de analizar los datos por ANOVA de una vía y comparar las medias por Tukey-Kramer con 5% de confiabilidad, se observaron diferencias ( $p < 0.05\%$ ) entre el control y los demás envases (Tabla 4).



Tabla 4. Parámetros de color de los envases

<b>Envases</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>Chrome</b>	<b>Hue</b>	<b>ΔE</b>
<b>Control</b>	0.098 ± 0.37 <sup>a</sup>	-0.034 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.014 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.077 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.726 ± 0.39 <sup>a</sup>	---
<b>EBY 5%</b>	1.448 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.468 ± 0.12 <sup>b</sup>	-4.330 ± 1.00 <sup>b</sup>	4.355 ± 1.00 <sup>b</sup>	1.462 ± 0.02 <sup>b</sup>	4.6
<b>EBY 10%</b>	1.192 ± 0.35 <sup>b</sup>	0.408 ± 0.07 <sup>b</sup>	-3.958 ± 1.01 <sup>b</sup>	3.979 ± 1.01 <sup>b</sup>	1.466 ± 0.01 <sup>b</sup>	4.1

\*EBY: Extracto butanólico de *Yucca baccata*.

Los resultados presentados son el promedio y la desviación estándar de 5 réplicas.  
Diferente literal en la columna indica diferencias significativas (P<0.05).

El envase control de polietileno de baja densidad fue transparente y los envases que tienen una concentración del extracto de *Yucca baccata* presentaron una coloración amarillo opaco. Los valores positivos de  $a^*$  indican que los envases con EBY tienen una ligera tonalidad roja sin embargo, los valores encontrados (tabla 4) son muy cercanos a cero, que es donde se encuentra el gris. Los valores negativos en  $b^*$  se interpretaron como ligera tonalidad azul sin embargo, estos valores también son muy cercanos a cero, que donde predomina el color gris. Los valores en  $L^*$  indican la capacidad del envase para reflejar la luz. La diferencia total de color ( $\Delta E$ ) fue de 4.6 para el EBY 5% y de 4.1 para el EBY 10%, lo cual no implica gran diferencia en la coloración de ambos envases, esta leve diferencia tampoco es apreciable a simple vista.

Los valores de croma obtenidos son el matiz o tono característico de los envases. Se determinaron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre el control, que posee un valor de croma muy cercano a 0 ( $0.077 \pm 0.03$ ) y el de los envases (5%:  $4.355 \pm 1.00$ ; 10%:  $3.979 \pm 1.01$ ). Esto indica que el color del extracto tuvo un efecto significativo en la coloración final de los envases, modificando su apariencia con respecto al control. El ángulo Hue determinó la saturación cuantitativa del color, siendo diferente ( $p < 0.05$ ) el valor del control ( $0.726 \pm 0.39$ ) de los valores obtenidos para los envases (5%:  $1.462 \pm 0.02$ ; 10%:  $1.466 \pm 0.01$ ). No se detectaron diferencias entre los envases con concentraciones del extracto.

Colín-Chávez y colaboradores (2012) también evaluaron las propiedades colorimétricas de los envases fabricados con extracto de Marigold (*Tagetes erecta*) y polietileno, encontrando que en éstos también se reducía la capacidad de reflejar la luz de los envases ( $L^*$ ) al agregar el extracto. Sin embargo, en ese estudio todos los envases con Marigold fueron brillantes, mientras que los de *Y. baccata* fueron opacos. El cambio total de color ( $\Delta E$ ) en el trabajo de Colín-Chávez y colaboradores (2012) resultó mayor que el encontrado en el presente trabajo, debido a la naturaleza colorimétrica del extracto, ya que las concentraciones añadidas de Marigold en los envases fueron menores (2.90% y 3.59%) que las empleadas en los envases de *Y. baccata* (5% y 10%).

## VIII. CONCLUSIONES

El extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* tiene actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, cuya CMI se estableció en 37.5 mg/mL.

La concentración empleada de extracto butanólico de *Yucca baccata* (1% en peso) resultó efectiva para reducir la proliferación de mesófilos aerobios en homogenizado de pollo.

El uso de los envases activos con 5% y 10% de EBY resultaron efectivos para disminuir la proliferación microbiana en homogenizado de pollo. En base a que no se encontró diferencia de actividad entre ellos, se recomendaría el uso del envase con 5%.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antón, A. (Consultado el 30 de Abril de 2014). Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Obtenido de: [http://www.proyectopandora.es/wp-content/uploads/Bibliografia/13181019\\_nitritos\\_nitratos.pdf](http://www.proyectopandora.es/wp-content/uploads/Bibliografia/13181019_nitritos_nitratos.pdf)

Apablaza, G., Díaz, M.J., San Martín, R., Moya, E. 2002. Control de oidio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de Quillay (*Quillaja saponaria*). Ciencia e Investigación Agraria. Vol. 29. 83-90 p.

Arabski, M., Wasik,S., Dworecki, K., Kaca, W. 2012. Effects of Saponins against Clinical E.coli Strains and Eukaryotic Cell Line. Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2012, 1-6 p.

Bahramineja, P., Asestonfer, R.E., Riley I.T., Schultz, C.J. 2008. Analysis of the Antimicrobial Activity of Flavonoids and Saponins Isolated from the Shoots of Oats (*Avena sativa* L.). Journal of Phytopathology, vol. 156. 1-7 p.

Bajpai, V.K., y Chul-Kang, S. 2011. Isolation and characterization of biologically active secondary metabolites from *Metasequoia glyptostroboides* Miki Ex Hu. Journal of Food Safety, vol. 31. 276-283 p.

Bizarri, G., Thekiso, P., Asselin, O. 2012. La función de las organizaciones de productores en la reducción de las pérdidas y el desperdicio de alimentos. Roma. Practical Action Publishing en asociación con la FAO.

Carvajal, G. 2001. Valor nutricional de la carne de: res, cerdo y pollo. Corporación Ganadera. Corporación de Fomento Ganadero. San José, Costa Rica. 55 pp.

Castañeda, M.P., Braña, D., Cortés, C.R., Martínez, W. 2013 Calidad microbiológica de la carne de pollo. Libro técnico No. 9. SAGARPA-CONACyT. No. 109127. Querétaro, México.

Cheeke, P.R. 2000. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. Journal of Animal Science, 1-10 p.

Chen, M., Long, Z., Wang, Y., Liu, J., Pian, H., Wang, L., & Chen, Z. 2013. Protective effects of saponin on a hypertension target organ in spontaneously hypertensive rats. Experimental and Therapeutic Medicine. Vol. 5. 429-432 p.

Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. 2007. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packing on shelf life extensión of fresh chicken breast meat, stored at 4°C. Food Microbiology. Vol. 4. 607-617 p.

Colín-Chávez, C., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Lizardi-Mendoza, J., Balandrán-Quintana, R. 2012. Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. Packaging Technology and Science.

Dainty, R.H., and Mackey, B.M. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. J. Appl. Bact. Vol. 73.103–114 p.

Diez, A.M., Moreno, J.I., Carballido, R.J. 2009. Aplicación de métodos combinados de conservación. Experiencias en la Universidad de Burgos. International Marketing and Communications S. A. Madrid.

Economou, T., Pournis, N., Ntzimani, A., Savvaidis, I.N. 2009. Nisin-EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf life. Food Chemistry. Vol. 114. 1470-1476 p.

Eggl, U. 2001. Monocotyledons. Illustrated Handbook of Succulent Plants. Springer-Verlag. Eggl/Hartmann Eds. Berlín.

FAO. (Consultado el 17 de Abril de 2014). Glosario FAO 2011. Obtenido de Glosario FAO:

<http://www.rlc.fao.org/fileadmin/content/publicaciones/pepitaypapa/glosario.pdf>

FAO (Consultado el 04 de Febrero del 2015):

<http://www.fao.org/americas/perspectivas/inocuidad/es/>

FDA. 2014. (Consultado el 08 de Abril de 2014). U. S. Food and Drug Administration. Obtenido de:

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/HACCP/default.htm>

Fenavi. 2014. Federación Nacional de Avicultores. Consultado en Octubre del 2014.

[http://www.fenavi.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2160&Itemid=556#](http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2160&Itemid=556#)

Fonseca, J.M. y Vergara, N. 2014. Logistics systems need to scale up reduction of produce losses in the Latin America and Caribbean región. Italy. FAO. Acta Hort. 1047, ISHS 2014.

Fouedjou, R., Teponno, R., Quassinti, L., Bramucci, M., Petrelli, D., Vitali, L., Fiorini, D., Taponjoui, L., Barboni, L. 2014. Steroidal saponins from the leaves of *Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev. and their cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Letters*. Vol. 7. 62-68 p.

García, M., y Castellanos, M.C. 2011. Evaluación del efecto sanitizante de un extracto biodegradable obtenido de la especie *Solanum marginatum*, de uso etnobotánico en Bocayá. *Editorial Luna Azul*. Vol. 32. 10-15 p.

Gómez, J., Gavara, R., Catalá, R. 2009. Innovaciones en el envasado de los alimentos. Envasado activo y envasado inteligente. Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos. Madrid. Vol. 10. 141-151 p.

Groen, A.H. (28 de Abril de 2014). US Forest Service. Obtenido de U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory:

<http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/shrub/yucbac/all.html#33>

Guillot, D., y Van der Meer, P. 2009. El género *Yucca* L. en España. *Revista Bouteloua*. Vol. 2. 124 p. Editorial Jolube, España.

Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U. 2014. Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo: Alcance, causas y prevención. Documento presentado en el Congreso Internacional SAVE FOOD! Italia.

Hae-Kyong, P., Srhuti, S., Jong suk, L., Jong-Kyu, K., Myunghee, K. 2014. Reduction of foodborne pathogen and aflatoxins in doejang samples using defined meju. *Journal of Food Safety*. Vol. 34. 161-167 p.

Hernández, C., Aguilera, A., Castro, E. 2001. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf. Inf. Microbiol*. Vol. 31. 137-151 p.

Jie-Lun, H., Shao-Ping, N., Dan-Fei, H., Chang, L., Ming-Yong, X., Yin, W. 2012. Antimicrobial activity of saponin-rich fraction from *Camellia oleifera* cake and its effect on cell viability of mouse macrophage RAW 264.7. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 92. 2443-2449 p.

Jiménez, S.M., Salsi, M.C., Tiburzi, R.C., Rafaghelli, M.A., y Coutaz, V.R. 1997. Spoilage microflora in fresh chicken breast stored at 4 °C: Influence of packaging methods. *J. Appl. Microbiol.* Vol. 83. 613–618 p.

Juneja, V., Dwivedi, H., Xianghe, Y. 2012. Novel Natural Food Antimicrobial. *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 3. 381-403 p.

Kakur, P., Prasad, R., Kumar, V. 2007. Evaluation of antibacterial activity of indian spices against common foodborne pathogens. *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 42. 910-915 p.

Lee, J.H., Jang, H., Seo, J.A. 2011. Evaluation for antibacterial effects of volatile flavors from *Chrysanthemum indicum* against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Journal of Food Safety*, vol. 31. 140-148 p.

León, R. 2012. Actividad antiparasitaria del extracto de *Yucca baccata* del desierto sonorense empleando jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados con *Giardia lamblia*. Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

Lozano, M., Ticona, E., Carrasco, C., Flores, Y., Almanza, R. 2012. Cuantificación de saponinas en residuos de Quinoa Real *Chenopodium quinua willd.* *Revista Boliviana de Química*, vol. 29. 128-135 p.



Manalili, N.M. 2011. Appropriate food packaging solutions for developing countries. Documento presentado en el Congreso Internacional SAVE FOOD! en Interpack, Düsseldorf (Alemania).

McMurphy, C.P., Sexten, A.J., Mourer, G.L., Rincker, M.J., Lalman, D.L. 2014. Effects of including saponins (Micro-Aid) in a protein supplement on performance of growing steers and spring-calving cows. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 190. 19-29 p. (a)

McMurphy, C.P., Sexten, A.J., Mourer, G.L., Sharman, E.D., Trojan, S.J., Rincker, M.J., Coblenz, W.K., Lalman, D.L. 2014. Effects of including saponins (Micro-Aid) on intake, rumen fermentation and digestibility in steers fed low-quality prairie hay. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 190. 47- 58 p. (b)

Michael, D., Faith J., T. Matthew, T. 2013. Naturally Occurring Antimicrobials for Minimally Processed Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 4. 163-190 p.

Molier, T. y Rojas, N. 2007. Evaluación de la actividad antibacteriana de preservos industriales. *CENIC*. Vol. 38. 45-48 p.

Newbold, C. J., El Hassan, S. M., Wang, J., Ortega, M. E., and Wallace, R. J. 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *The British Journal of Nutrition*. Vol. 78. 237–249 p.

NOM-034-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Productos de la Carne. Carne Molida y Carne Molida Moldeada. Envasadas. Especificaciones Sanitarias.

NOM-092-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Método Para La Cuenta De Bacterias Aerobias En Placa.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Prácticas de Higiene y Sanidad en la Preparación de Alimentos que se Ofrecen en Establecimientos Fijos.

NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

Olsmats, C. y Wallteg, B. 2009. Packaging is the answer to world hunger. Naperville, Illinois (EE. UU.), Organización Mundial del Embalaje y Organización Internacional de Prensa de Embalaje (IPPO), Singapur.

OMS. 2009. (Consultado el 01 de Abril del 2014). Organización Mundial de la Salud: [http://www.who.int/features/factfiles/food\\_safety/es/](http://www.who.int/features/factfiles/food_safety/es/)

OMS. 2014. (Consultado el 21 de Abril de 2014). Organización Mundial de la Salud: [http://www.who.int/topics/food\\_safety/es/](http://www.who.int/topics/food_safety/es/)

Pereo, D. 2015. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* e identificación de sus fracciones con saponinas. Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

Quihui-Cota L., León-Trujillo R, Astiazarán-García H., Esparza-Romero J., Robles M., Robles-Zepeda R., Canett R., and Sánchez-Escalante J. 2014. Marked anti-giardial activity of *Yucca baccata* extracts: A potential natural alternative for treating protozoan infections. BioMed Research International Vol. 2014. 1-6 p.

Rojas, N., y Avellaneda, S. 2009. Actividad antimicrobiana de *Waltheria indica* y *Acacia farnesiana*. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Vol. 40. 129-134 p.

Rooney, M.L. 1995. Overview of active food packaging, in Active Food Packaging. Editorial Blakie Academic & Professional, Glasgow, Gran Bretaña.

Santos, A.L., Jiménez, H., Cano, A. 2005. Efecto *in vitro* de extractos ricos en saponinas de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria* sobre el crecimiento de dos bacterias celulolíticas ruminales. Revista CORPOICA. Vol. 6. 20-25 p.

Saqib, M., Hussain, M., Afridi, M., Ali, G., Khattak, M., Ahmad, S., Shakirullah. 2014. In vitro phytochemical, antibacterial and antifungal activities of leaf, stem and root of *Adiantum capillus veneris*. The Scientific World Journal. Vol. 2014. 1-7 p.

Saravana, P., Anaswara, P.V., Muthuraman, A., Krishan, S. 2014. Therapeutic potency of saponin rich aqueous extract of *Scoparia dulcis* L. in alloxan induced diabetes in rats. An International Quarterly Journal of Reseach in Ayurveda. Vol. 35. 211-217 p.

Satish, A., Reddy, P., Sairam, S., Ahmed, F., Urook, A. 2014. Antioxidative effect and DNA protecting property of Moringa oleifera root extracts. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. Vol. 21. 209-220 p.

Satish, B., y Mahesh, S. 2008. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. World Journal of Agricultural Sciences. Vol 4. 839-843 p.

SEDESOL. (Consultado el 26 de Noviembre de 2013). Secretaria de Desarrollo Social.

[http://www.sedesol.gob.mx/en/SEDESOL/Comunicados/\\_rid/57/1430/despedicia-el-mundo-1-300-millones-de-toneladas-de-alimentos-anuales](http://www.sedesol.gob.mx/en/SEDESOL/Comunicados/_rid/57/1430/despedicia-el-mundo-1-300-millones-de-toneladas-de-alimentos-anuales)

Smith, C. 2004. *Yuccas: Giants amount the Lilies*. An NCCPG Publication. National Council for the Conservations of Plants and Gardens. The National Plant Collections. Great Britain.

Susumu, A., Hiroki, O., Keiko, N., Kaoru, U., Masafumi, Y. 2003. In vitro bactericidal activity of telithromycin-MBC/MIC ratio and killing curve. *Japanese Journal of Chemotherapy*, vol. 51. 77-82 p.

Verónike, C. 2008. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat science*. Vol. 78. 90-103 p.

Wang, Y., McCallister, T., Yanke, L., Cheeke, P. 2000. Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 88. 887-896 p.

Xhimai, R. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*. Vol. 7. 153-170 p.

Xin-Fu, Z., Ying-Ying, H., Guan-Hu, B., Tie-Jun, L., Liang, Z., Li-Ping, G., Tao, X. 2012. A New Saponin from Tea Seed Pomace (*Camellia oleifera Abel*) and Its Protective Effect on PC12 Cells. *Molecules*. Vol. 10. 11721-11728 p.

Xue, X., Mei, Y., Jianguo, X., Juan, Z., Qin, H., Kaixuan, Y., Bo, Z., Yang, F., Liu, S., Wang, H., Peng, B. 2014. Paris Saponin II suppresses the growth of human ovarian cancer xenografts via modulating VEGF-mediated angiogenesis and tumor cell migration. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Vol. 73. 807-818 p.

Zhou, H., Zhang Wang, C., Zhon Ye, J., Xia Chen, H. 2014. New triterpene saponins from the seed cake of *Camellia oleifera* and their citotoxic activity. *Phytochemistry Letters*. Vol. 104. 46-51 p.