

	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS		CÓDIGO	FO-GS-15	
			VERSIÓN	02	
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN			FECHA	03/04/2017
				PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ		REVISÓ	APROBÓ		
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad	Líder de Calidad		

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTORES:

NOMBRE(S) CAMILO ANDRÉS APELLIDOS BAYONA BUITRAGO

NOMBRE(S) MARÍA FERNANDA APELLIDOS CEPEDA

FACULTAD: FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

DIRECTOR:

NOMBRE(S) NELSON ALFONSO APELLIDOS VEGA CONTRERAS

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ALMENDRÓN (*Terminalia Catappa*)

RESUMEN. El estudio investiga Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) y métodos de conservación. Se busca antimicrobianos naturales, como extractos de plantas, para mejorar la calidad alimentaria. Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto de Terminalia catappa en bacterias patógenas. La metodología involucró recolección, identificación de compuestos y pruebas que demostraron efecto inhibidor en Salmonella spp y E. coli.

PALABRAS CLAVES: Terminalia catappa, enfermedades, microorganismos patógenos, compuestos fenólicos, extractos vegetales

CARACTERÍSTICAS

PÁGINAS: 77 PLANOS: ILUSTRACIONES: CD ROOM:

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ALMENDRÓN
(*Terminalia Catappa*)

CAMILO ANDRÉS BAYONA BUITRAGO
MARÍA FERNANDA CEPEDA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE AGROINDUSTRIAL
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2023

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ALMENDRÓN
(*Terminalia Catappa*)

CAMILO ANDRÉS BAYONA BUITRAGO
MARÍA FERNANDA CEPEDA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Ingeniero Agroindustrial

Director

NELSON ALFONSO VEGA CONTRERAS

Magister

Codirector

CLAUDIA YANETH DÍAZ CARVAJAL

Magister

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2023

ACTA DE SUS TENTACIÓN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 27 DE JUNIO DE 2023

HORA: 10:00 AM

LUGAR: SALA 4 - CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

TITULO: POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ALMENDRÓN
(Terminalia Catappa)

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADOS: DORA CLEMENCIA VILLADA
LIZETH ALFONSINA PORTILLA
ANA MILENA GÓMEZ

DIRECTOR: NELSON ALFONSO VEGA CONTRERAS
CODIRECTOR: CLAUDIA YANETH DÍAZ CARVAJAL

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACIÓN
BAYONA BUITRAGO CAMILO ANDRÉS	1641166	4.5
CEPEDA MARIA FERNANDA	1641167	4.5

OBSERVACIONES: MERITORIO

FIRMA DE LOS JURADOS:


DORA CLEMENCIA VILLADA


LIZETH ALFONSINA PORTILLA


ANA MILENA GÓMEZ

V.o.B.o. Coordinador Comité Curricular


MARIBEL GOMEZ PEÑARANDA

Tabla de contenido

	pág.
Introducción	10
1. Descripción del problema	12
1.1 Título	12
1.2 Planteamiento del problema	12
1.3 Formulación del problema	15
1.4 Justificación	15
1.5 Objetivos	17
1.5.1 Objetivo general	17
1.5.2 Objetivos específicos	18
2. Marco referencial	19
2.1 Antecedentes	19
2.1.1 Internacionales	19
2.1.2 Nacionales	20
2.1.3 Regionales	22
2.2 Marco teórico	23
3. Metodología	35
3.1 Tipo de investigación	35
3.2 Población y muestra	35
3.2.1 Población	35
3.2.2 Muestra	35
3.3 Fases de la Investigación	35

3.3.1 Fase I. Recolección y Adecuación de la Materia Prima	35
3.3.2 Fase II. Troceado y Secado	36
3.3.3 Fase III. Extracción de Compuestos Fenólicos	37
3.3.4 Fase IV. Identificación de Compuestos Fenólicos	38
3.3.5 Fase V. Evaluación Microbiológica	40
3.3.6 Fase VI. Análisis Estadístico	49
4. Resultados y discusiones	50
4.1 Fase I y II. Recolección, Adecuación de la Materia Prima, Troceado y Secado	50
4.2 Fase III y IV. Extracción e Identificación de Compuestos Fenólicos	51
4.3 Fase V. Evaluación Microbiológica	54
4.4 Fase VI. Análisis estadístico	56
5. Conclusiones	58
6. Recomendaciones	59
Referencias Bibliográficas	60

Lista de tablas

	pág.
Tabla 1. Ficha Taxonómica del Almendrón (<i>Terminalia catappa</i>).	24
Tabla 2. Componentes del Agar Müller Hilton	42
Tabla 3. Preparación de Tratamientos	45
Tabla 4. Nivel mínimo de cuantificación (NMC=2NMD), tiempo de retención (tR,) y resultados de la determinación de compuestos fenólicos en extractos, por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS en la(s) muestra(s).	52
Tabla 5. Medidas Halos de Inhibición de cada Tratamiento en <i>Salmonella spp</i> y <i>E. coli</i>	55
Tabla 6. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo	57
Tabla 7. Análisis de varianza	57

Lista de figuras

	pág.
Figura 1. Árbol Terminalia catappa	24
Figura 2. Hojas de Terminalia catappa	26
Figura 3. Método Soxhlet	27
Figura 4. Recolección de la Materia Prima	36
Figura 5. Secado de las Hojas de Terminalia catappa	36
Figura 6. Molienda de Hojas de Terminalia catappa	37
Figura 7. Montaje del Equipo Soxhlet y Proceso de Destilación	38
Figura 8. Preparación Cajas de Petri	40
Figura 9. Esterilización del material	41
Figura 10. Cepas. Cepa Salmonella spp, ^b Cepa E. coli.	43
Figura 11. Activación de Salmonella spp	43
Figura 12. Activación de E. coli	44
Figura 13. Preparación del Antibiótico	45
Figura 14. Preparación de Tratamientos	46
Figura 15. Difusión en AMH	46
Figura 16. Fijación de Sensidiscos en AMH	47
Figura 17. Aplicación del Antibiótico	47

Figura 18. Aplicación del Extracto de Hojas Secas de Terminalia catappa	48
Figura 19. Tratamientos en Salmonella spp. (A Tratamiento 1, b Tratamiento 2, c Tratamiento 3)	48
Figura 20. Tratamientos en E. coli. (A Tratamiento 1, b Tratamiento 2, c Tratamiento 3)	48
Figura 21. Curva de Secado de la Hojas de Terminalia catappa	50
Figura 22. Peso de la Harina de Hojas de Terminalia catappa	51
Figura 23. Fragmentograma del Ácido p-cumárico	53
Figura 24. Tratamientos en Salmonella spp y E. coli luego de 24 h	54
Figura 25. Curva de Crecimiento de Halos de Inhibición	56

Introducción

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) son los principales focos de contaminación por microorganismos patógenos que afectan la salud de las personas y la calidad de los productos, es por esto, que en los últimos años se han desarrollado métodos para la conservación de los alimentos como aditivos de origen sintético, cuyo consumo frecuente puede generar enfermedades, motivo por el cual la ciencia e industria alimentaria investiga nuevas técnicas para encontrar antimicrobianos naturales que inhiban el crecimiento fúngico como el bacteriano, mejorando de esta manera la calidad de los productos y dé paso a una nueva vía en el desarrollo y uso de conservantes de origen natural, como lo son los extractos de plantas, que gracias a la presencia de compuestos fenólicos en su composición brindan beneficios ya sea antioxidantes, conservantes, colorantes y antimicrobianos.

En Norte de Santander, específicamente en Cúcuta, una de las ciudades más arborizadas del país son pocas las investigaciones que se encuentran respecto a los residuos de poda y jardinería. Es así como el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana in vitro del extracto de *Terminalia catappa* en *Escherichia coli* y *Salmonella spp* bacterias patógenas de origen alimentario, aportando a la comunidad científica y académica un avance en la investigación sobre los aditivos naturales para alimentos. El trabajo se desarrolló en tres etapas: En la primera se recolectaron hojas de Almendrón (*Terminalia catappa*) y se secaron para obtener harina usada en la obtención de compuestos fenólicos mediante extracción por Soxhlet, en la segunda etapa, se identificaron estos compuestos en el laboratorio de cromatografía (CROM-MASS), de la Universidad Industrial de Santander (UIS) y finalmente se llevó a cabo un ensayo basado en tres réplicas donde se adicionaron diferentes concentraciones en los cultivos,

las cuales se evaluaron mediante análisis de cromatografía, análisis microbiológico y análisis estadístico (Excel), concluyendo de esta forma que el extracto de *Terminalia catappa* presenta un efecto inhibitor en *Salmonella spp* y *E. coli*, microorganismos de interés para la industria alimentaria.

1. Descripción del problema

1.1 Título

Potencial antibacteriano del extracto de hojas de almendrón (*Terminalia Catappa*)

1.2 Planteamiento del problema

Los alimentos mal manipulados son foco de transmisión de enfermedades causadas por bacterias, virus, toxinas, parásitos, metales y priones que afectan la salud pública (Olea et al., 2012). Uno de los desafíos más grandes para la industria alimentaria es su conservación, es decir, evitar que los microorganismos ataquen los productos y los descompongan ocasionando pérdidas económicas (Rodríguez et al., 2014), generando lo que se conocen como Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), que a su vez puede resultar en intoxicaciones o infecciones que repercutan la salud de los consumidores.

A nivel mundial, anualmente, una de cada diez personas se enferma por alimentos contaminados con agentes microbianos o químicos, lo que genera 600 millones de enfermedades y cobra la vida de 420.000 personas. (Havelaar et al., 2015).

Las ETAs son un problema del que no escapan los propios países industrializados (Quinlan, 2013), en Estados Unidos cada año aproximadamente 9,4 millones de personas desarrollan ETAs causadas por patógenos conocidos. (Richardson et al., 2021). En Europa, la enfermedad de transmisión alimentaria más frecuente en 2017 fue la campilobacteriosis (European Food Safety Authority [EFSA] & European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC], 2018) y

específicamente en España, el Departamento de Seguridad Alimentaria del Ayuntamiento de Madrid notificó al Servicio de Salud Pública de la Comunidad un brote de gastroenteritis aguda en población infantil originado por *Campylobacter jejuni* . (Mata et al., 2020).

Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que, en los países menos desarrollados, las ETAs son la principal causa de enfermedad y muerte, asociadas a una carga socio-económica significativa. (Hall et al., 2006; World Health Organization, 2015).

Santos (2017), señala en su informe sobre las ETAs, que 77 millones de personas en América se enferman anualmente al consumir alimentos contaminados, de las cuales mueren alrededor de 9.000 al año y 31 millones son menores de 5 años. En Colombia, aunque los brotes por ETAs en el 2020 disminuyeron respecto al año anterior, posiblemente por el lavado de manos frecuente y cierre de muchos lugares debido a la contingencia por el COVID-19 se siguen reportando brotes. Para el inicio del 2020 se reportaron 4550 casos originados de 483 brotes presentados, cuyo promedio por semana epidemiológica fue de 9 (Instituto Nacional de Salud [INS], 2018), y tan solo en la semana 41 del 2022 se reportaron 272 casos de ETA's (INS, 2022), los cuales se relacionan con inadecuadas conservaciones, malos almacenamientos, fallas en la cadena de frío y contaminaciones cruzadas, propagando el crecimiento de agentes como coliformes fecales, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (INS, 2017). En el departamento de Norte de Santander, en el año 2019 se presentaron 36 brotes, siendo Cúcuta la ciudad más afectada con 109 personas provenientes de 17 brotes, es decir, un 47,22% respecto al total. (Instituto Nacional de Salud, 2022).

Con base a lo anterior, para prevenir la proliferación de agentes patógenos en los últimos años se han desarrollado diversos métodos de conservación para garantizar la seguridad alimentaria, valores nutricionales y características sensoriales de los alimentos que consumimos, pero algunos de estos métodos pueden tener efectos indeseables en el producto final, alterando sus propiedades organolépticas y nutricionales o generando problemas en la salud del consumidor (Quinto et al., 2019). Por ejemplo, en la industria cárnica se adicionan aditivos a los productos, con el fin de prolongar su vida útil, pero al ser de origen sintético, su uso es cuestionado por la seguridad alimentaria, ya que gracias a estudios clínicos se ha comprobado que estos aditivos presentan un efecto tóxico, razón por la cual se restringe y regula su uso en muchos países, debido a que altas cantidades pueden generar enfermedades como cáncer Armenteros et al. (2012).

Por tal razón, la ciencia e industria alimentaria intentan desarrollar nuevas técnicas y encontrar nuevos antimicrobianos naturales que inhiban el crecimiento fúngico como el bacteriano, mejorando de esta manera la calidad de los productos y dando paso a una nueva vía del desarrollo y uso de conservantes de origen natural (Tajkarimi et al., 2010). Por consiguiente, en Norte de Santander, específicamente en Cúcuta, una de las ciudades más arborizadas del país son pocas las investigaciones que se encuentran respecto a la temática abordada, razón por la cual es importante estudiar más a fondo este campo, ya que existen gran cantidad de antimicrobianos naturales que se pueden obtener de las plantas y ser adicionados en diferentes productos alimentarios.

1.3 Formulación del problema

¿Es posible utilizar el extracto de hojas secas de *Terminalia catappa* sobre bacterias patógenas *E. coli* y *Salmonella spp*?

1.4 Justificación

Los extractos de plantas brindan beneficios ya sea antioxidantes, conservantes, colorantes y antimicrobianos, la actividad proveniente de las hojas obtenidas de árboles o arbustos de este último ha sido de interés en los últimos años debido a su útil potencial en la conservación industrial de alimentos (Alarcón et al., 2016; Luján et al., 2012) y se atribuye esta característica a los compuestos fenólicos o terpénicos presentes en la composición de los mismos (Díaz et al., 2017).

A nivel internacional, países como España, Ecuador y México actualmente están extrayendo colorantes naturales de vegetales para su uso como aditivos naturales en la industria alimentaria (Gaitán, 2018; Horrillo et al., 2021; Llamuca, 2018; Montaña et al., 2018; Tierra, 2018; Tuitice & Jibaja, 2021), ya que presentan polifenoles, sustancias con propiedades antioxidantes que pueden impactar en la prevención del daño oxidativo, relacionado con el inicio de diversas enfermedades. Por lo general, son bioaccesibles y biodisponibles mediante vías mecánicas, enzimáticas y químicas (Cereceres et al., 2019), presentando una variedad de efectos positivos, como lo son la capacidad antioxidante (A. Vega et al., 2017), antimicrobiana (Borrás et al., 2015), anticancerígena (Choi et al., 2011), entre otras, esto debido al poder antioxidante que presentan (Martin, 2018). Según estudios realizados en Cuba por Marrero & Morales (2016), en

Nigeria por Oyeleye et al. (2018) e Indonesia por Allyn et al. (2018) la *Terminalia catappa* contiene cantidad de compuestos metanólicos como: Ácido gálico, elágico, oxopentanóico que presentan una capacidad antioxidante y antimicrobiana, específicamente en sus hojas y la corteza del árbol, por esta razón en Perú, ha sido usado en filtrantes (Carrión & Chavesta, 2019), contra microorganismos como *Staphylococcus aureus* (Allyn et al., 2018). En Colombia, se están realizando estudios sobre la extracción de los compuestos activos de vegetales y sus pigmentos (Ballesta, 2022; Cubillos & Pava, 2021; Garzón, 2018), con el fin de evaluar su adición en la producción de alimentos para su conservación, área ampliamente estudiada que ha ido mejorando con el paso de los años, pero, muchas veces implementar estrategias no es suficiente, ya que se siguen evidenciando la presencia de patógenos en alimentos, ya sea por una mala manipulación o fallas en la cadena de frío, es por esto, que algunos microorganismos como *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, son los más frecuentes en la industria alimentaria.

Se ha encontrado presencia de estos patógenos en pollo (Araujo, 2018; López et al., 2018; Villacís, 2020), pollo asado (Huete & Brenes, 2019), carne molida (Alves, 2017; Cabrera et al., 2013), carne de cerdo (Púa & Navas, 2014), carne bovina (Vera & Vilela, 2021) y carne fresca (Mantilla, 2019). Su proliferación es más frecuente en alimentos perecederos, como en el caso de las carnes que como se mencionaba anteriormente, por su alto contenido en agua, composición y pH, favorecen la alteración, contaminación microbiana y descomposición rápida, lo que a su vez hace que los productos cárnicos procesados sean de alto riesgo para la salud pública (Ministerio de Salud y Protección Social, Minsalud 2015), motivo por el cual, los resultados obtenidos de la investigación pueden ser una base para su uso como aditivos en productos cárnicos. En el departamento Norte de Santander, para el año 2021 se generaron 951.060 kilogramos de residuos de poda y jardinería, debido a que se cuenta con grandes áreas de vegetación (Instituto

Colombiano de Bienestar Familiar [ICBF], 2022), así mismo, cabe mencionar que en el año 2019 cierta cantidad de este tipo de residuo fue aprovechado para compostaje y el resto se entregó a la empresa VEOLIA ASEO CÚCUTA S.A. E.S.P. para su recolección y disposición final (ICBF, 2020).

De esta manera, se evidencia una ausencia sobre investigaciones enfocadas al aprovechamiento de estos residuos (exceptuando el compostaje) y la *Terminalia catappa* (almendrón), el cual es un árbol que se puede encontrar con facilidad en las calles y alrededores de la ciudad, motivo por el cual nace el interés por investigar sobre su composición y posibles usos en la problemática abordada de las ETAs, aditivos y conservación de los alimentos. Con base a lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antibacteriana in vitro del extracto de *Terminalia catappa* sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp* bacterias patógenas de interés alimentario a través de una metodología experimental teniendo en cuenta seis fases.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general. Evaluar la actividad antibacteriana in vitro del extracto de *Terminalia catappa* en *Escherichia coli* y *Salmonella spp* bacterias patógenas de origen alimentario.

1.5.2 Objetivos específicos. Identificar la presencia de compuestos fenólicos en el extracto de las hojas de *Terminalia catappa* (almendrón)

- Analizar el efecto de inhibición del extracto de *Terminalia catappa* en *E. coli* y *Salmonella spp.*

- Determinar la variabilidad de inhibición del extracto en *E. coli* y *Salmonella spp.* mediante Excel.

2. Marco referencial

2.1 Antecedentes

2.1.1 Internacionales. Mora, Parra, Chaverri y Arias (2013) **Determinación de la capacidad antimicrobiana del té verde (*Camellia sinensis*) contra los agentes potencialmente patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.** [Universidad de Costa Rica], Costa Rica.

Mora et. al , determinaron el potencial del efecto antimicrobiano contra cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 50 muestras diferentes de té verde seco y en infusión al 10%. El etanol fue el solvente que mostró mayor eficiencia. No hubo efecto antimicrobiano de diferentes muestras contra los microorganismos evaluados, menos *Listeria monocytogenes*, en el cual se evidenció un efecto inhibitorio en concentraciones de 10,5 y 1,05 mg/ml de los extractos en el 70% de marcas analizadas y en el control. Ninguna de las infusiones evaluadas, incluyendo la de té verde control mostró efecto inhibitorio contra esta bacteria.

Allyn, Kusumawati y Nugroho (2018) **Actividad antimicrobiana de extractos de hojas marrones de *Terminalia catappa* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853** [Universidad de Mulawarman], Indonesia.

Allyn et. al, determinaron los efectos de varias concentraciones de extracto de hojas marrones de *Terminalia catappa* que pueden inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y

Pseudomonas aeruginosa. Los extractos se obtuvieron usando etanol al 95%, filtrando, evaporando e identificando los componentes de dichos extractos. Con este estudio concluyeron que a mayor sea la concentración del extracto, mayor será el diámetro de la zona de inhibición para ambas bacterias. *P. aeruginosa* fue más resistente a altas concentraciones de los extractos etanólicos de las hojas marrones de la *Terminalia Catappa*.

Espinoza, Ortiz y Mejía , (2017). **Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las hojas *Laurus nobilis* y *Thymus vulgaris***. [Universidad nacional de Chimborazo], Ecuador.

Espinoza et. al (2017), evaluaron el efecto antimicrobiano de las hojas deshidratadas de *Laurus nobilis* (Laurel) y *Thymus vulgaris* (tomillo), para ser implementados como conservantes naturales, con el fin de reducir la carga microbiana de alimentos de alto consumo. Se determinó la concentración mínima inhibitoria, la cual fue probada frente a la cepa *Staphylococcus aureus*. Esta investigación concluyó que a concentraciones 175 y 200 mg/ml de laurel y 125,175 y 200 mg/ml de tomillo había presencia de un halo inhibitorio, por lo que constituye una fuente muy importante de extractos antimicrobianos, para el control de *Staphylococcus aureus*, uno de los contaminantes principales de los alimentos.

2.1.2 Nacionales. Tofiño, Ortega, Herrera, Fragoso y Pedraza (2017). **Conservación microbiológica de embutido cárnico artesanal con aceites esenciales *Eugenia caryophyllata***

y *Thymus vulgaris*. [UDES, Universidad popular del Cesar, Universidad de Antioquia], Colombia.

Tofiño et. al (2017), evaluaron el efecto de la adición de los aceites esenciales de tomillo y clavo sobre la calidad microbiológica y sensorial del chorizo artesanal producido en Valledupar. La extracción de estos aceites, se realizó mediante un método convencional de hidrodestilación con vapor de agua, seguido de esto se realizaron unas pruebas sensoriales descriptivas del olor y sabor en comparación con los aceites comerciales. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana, se utilizaron cepas de *S. aureus* coagulasa positiva, *E. coli* y *Salmonella spp.* Con este estudio llegaron a la conclusión que los aceites esenciales de tomillo y clavo poseen propiedades antimicrobianas las cuales tienen la capacidad de mantener las características organolépticas en embutidos elaborados de forma artesanal, siendo el tomillo el de mayor efectividad.

Pastrana, Durango y Acevedo (2017). **Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos.** [Universidad de Córdoba y Cartagena], Colombia.

Pastrana et. al., estudiaron el efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos como la *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* utilizando el método de difusión agar y diluciones dobles en caldo. Estos extractos de canela y clavo no provocan ningún efecto antimicrobiano sobre *Salmonella spp.*, mientras en concentraciones elevadas (100 y 150 mg/ml), mostraron un efecto antimicrobiano sobre *E. coli* y *S. aureus*.

Castaño, Ciro, Zapata, Jiménez (2010). **Actividad bactericida del extracto etanólico y de aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario.** [Universidad de Antioquia Medellín], Colombia.

Castaño et. al, evaluaron la actividad bactericida y determinaron la concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de Romero (*Rosmarinus officinalis*), sobre microorganismos de interés alimentario como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Lactobacillus plantarum*. Este aceite esencial exhibió un amplio espectro de acción microbiana tanto para bacterias gram positivas como gram negativas con una concentración entre 512 – 4096 ppm. El extracto etanólico mostró una actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. sonnei*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* con una concentración de 1024 ppm, por el contrario, el aceite de romero presenta una actividad mayor en los alimentos que los conservantes usados en la industria.

2.1.3 Regionales. Vega y Torres - (2021), Evaluación de compuestos fenólicos *Citrus sinensis* y su capacidad antioxidante. [Universidad Francisco de Paula Santander], Colombia.

Vega y Torres, evaluaron los compuestos fenólicos, los cuales fueron extraídos de la naranja valenciana (*Citrus sinensis*), cuyo propósito es ser aplicados en la industria cárnica como antioxidantes, donde el método que tuvo un porcentaje significativo en la extracción de estos compuestos fenólicos fue el de Soxhlet, también se usó la cromatografía por HPLC/DAD para la identificación y la actividad antioxidante se usó la decoloración del beta caroteno. Los compuestos fenólicos se aplicaron a un embutido (chorizos) crudos frescos, en la cual se

concluyó que las cascarras de *Citrus sinensis* tienen una alta capacidad de inhibir la oxidación de los productos cárnicos.

2.2 Marco teórico

Aspectos Generales del Almendrón (*Terminalia catappa*)

Terminalia Catappa, es un árbol nativo del sudoeste asiático. El nombre genérico de esta planta se origina en el latín “*Terminalis*”, refiriéndose a las hojas que están en los extremos de los brotes del árbol.

Es un árbol grande que crece bien en climas subtropicales y tropicales (Vijaya et al., 2015). Esta planta también se conoce como el almendro de la india, almendro de playa o almendro tropical, el cual se origina al sur este de Asia, donde actualmente su extensión alcanza a los países con zonas tropicales. (Olórtogui, 2014).

Según Buenaño y León (2016), el almendrón es cultivado en los países latinos como México, Colombia, Venezuela y Ecuador, tanto es así que esta planta se ha naturalizado y se planta extensamente en las tierras bajas tropicales en el resto del mundo.



Figura 1. Árbol Terminalia catappa. Fuente: Clipartmax

Este árbol es característico por ser una planta ornamental de sombra, crece en una variedad de suelos como arenoso o margoso, también tiene un comportamiento efectivo en los suelos arcillosos, en especial los que quedan cerca al mar, debido a que estos pueden soportar el rocío salino. (Hernández et al., 2013).

La *Terminalia catappa* crece a una altura de 35 m con una corona vertical, simétrica y ramas horizontales. Sus ramas están ordenadas característicamente en niveles. Estas hojas son grandes, tienen las siguientes dimensiones, 15 - 25 cm de largo y 10 – 14 cm de ancho, de forma ovoide, verde claro, verde oscuro y coriáceo. Este árbol produce un fruto que son una drupa de 5 a 7 cm de largo y 3 – 5.5 cm de ancho, verde y luego amarillos, y brillantes maduros, que contienen una sola semilla esta es comestible si está completamente madura. (Vijaya et al., 2015).

Tabla 1. Ficha Taxonómica del Almendrón (*Terminalia catappa*).

Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Myrtales

Familia	COMBRETACEAE
Género	Terminalia
Especie	Catappa L.
Nombre botánico	<i>Terminalia Catappa Linn.</i>
Nombre Común	Almendro, falsa castaña, almendrón.

Nota: Fuente: Buenaño & León (2016). Obtención de un alelopático para usos veterinario a partir del aceite de la semilla de almendrón (*Terminalia catappa*) [Universidad de Guayaquil

Componentes Principales

Gao et al., (2010) identificaron varios fitoconstituyentes de los frutos, semillas, hojas y cortezas de la *Terminalia Catappa*. La fruta tiene 1,95 g de proteína, 12,03 g de carbohidratos y 1,21 g de ceniza. El β -caroteno 2,090 μ g y vitamina C 138,6 mg están presentes en altas cantidades. La semilla está compuesta por aceite fijo (51, 2%), oleína (54%) y estearina (46%). Las semillas rinden 4,13 % de humedad, 4,94% crudo de fibra, 23,78% proteína bruta, 4,27% ceniza, 51,80% grasa y 16,02% carbohidrato; el poder calorífico total es de 548,78 kcal. (Mininel et al., 2014), pudo aislar la punicalagina (polifenol), sus derivados y otros compuestos presentes de las hojas de la *Terminalia*. Mediante varios análisis se ha demostrado que este árbol presenta una gran importancia a nivel medicinal, debido a que posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antidiabéticas, anticancerígenos, entre otras (Hevira et al., 2021), su composición es rica en fenoles, flavonoides, taninos, saponinas, entre otros (Yakubu et al., 2020), sobre todo presentes en sus hojas como por ejemplo la vitexina, isovitexina, rutina, ácido gálico, ácido elagico, punicalagina y punicalina (Marrero & Morales, 2016).

▪ Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que han demostrado una actividad microbiana los cuales se pueden encontrar en extractos vegetales (Rodríguez et al., 2015), ya que las plantas lo pueden sintetizar, en diferentes ocasiones esto les sirve como un mecanismo de defensa ante posibles enemigos que pueden perjudicarlas, pero también son de importancia porque son los responsables de la coloración específica de cada planta.



Figura 2. Hojas de Terminalia catappa

El contenido total de polifenoles presentes en las hojas de la *Terminalia catappa* fue de 184,6 (mg pirogalol / 100 g extracto). En el cual se detectaron 37 compuestos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Este extracto está compuesto de manera general por ácidos polifenólicos como el ácido gálico, ácido vanílico, ácido 3,4- dihidroxibenzoico, ácido 2,5-dihidroxi-benzoico y ácido 4- hidroxibenzoico. También se detectaron otros compuestos con elevados contenidos como ácido elágico y ácido levulínico. Pero los ácidos gálico y elágico fueron los que presentaron contenidos mayores en las hojas de la *Terminalia Catappa*. (Marrero & Morales, 2016).

Métodos de obtención de extractos vegetales

Extracción Asistida por Ultrasonido: Es un método amigable con el medio ambiente, ha sido la más utilizada en investigaciones recientes ya que se han reportado altos rendimientos en la obtención de compuestos bioactivos con menor cantidad de disolvente y en tiempos cortos de extracción. (Wong et al., 2020).

Soxhlet: Es una técnica muy común que es utilizada para la separación sólido – líquido, el cual permite extraer aquellos compuestos que contiene una muestra sólida, con la ayuda de un disolvente donde tiene un reflujo continuo a través del equipo, evitando así la disminución del volumen. (Valencia, 2018).

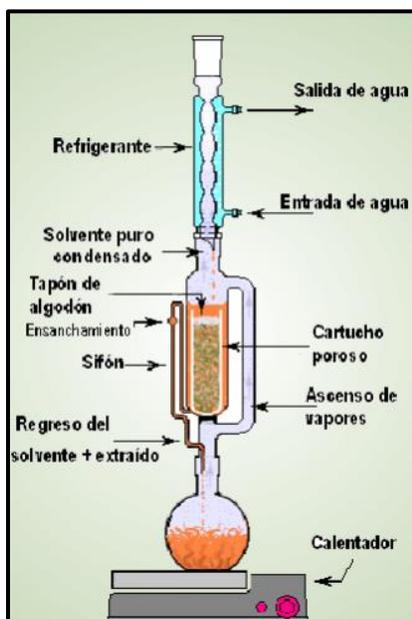


Figura 3. Método Soxhlet. Fuente: (Jiménez, 2014)

La extracción Soxhlet es la técnica que consiste en montar el soporte universal y la manta de calentamiento, luego depositar las perlas de ebullición en el matraz de balón, colocar el matraz en la manta de calentamiento, llenar o poner cantidad suficiente del solvente para colocar una de las pinzas de tres dedos en el soporte, ajustamos la boca del matraz con las pinzas para que no se mueva, se posiciona otras pinzas de la misma manera y ajusta el extractor Soxhlet, para que quede fijo, sin riesgos de caer.

Depositamos dentro del Soxhlet el cartucho de celulosa con la muestra dentro, en la parte superior se sitúa el refrigerante fijamente y por último conectamos las mangueras al refrigerante, que a su vez va al reciclador. Seguidamente se calienta el disolvente extractante, situado en el matraz, se condensan sus vapores que caen gota a gota sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el disolvente de separación sólido-líquido comúnmente usada para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza.

Maceración: Consiste en colocar en contacto el material vegetal seco y pulverizado junto con un solvente adecuado, el cual puede ser agua, un alcohol alifático o bien la mezcla de ambos, estos deben mantenerse en contacto por un periodo considerable de tiempo hasta conseguir la extracción deseada. La eficiencia de este método depende de algunos factores que pueden ser controlables y no controlables (Duarte et al., 2020). La extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas se realiza por diferentes métodos los cuales son:

Destilación por Arrastre de Vapor: La vaporización sucede de manera selectiva por el componente volátil, gracias a la acción directa del vapor del agua debido a que condensa generando una diferencia entre el calor latente ocasionando dos gases las cuales son la orgánica y la acuosa, al ser un producto destilado (volátil) permite la separación del producto (aceite) del agua, posee ventajas como el procedimiento es de bajo costo por lo que su método es sencillo pero su desventaja es que el rendimiento es bajo en comparación de los otros métodos de extracción.

Extracción de Fluidos Supercríticos: Es posible la extracción del aceite esencial por este método debido a que se trabajan temperaturas y presiones críticas siendo controladas por un regulador de contrapresión y un calentador, se puede realizar con CO₂ las ventajas de este método es que los tiempos de extracción son reducidos, obtención de rendimientos mayores, seleccionando sustancias y composición de los extractos, cambiando sus parámetros requiriendo menos energía, siendo su principal desventaja es que los compuestos de alto nivel molecular se extrae junto con el aceite esencial.

Escherichia coli

▪ Características

La *E. coli* es una bacteria que pertenece a la familia de las enterobacterias la cual forma parte del microbiota del tracto gastrointestinal de animales que mantienen la temperatura corporal dentro de unos límites independientes de la temperatura ambiental, es decir, animales de sangre caliente, como por ejemplo el ser humano. (Allocati et al., 2013). Es un bacilo gram negativo, no

exigente, oxidasa negativa, catalasa positiva, anaerobio facultativo, cuya temperatura de crecimiento preferente es a 37 °C (mesófilo), fimbriado y comúnmente es móvil por flagelos peritricos. Esta bacteria se encuentra abundante en el tracto gastrointestinal, siendo esencial para el funcionamiento correcto del proceso digestivo acompañado de otros microorganismos, también participa en la producción de las vitaminas B y K (Croxen et al., 2013). Al ser parte del sistema digestivo de los seres humanos y parte de la flora intestinal se puede usar como indicador favorito para encontrar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la seguridad de los alimentos y el agua. (Anderson et al., 2005).

▪ Grupos Patógenos

Al ser un residente inocuo del tracto gastrointestinal, varios estudios han documentado que ciertas cepas de *E. coli* producen diarrea y otras enfermedades extraintestinales en humanos (Estrada et al., 2009). Algunas *E. coli* son patógenas y pueden contaminar los alimentos, el agua y el medio ambiente (Kaper et al., 2004), constituyen un grupo heterogéneo de organismos distintas propiedades de virulencia, epidemiología y enfermedades asociadas. Con base en sus circunstancias de virulencia específicos y rasgos fenotípicos se han dividido en seis grupos patógenos; *E. coli enteropatogénica* (EPEC), *E. coli enteroagregante* (EAEC), *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), *E. coli de adhesión difusa* (DAEC), *E. coli enteroinvasora* (EIEC) y *E. coli enterohemorrágica* (EHEC). (Canizalez et al., 2013).

▪ Presencia en Alimentos y Sintomatología

Estos grupos han sido detectados en diferentes productos, como cárnicos, lácteos, pescados, mariscos, bebidas, hielo y leguminosas. (Canizalez et al., 2013).

La *E. coli* O157:H7 se encuentra regularmente en las heces del ganado sano y se puede transmitir al hombre principalmente por la ingestión de productos bovinos, aunque también se ha relacionado con la leche no pasteurizada, bebidas contaminadas, verduras frescas y a través del contacto persona a persona (Canizalez et al., 2013). Es reconocida como uno de los serotipos más representativos de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), capaz de producir dos tipos de toxina shiga, Stx1 y Stx2, que ocasionan diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. (Soto et al., 2016).

Hay varios estudios que se han realizado para determinar la presencia de *E. coli*. Un artículo publicado en el 2013 en Cartagena de indias, señaló e identificó el serotipo O157: H7 presente en la carne de cerdo, la cual es comercializada en diferentes supermercados de la ciudad, durante el periodo de agosto y septiembre del 2008. Donde de 60 muestras analizadas se obtuvo 36 con *E. coli*. En niveles no aceptables según las exigencias del instituto Nacional de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) (Franco et al., 2013). También se han encontrado presencia de *E. coli* en carne, vegetales, pescado fresco, huevos. (Loaiza et al., 2011), ensaladas y salsas (Serna et al., 2012). Existen diferentes cepas de *E. coli* que causan enfermedades humanas las cuales se clasifican según el tipo de síntomas que producen; se han encontrado que de los cinco grupos de cepas, *E. coli* serotipo O157:H7 (Entero Hemorrágica, ECEH) es el patógeno emergente más importante con relación en la salud pública por ser la causante de enfermedades transmitidas por

los alimentos (ETAS) en el mundo, pueden causar una diarrea no sanguinolenta hasta una colitis hemorrágica (CH); esta enfermedad puede agravarse hasta el desarrollo de un síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica trombótica e insuficiencia renal aguda, que puede progresar a insuficiencia renal aguda, que puede progresar a insuficiencia renal crónica, que puede complicar la vida de las personas, aproximadamente del 3 a 5 % de la personas infectadas principalmente en niños, ancianos y pacientes inmunosuprimidos. (Franco et al., 2013).

Salmonella spp

▪ *Características*

Fue descubierta y aislada del intestino de cerdos infectados por la peste porcina clásica, una enfermedad viral, por Theobald 1855 y 1884 Smith trabajaba en conjunto con Daniel Elmer Salmon, patólogo, de cuyo apellido se generó el nombre del género. Desde ese entonces la nomenclatura de la salmonella ha sido controvertida y continúa evolucionando (Shu et al., 2015). Es un género bacteriano de la familia *Enterobacteriaceae* constituido por bacilos Gram negativo intracelulares anaerobios facultativos con flagelos peritricos. Constituye un grupo muy importante de patógenos para animales y personas (Barreto et al., 2016). El género salmonella tiene gran impacto en la salud pública; datos epidemiológicos indican que la gastroenteritis y la fiebre tifoidea son de disposición mundial, y ocurren en países desarrollados y subdesarrollados. (Soto et al., 2016).

▪ *Grupos Patógenos*

Esta bacteria está compuesta por dos especies las cuales son: *S. entérica* y *S. bongori* de las cuales la *S. entérica* representa la especie de mayor patogenicidad (Barreto et al., 2016), es la especie tipo y se divide en seis subespecies que incluyen sobre 2500 serotipos (Su & Chiu, 2007). Las *salmonellas* no tifoideas principalmente los serotipos de salmonella entérica, son las que se relacionan con gastroenteritis de origen alimentario. Los alimentos en los que se han detectado esencialmente este patógeno como es la carne de pollo, carne de cerdo, carne de pavo, productos con carne cruda, huevos y jamón de cerdo. (Favier et al., 2013).

Microbiológicamente los métodos que se realizan para detectar se fundamentan en el cultivo microbiológico, pero el aislamiento se dificulta por el bajo número de células presentes en el alimento y la inhibición por otros microorganismos, crece con facilidad en agar sangre la cual forma colonias de 2 a 3 mm, en otros laboratorios se aísla con medios selectivos, con el fin de inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas y de la flora intestinal saprofita. (Soto et al., 2016).

El género *salmonella* tiene gran impacto en la salud pública; datos epidemiológicos indican que la gastroenteritis y la fiebre tifoidea son de disposición mundial, y ocurren en países desarrollados y subdesarrollados (Soto et al., 2016). En la actualidad, existe unas preocupaciones relacionadas con el patógeno este aumenta la resistencia a los antibióticos, ya que cada vez son más frecuentes los aislamientos de origen animal y alimentarios resistentes a antibióticos como la penicilina, ácido nalidíxico y sulfafurazol, es por esto que diversos esfuerzos están

enfocándose en la prevención, con el diseño de vacunas para animales y la implementación de tecnologías de control en la industria de alimentos. (González et al., 2014).

▪ ***Presencia en Alimentos y Sintomatología***

La *Salmonella spp* se trasmite por la ruta fecal- oral, ya sea directa o indirectamente a través de los alientos. Es capaz de sobrevivir la acidez del estómago y la osmolaridad del intestino delgado (Barreto et al., 2016). En unos estudios realizados en Colombia, entre 2010 y 2013 que buscaron este patógeno en alimentos se centraron en el análisis de muestras provenientes de diferentes establecimientos de ventas ambulantes y restaurantes.

Los resultados obtenidos señalan que el 25 % de los alimentos ambulantes y el 7,5 % de los alimentos de venta establecida, como chorizo, fritos, ensaladas de frutas, yogur con cereal, arepa rellena y pincho de carne, fueron positivos para *Salmonella spp*. En este estudio también se realizó coprocultivo a los manipuladores de alimentos para la búsqueda de este microorganismo, y se obtuvo una prevalencia del 15 % en ambulantes y 10 % en restaurantes; y se resalta que este personal no presentó manifestaciones gastrointestinales. (Bayona, 2012).

La salmonelosis es una enfermedad no contagiosa de transmisión alimentaria, en especial por alimentos de origen animal; pueden aparecer en brotes en [escuelas](#), [guarderías](#), restaurantes y residencias de ancianos. El período de incubación es por lo general entre doce a treinta y seis horas, a veces hasta seis a cuarenta y ocho horas. La *salmonella* habita normalmente en la superficie de los huevos, la piel de tomates y de aquellos frutos y verduras que tienen contacto con la tierra. (Bayona, 2012).

3. Metodología

3.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación que se desarrolló en el proyecto fue de tipo experimental, debido a que la población estudiada se escogió de manera específica y aleatoria. En este caso, se extrajeron compuestos fenólicos de hojas secas de la *Terminalia catappa*

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población. La población trabajada en la investigación está conformada por las hojas de *Terminalia catappa*

3.2.2 Muestra. La muestra de esta investigación está conformada por 6.900 gramos (g) de hojas de *Terminalia catappa*

3.3 Fases de la Investigación

3.3.1 Fase I. Recolección y Adecuación de la Materia Prima. En la primera etapa de la investigación, se adquirieron y prepararon las hojas de *Terminalia catappa*. Estas hojas fueron

recolectadas a los alrededores de Universidad Francisco de Paula Santander en Cúcuta. (Ver figura 4).



Figura 4. Recolección de la Materia Prima

La materia prima recolectada se pesó utilizando una balanza digital para determinar la cantidad de material con el que se trabajó.

3.3.2 Fase II. Troceado y Secado. Seguidamente se procedió a cortar las hojas de *Terminalia catappa*, para posteriormente ser colocadas en el horno y facilitar el proceso. (Ver figura 5).



Figura 5. Secado de las Hojas de Terminalia catappa

Una vez que las hojas de *Terminalia catappa* estuvieron completamente secas, se procedió a molerlas utilizando un molino manual, para obtener una harina fina que permitiese obtener los extractos fenólicos. (Ver figura 6).



Figura 6. Molienda de Hojas de Terminalia catappa

3.3.3 Fase III. Extracción de Compuestos Fenólicos. Posteriormente se realizó la extracción del aceite mediante la utilización de un equipo Soxhlet en una extracción sólido-líquido, en la cual se utilizó etanol al 70% como solvente. Una vez finalizado el proceso de extracción, se llevó a cabo una destilación simple para obtener una muestra más pura y recuperar parte del solvente utilizado. Se calentó la mezcla de extracto y solvente suavemente en un matraz de destilación. El solvente, al tener un punto de ebullición más bajo que el aceite, se evaporó y se condensó en un condensador para su recolección, el aceite se mantuvo en el matraz de

destilación, permitiendo obtener una muestra más concentrada y pura del aceite de *Terminalia catappa*. (Ver figura 7).



Figura 7. Montaje del Equipo Soxhlet y Proceso de Destilación

Posteriormente se tomó una muestra de aceite obtenida, con la cual se realizó el análisis por cromatografía tipo (HPLC/DAD) para determinar los compuestos fenólicos presentes.

3.3.4 Fase IV. Identificación de Compuestos Fenólicos. Para la determinación de los compuestos fenólicos, las muestras fueron preparadas disolviendo una mezcla de metanol: agua (1:1 v/v) con ácido fórmico 0.2% v/v, vórtex (5 min) y sonicación (5 min) y posterior inyección al equipo cromatográfico.

Como estándares de referencia se utilizaron las xantinas: cafeína (Part N° C8960-250G, SigmaAldrich), teobromina (Part N° T4500-25G, Sigma-Aldrich) y teofilina (Part N° T1633-25G, SigmaAldrich); las catequinas: (\pm)-catequina (C) (Part N° C1788-500MG, Sigma-Aldrich), (-)-epigallocatequina galato (EGCG) (Part N° E4143-50MG, Sigma-Aldrich), (-)-epicatequina (EC) (Part N° E1753-1G, Sigma-Aldrich), (-)-epicatequina galato (ECG) (Part N° E3893-10MG,

SigmaAldrich), (-)-epigallocatequina (EGC) (Part N° E3768-5MG, Sigma-Aldrich); los flavonoides: ácido caféico (Part N° C0625, Sigma-Aldrich), ácido p-cumárico (Part N° C9008, Sigma-Aldrich), ácido rosmarínico (Part N° 536954-5G, Sigma-Aldrich), quercetina (Part N° Q4951-10G, Sigma-Aldrich), naringenina (Part N° N5893-1G, Sigma-Aldrich), luteolina (Part N° L9283-10MG, Sigma-Aldrich), kaempferol (Part N° K0133-50MG, Sigma-Aldrich), pinocembrina (Part N° P5239, Sigma-Aldrich), apigenina (Part N° A3145-25MG, Sigma-Aldrich); las antocianinas: cianidina 3-rutinosido (Part N° G36428, Sigma-Aldrich), pelargonidina 3-glucósido (Part N° 53489, Sigma-Aldrich). El proceso se realizó en un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia (UHPLC), Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.), equipado con una bomba binaria de gradiente (HP G3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC 3000). La interfaz del LC-MS fue la electronebulización (ESI) y el espectrómetro de masas fue de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones Orbitrap. Operado en modo positivo con un voltaje de capilar de 3,5 kV. Columna Hypersil GOLD Aq (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100 x 2.1 mm, 1.9 μ m de tamaño de partícula) a 30 °C. La fase móvil fue A: una solución de ácido fórmico 0,2% v/v en agua, y B: ácido fórmico 0,2% v/v en acetonitrilo.

La condición inicial de gradiente fue de 100% A, cambiando linealmente hasta 100% B (8 min); se mantuvo durante 4 min; el retornó a las condiciones iniciales en 1 min; el tiempo total de corrida fue de 13 min, con 3 min para post-corrida. La identificación de los compuestos se realizó usando el modo de adquisición full scan y la extracción de corrientes iónicas (EIC) correspondientes a los $[M+H]^+$ de compuestos de interés, medición de masas con exactitud y precisión de Δ ppm < 1 y usando una solución-mix estándar de los compuestos (material de

referencia certificado), para la cuantificación de los analitos de interés se usó el método de estandarización externa.

3.3.5 Fase V. Evaluación Microbiológica. Para la elaboración de tratamientos se realizaron una serie de actividades previamente, las cuales se describirán a continuación:

▪ **Preparación y Esterilización del Material**

Las cajas de Petri fueron limpiadas utilizando un algodón humedecido en alcohol y luego se empacaron con papel Kraft.



Figura 8. Preparación Cajas de Petri

Se empacaron en papel Kraft tubos de ensayo (tapa rosca) de 10 ml. Se colocaron puntas para micropipetas, sensidiscos y tubos de eppendorf en frascos pequeños de vidrio, los cuales fueron sellados con papel aluminio y también se utilizó papel aluminio para envolver los hisopos. El material mencionado anteriormente se sometió a esterilización en el autoclave a 121 °C y 1 atm.



Figura 9. Esterilización del material

Después del autoclave, el material fue colocado en el horno para prevenir la contaminación.

Medios de Cultivo

▪ *Agar Nutritivo*

Se pesaron 2,3 g de agar nutritivo y se añadieron a un erlenmeyer. Luego se agregaron 100 ml agua destilada y se calentó la mezcla en una plancha de calentamiento hasta disolver completamente. Durante este proceso, se utilizó un agitador magnético para asegurar una distribución uniforme del agar en el agua. Posteriormente, la mezcla se esterilizó en el autoclave a 121 °C y 1 atm. y se vertió en cajas de Petri dentro de una cabina de flujo laminar. Después de que se enfriara y solidificara, el medio se almacenó en una nevera.

▪ *Agar Müller Hilton (AMH)*

Para la preparación del AMH se utilizaron los siguientes componentes (Ver tabla 2).

Tabla 2. Componentes del Agar Müller Hilton

Componentes	Cantidad (g/L)
Extracto de carne	2
Caseína hidrolizada	17,5
Almidón	1,5
Agar	17

Para la preparación del agar se calcularon cantidades para 1 litro, las cuales están establecidas en la tabla 2. Cada componente se pesó utilizando una balanza analítica y se agregó a un erlenmeyer, a excepción del agar-agar, el cual no se añadió.

Después de agregar los componentes al erlenmeyer, se añadió 1 litro de agua destilada al, midiendo el pH hasta obtener un rango de 7,2 a 7,4. Seguidamente se adicionó el agar-agar y se continuó realizando el mismo proceso del agar nutritivo.

▪ *Cepas*

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* del cepario de la Universidad Francisco de Paula Santander (Sede: Campos Elíseos). Para medir el potencial antibacteriano del extracto mediante el método de difusión en AMH, descrito por Allyn et al. (2018), con algunas modificaciones.

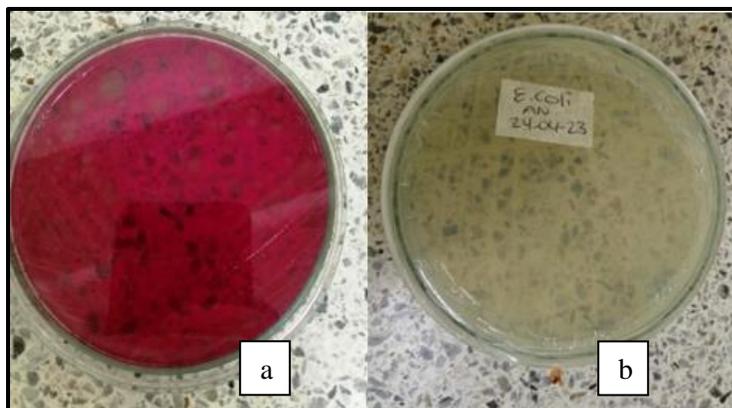


Figura 10. Cepas. Ceba *Salmonella* spp, ^bCeba *E. coli*.

Para la activación de las cepas, se utilizó la metodología empleada por Tofiño et al. (2017), en donde las cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp se activaron en agar nutritivo durante un período de 24 horas a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.



Figura 11. Activación de *Salmonella* spp



Figura 12. Activación de *E. coli*

▪ **Escala de McFarland**

Para la preparación de la escala de McFarland, se tomó como base la metodología empleada por Elles et al. (2010), en la cual se suspendieron las cepas certificadas en 10 mL de solución salina estéril en la cual se inocularon varias colonias de *E. coli* y *Salmonella spp.*

▪ **Control Positivo (Antibiótico)**

El antibiótico utilizado para el control positivo de la investigación fue el cloranfenicol de uso comercial. Para la preparación, se diluyó el polvo de una pastilla de 250 mg en 2 ml de agua destilada estéril en un frasco de ámbar (Ver figura 13).



Figura 13. Preparación del Antibiótico

▪ **Preparación de los Tratamientos**

Para la elaboración de los tratamientos, se implementó la metodología utilizada por Allyn et al. (2018) y Pastrana et al. (2017), en donde se diluyó el extracto de *Terminalia catappa* en dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó a diferentes concentraciones en tubos de eppendorf estériles (Ver tabla 3). Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento aplicado (Ver figura 14).

Tabla 3. Preparación de Tratamientos

Tratamiento	Concentración (%)	Extracto (μl)	DMSO (μl)
1	25	250	750
2	50	500	500
3	100	100	0



Figura 14. Preparación de Tratamientos

▪ **Difusión en AMH**

Para la difusión se utilizó la metodología empleada por Allyn et al. (2018). Se adicionó 100 μL de la concentración microbiana de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) que se obtuvo y se distribuyó mediante un hisopo estéril (100 μL) sobre la superficie del AMH que se preparó (Ver figura 15).



Figura 15. Difusión en AMH

Luego, con ayuda de unas pinzas estériles se fijaron cinco sensidiscos sobre el AMH



Figura 16. Fijación de Sensidiscos en AMH

Se manejó un control positivo y uno negativo en cada caja. Para el control positivo, se tomaron 10 μ l con una micropipeta de la dilución del antibiótico (ver figura 13) y se le adicionó al sensidisco estéril (Ver figura 17). Para el control negativo, se fijó el sensidisco estéril sin adicionar alguna sustancia.

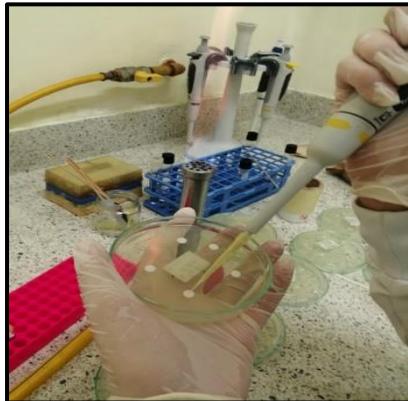


Figura 17. Aplicación del Antibiótico

En cuanto al extracto, se adicionó con ayuda de una micropipeta 10 μ l del extracto a los 3 sensidiscos restantes en cada caja de Petri de acuerdo a la concentración y tratamiento requerido. (Ver figura 18).



Figura 18. Aplicación del Extracto de Hojas Secas de Terminalia catappa

Finalmente, las cajas fueros marcadas y selladas con envoplast para ser incubadas a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

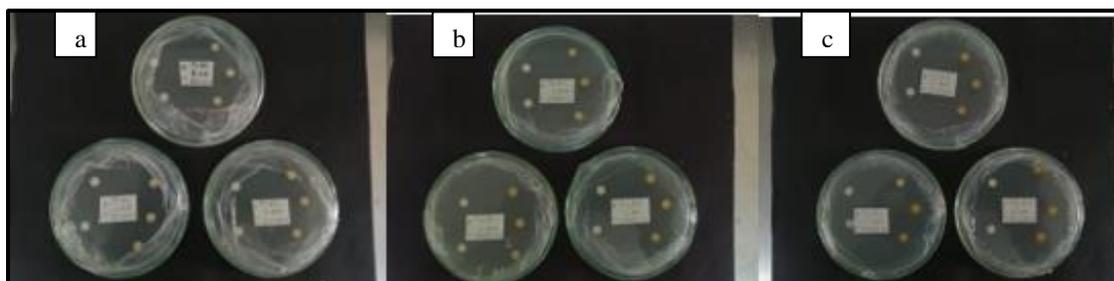


Figura 19. Tratamientos en Salmonella spp. (A Tratamiento 1, b Tratamiento 2, c Tratamiento 3)

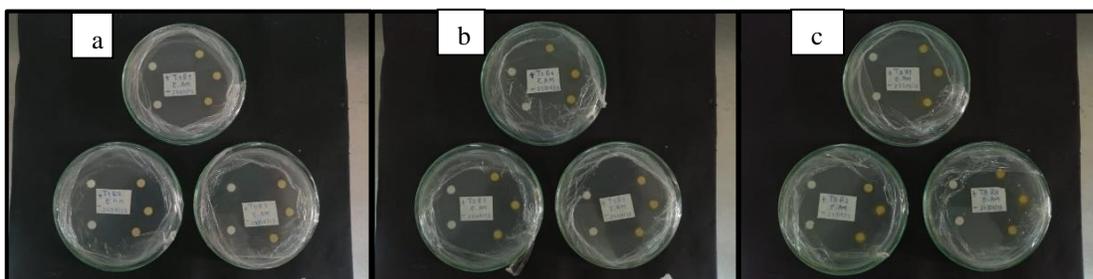


Figura 20. Tratamientos en E. coli. (A Tratamiento 1, b Tratamiento 2, c Tratamiento 3)

3.3.6 Fase VI. Análisis Estadístico. Se realizó un análisis de varianza teniendo en cuenta la variabilidad de los halos inhibición presentada en los diferentes microorganismos con respecto al extracto a diferentes concentraciones, para lo cual se utilizó Excel.

4. Resultados y discusiones

4.1 Fase I y II. Recolección, Adecuación de la Materia Prima, Troceado y Secado

Se recolectaron 6.900 g de hojas de *Terminalia catappa*, las cuales se sometieron a secado en un horno a una temperatura de 51°C por un tiempo de 8 horas en la cual se obtuvo un peso de 4.500g de hojas de *Terminalia catappa*. Para calcular el rendimiento de este proceso se dividió la cantidad obtenida en el proceso de secado sobre el peso inicial de las hojas, luego se multiplicó por 100, obteniendo un rendimiento del 66%.

En la figura 21 podemos evidenciar la diferencia entre el peso de las hojas recolectadas y el peso final obtenido del secado de las hojas de *Terminalia Catappa*, determinando la cantidad de humedad perdida en las hojas.

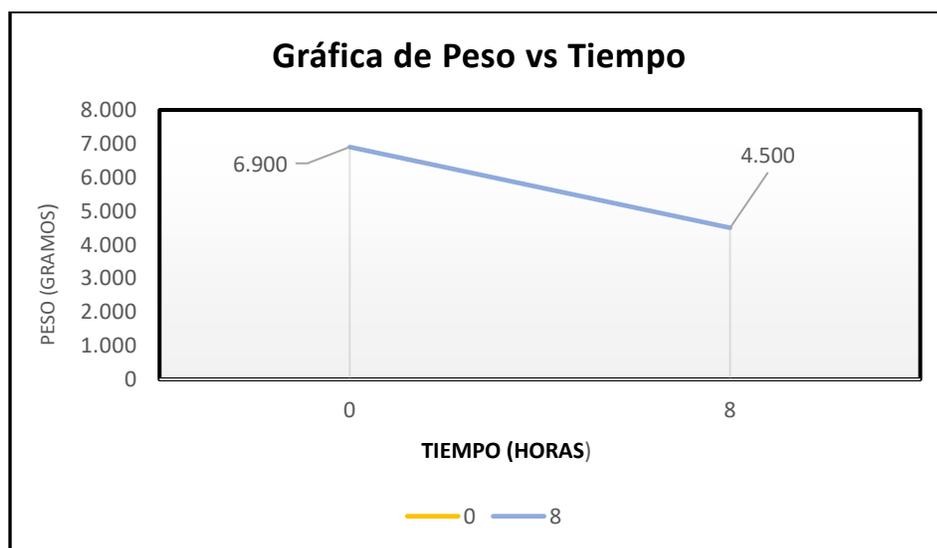


Figura 21. Curva de Secado de la Hojas de *Terminalia catappa*

Cuando las hojas estuvieron completamente secas, se molieron y se obtuvo 1.603g de harina de hojas de *Terminalia Catappa*, de la cual se generaron partículas con tamaños de entre 250 y 850 μm que de acuerdo con Castello et al (2017), esto facilita la extracción de aceites.



Figura 22. Peso de la Harina de Hojas de Terminalia catappa

4.2 Fase III y IV. Extracción e Identificación de Compuestos Fenólicos

En el proceso de extracción por el método Soxhlet se obtuvo 216 ml de extracto de hojas secas. Se calculó el rendimiento de este proceso dividiendo la cantidad obtenida sobre la cantidad adicionada en el montaje, luego multiplicado por 100, dando como valor un rendimiento del 86%, que a diferencia de Marrero y Morales (2016), fue de tan solo el 10,8% utilizando como solvente metanol. El solvente utilizado fue etanol al 70% al igual que en la metodología planteada por Vega y Torres (2021), con una variación en la concentración del alcohol. Los resultados arrojaron un mayor rendimiento en comparación con otros métodos como el ultrasonido (81,3%), esto se debe a que el rendimiento está ligado a varios factores entre los cuales destacan: La temperatura de extracción, tiempo de extracción y el tipo de solvente (Zurita

et al., 2021). Para el análisis cromatográfico tipo (HPLC/DAD) se analizaron 20 ml del extracto y se determinaron los siguientes compuestos fenólicos:

Tabla 4. Nivel mínimo de cuantificación (NMC=2NMD), tiempo de retención (t_R) y resultados de la determinación de compuestos fenólicos en extractos, por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS en la(s) muestra(s).

Compuesto	t _R , min	NMC*, mg Kg ⁻¹	Concentración en las muestras, mg kg ⁻¹
			993325-01-EB Muestra de extracto de hojas de almendrán
Teobromina	2,3	0,1	< 0,1
Teofilina	2,5	0,1	< 0,1
Epigallocatequina (EGC)	2,6	0,1	1,3
Catequina (C)	2,7	0,1	7,6
Epicatequina (EC)	2,9	0,1	5,3
Ácido p-hidroxibenzoico	2,9	0,1	< 0,1
Cafeína	2,8	0,1	< 0,1
Ácido cafeico	3,7	0,1	< 0,1
Ácido vanílico	2,9	0,1	50
Epigallocatequina galato (EGCG)	3,0	0,1	0,7
Ácido p-cumárico	3,3	0,1	121
Epicatequina galato (ECG)	3,4	0,1	3,9
Ácido ferúlico	3,4	0,1	9,6
Quercetina	3,2	0,1	91
Ácido rosmarínico	3,7	2,0	< 2,0
Cianidina	3,5	0,1	6,0
Luteolina	4,2	0,1	16
Kaempferol	4,6	0,1	4,8
Ácido trans-cinámico	4,4	0,4	< 0,4
Naringenina	4,6	0,1	2
Apigenina	4,5	0,1	1
Pinocembrina	5,5	0,1	< 0,1
Ácido ursólico	8,4	0,1	20
Cianidina 3-rutinosido	2,7	0,1	< 0,1*
Pelargonidinagg 3-glucósido	2,8	0,1	< 0,1
Kaempferol 3-glucósido	3,5	0,1	26
Rutina	3,2	0,1	81
Ácido gálico	1,9	0,1	< 0,1

Nota * Detectado por debajo del nivel mínimo de cuantificación y por encima del nivel mínimo de detección. Fuente: Laboratorio CROM-MASS

En la tabla 4 se evidenció la presencia de polifenoles en el extracto de hojas secas de *Terminalia catappa*, obteniendo ácido p-cumárico y quercetina en mayor proporción, los cuales tienen un alto potencial para ser usados como antioxidantes y antibacterianos (Martínez et al., 2002; Peñalver, 2021). En comparación con el proceso de extracción realizado por Marrero y Morales (2016), identificaron 37 compuesto polifenólicos como el ácido gálico, ácido vanílico, ácido protocatecúico, ácido 2,5-dihidroxi-benzoico y ácido 4-hidroxibenzoico, así como otras estructuras relacionadas con polifenoles como el ácido elágico y quercetina, este último reportado por Allyn et al. (2018), como el flavonoide de mayor concentración presente en el extracto. A continuación, se observa el perfil de cromatografía obtenido para el ácido p-cumárico siendo el polifenol de mayor abundancia reportado en el análisis de cromatografía realizado en el extracto de *Terminalia catappa*.

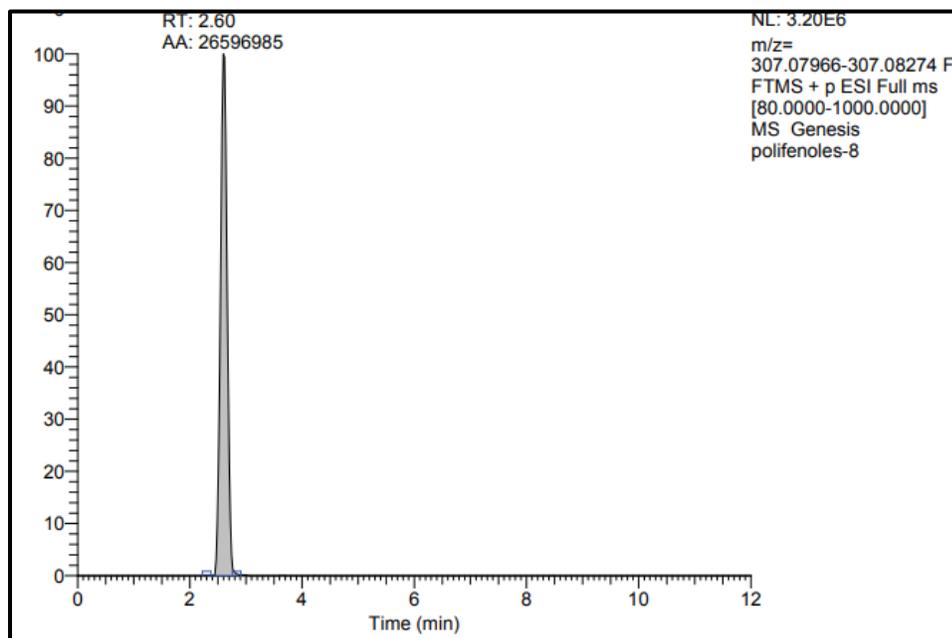


Figura 23. Fragmentograma del Ácido p-cumárico. Fuente: Laboratorio CROM-MASS

4.3 Fase V. Evaluación Microbiológica

Las cepas fueron activadas en AMH por 24 horas a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para la escala de McFarland se leyó la absorbancia y el resultado se comparó con la absorbancia del tubo 0.5 de la escala de McFarland, el cual obtuvo 0.153 para *E. coli* y para *Salmonella spp* de 0.147, valores que se encuentran en el rango establecido por Elles et al. (2010), posteriormente se evaluó la presencia de halos de inhibición producidos por los extractos *Terminalia catappa* a las 24 horas.

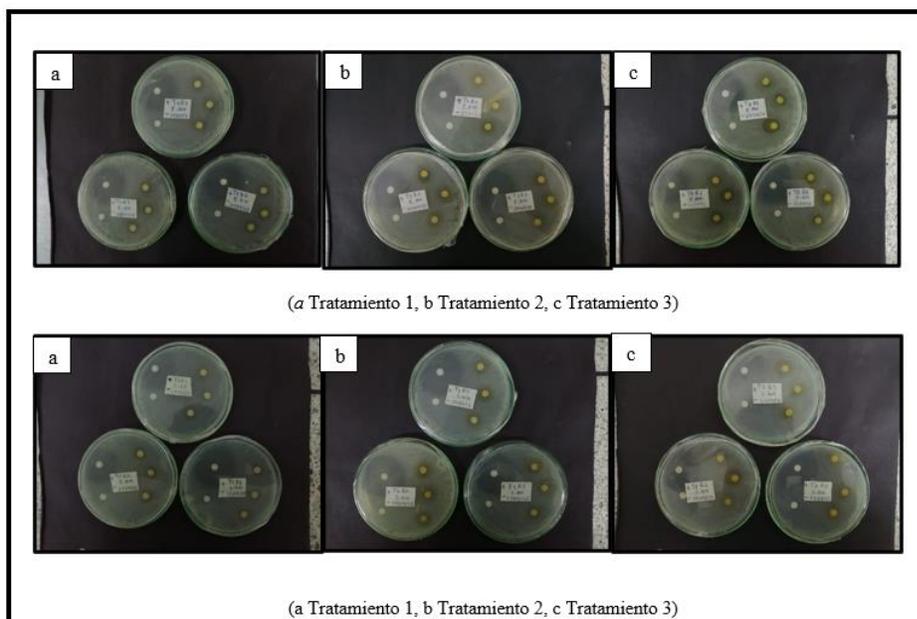


Figura 24. Tratamientos en *Salmonella spp* y *E. coli* luego de 24 h

En la Figura 24 se pueden observar los halos de inhibición de los extractos a diferentes concentraciones en *Salmonella spp*, y los respectivos controles positivo y negativo, cada halo se midió obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5. Medidas de los Halos de Inhibición de cada Tratamiento en *Salmonella spp* y *E. coli*

<i>Salmonella spp</i>					
Tratamiento	Réplica			Promedio de medidas	Control positivo (Antibiótico)
	R1	R2	R3		
T1	4	2	2	2,6	15
T1	3,5	2,5	2		
T1	3	2,5	2		
T2	6	5,5	3	4,4	15
T2	5	4	4		
T2	4	4	4		
T3	8	7	7	7,3	15
T3	7	6,5	7		
T3	8	7	8		
<i>Escherichia coli</i>					
T1	3	2,5	3	2,7	15
T1	3	3	1,5		
T1	3	3	2,5		
T2	3	4	4	3,9	15
T2	4	3,75	4		
T2	4	4	4		
T3	4,5	5	5,5	5,3	15
T3	5	5,5	6		
T3	5,5	5,5	5		

Para cada tratamiento se calculó el promedio, dando como resultado la presencia halos de inhibición con diámetros entre 2,6 y 7,3 mm para *Salmonella spp* y 2,7 y 5,3 mm para *Escherichia coli*, que de acuerdo con lo establecido por Yucra (2015), quien reportó halos de inhibición en aceite esencial de comino con un tamaño de 8.66mm en comparación a lo obtenidos en el proyecto, siendo una inhibición gradual, es decir, a menor porcentaje menor halo de inhibición, esto debido a la presencia de polifenoles como ácido p-cumárico y quercetina que

se pueden encontrar en frutas, semillas, vegetales y son usados en la actualidad como suplemento alimenticio y en películas biodegradables (Navarro, 2022; Ying, 2023).

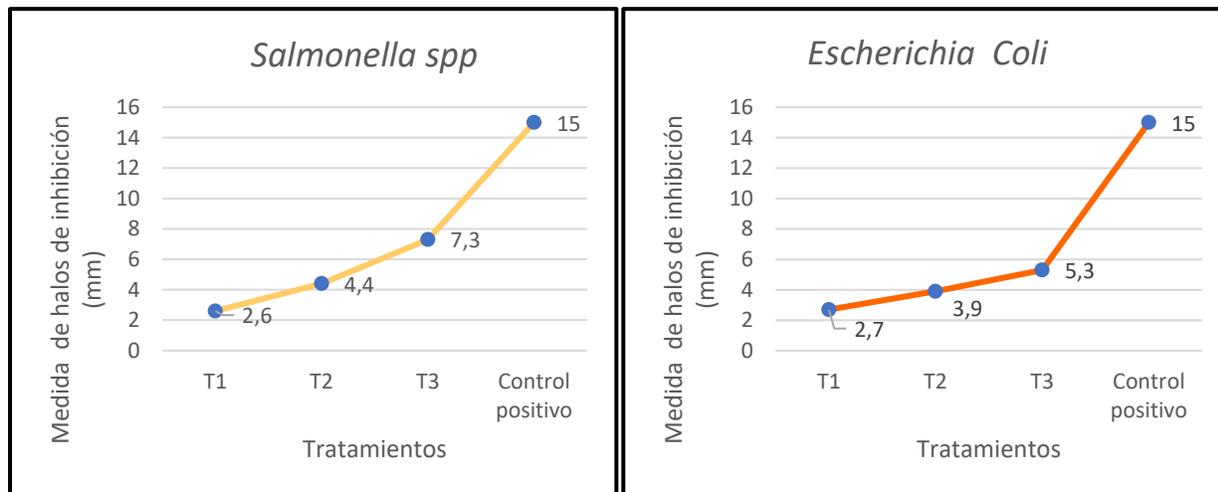


Figura 25. Curva de Crecimiento de Halos de Inhibición

En la figura 25 se observa el valor del halo de inhibición promedio de cada tratamiento frente al control positivo (antibiótico), siendo el tratamiento 3 de mayor concentración como el más representativo, que de acuerdo con Evangelista et al. (2018), los tratamientos de mayor concentración generan un mayor halo de inhibición, demostrando la acción directa y supresión de microorganismos. (Rico et al., 2021).

4.4 Fase VI. Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos en la tabla 5 se realizó un análisis estadístico en Excel.

Tabla 6. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1 <i>Salmonella spp</i>	3	14,3	4,766666667	5,623333333
2 <i>Escherichia coli</i>	3	11,9	3,966666667	1,693333333
Tratamiento 1	2	5,3	2,65	0,005
Tratamiento 2	2	8,3	4,15	0,125
Tratamiento 3	2	12,6	6,3	2

Tabla 7. Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Microorganismos	0,96	1	0,96	1,64102564	0,328654913	18,51282051
Tratamientos	13,46333333	2	6,731666667	11,5071225	0,079954442	19
Error	1,17	2	0,585			
Total	15,59333333	5				

Se puede evidenciar en el análisis de varianza calculado que no se presentaron diferencias significativas debido a que $F <$ al valor crítico para F observado en la tabla 7, la cual indica que los tratamientos son adecuados, ya que están dentro de los rangos. En relación al promedio (Ver Tabla 6) se observa que no hay diferencias significativas entre *Salmonellam spp* y *Escherichia coli*, sus valores no están fuera del rango por lo que ambos microorganismos tienen efectos similares al igual que Westmoreland et al. (2019), donde concluyeron con su estudio que el efecto inhibitorio del extracto es independiente del tipo de microorganismo usado.

5. Conclusiones

- Se logró la identificación de compuestos fenólicos en el extracto de hojas secas de *Terminalia catappa* siendo el ácido p-cumárico y la quercetina los compuestos fenólicos más representativos.
- Se observó mayor efecto de inhibición del extracto de hojas secas de *Terminalia catappa* al aplicar el tratamiento 3 el cual fue de 100% del extracto de *Terminalia catappa* sobre el sensidisco en *Salmonella spp* y *E. coli*, reportando de esta manera una inhibición gradual, es decir, a mayor porcentaje mayor halo de inhibición.
- El análisis estadístico arrojó que no existen diferencias significativas, ya que presentan efectos similares los extractos en *Salmonella spp* y *E coli*, dado que la concentración de los tratamientos fue pertinente.
- Los polifenoles presentes en el extracto de hojas secas de *Terminalia catappa* presentan una actividad antibacteriana en *E. coli* y *Salmonella spp* bacterias patógenas de interés para la industria alimentaria

6. Recomendaciones

Se recomienda realizar pruebas sensoriales del extracto de hojas secas *Terminalia catappa* obtenido en la presente investigación, para remplazar los aditivos y conservantes químicos de ciertos alimentos.

Realizar investigaciones sobre los polifenoles presentes en el extracto de hojas secas de *Terminalia catappa* para ser utilizados en la industria tanto alimentaria como no alimentaria.

Se sugiere a la comunidad estudiantil y a los docentes de la UFPS fomentar la investigación sobre extractos de hojas probando su capacidad frente a nuevos microorganismos causantes de enfermedades agudas y graves provenientes de alimentos contaminados.

Referencias Bibliográficas

- Alarcón, L., Peña, A., Velasco, J., Usubillaga, A., Contreras, B., Rojas, L., Ramírez, D., & Rosa, A. (2016). Composición química y evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del *Espeletia schultzei* Wedd (Asteraceae) recolectada en el estado Trujillo-Venezuela. *Academia*, 15(35), 69–79. <https://1library.co/document/z1w4jd8y-composici%C3%B3n-evaluaci%C3%B3n-actividad-antimicrobiana-espeletia-schultzei-asteraceae-recolectada.html>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2013, Vol. 10, Pages 6235-6254, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/IJERPH10126235>
- Allyn, O. Q., Kusumawati, E., & Nugroho, R. A. (2018). Antimicrobial activity of terminalia catappa brown leaf extracts against staphylococcus aureus ATCC 25923 and Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. *F1000Research*, 7. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.15998.1>
- Alves, I. (2017). *Carne moída bovina em Araguaína: Qualidade higiênico-sanitária e perfil de resistência antimicrobiana de E. coli e Salmonella sp* [Universidade Federal do Tocantins]. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-206241>
- Anderson, K. L., Whitlock, J. E., & Harwood, V. J. (2005). Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3041–3048.

- Araujo, Á. (2018). Presencia de *Salmonella spp* en expendios de carne de pollo de la ciudad de Valledupar. *Documentos de Trabajo ECAPMA*, 1. <https://doi.org/10.22490/ECAPMA.2777>
- Armenteros, M., Ventanas, S., Morcuende, D., Estévez, M., & Ventanas, J. (2012). Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. *Eurocarne*, 63–73.
https://eurocarne.com/daal/a1/boletin_imagenes/a2/20705.pdf
- Ballesta, S. (2022). *Extracción verde de carotenoides de ahuyama (Cucurbita moschata Duch) usando aceite vegetal para su adición como colorante natural en una matriz alimentaria* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/82201>
- Barreto, M., Retamal, P., & Castillo, M. (2016). Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 33(5), 547–557. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000500010>
- Bayona, M. (2012). Prevalencia de *Salmonella* y enteroparásitos en alimentos y manipuladores de alimentos de ventas ambulantes y restaurantes en un sector del norte de Bogotá, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), 267–274.
<https://doi.org/10.31910/RUDCA.V15.N2.2012.824>
- Borrás, I., Fernández, S., Arráez, D., Palmeros, P. A., del Val, R., Andrade, I., Fernández, A., Gómez, J. F., & Segura, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385–394.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.02.053>

Buenaño, J., & León, G. (2016). Obtención de un alelopático para usos veterinario a partir del aceite de la semilla de almendrón (*Terminalia catappa*) [Universidad de Guayaquil].
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/17971/1/401-1198%20-%20Obtenci%3%b3n%20de%20un%20alelop%3%a1tico%20para%20uso%20veterinario.pdf>

Cabrera, C., León, G., Tejada, F., Ramírez, B., & Flores, M. (2013). Estudio preliminar para investigar *Salmonella* sp. y *E. Coli* 0157: H7 en carne molida de res, de venta en supermercados en la ciudad de Puebla, México. *CienciaUAT*, 8(1), 64–69.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8217793>

Canizalez, A., Gonzalez, E., Vidal, J. E., Flores, H., & León, N. (2013). Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 36–45.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.03.020>

Carrión, M., & Chavesta, V. (2019). *Formulación, caracterización y evaluación organoléptica de un filtrante a partir de las hojas de Terminalia catappa (Almendro)* [Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo].
<https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/4427/BC-TES-TMP-3247.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Castaño, H., Zapata, J., Jiménez, S., & Ciro, G. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hoja de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de

interés alimentario. *Vitae*, 17(1), 149–154.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000200006

Castelló Gómez, M. L., Barrera Puigdollers, M. C., Pérez Esteve, E., & Betoret Valls, N. (2017). Reducción del tamaño de partícula y tamizado de partículas.

Cereceres, A., Rodrigo, J., Álvarez, E., & Rodríguez, A. (2019). Ingestión de compuestos fenólicos en población adulta mayor. *Nutrición Hospitalaria*, 36(2), 470–478.

<https://doi.org/10.20960/NH.2171>

Choi, S. H., Kim, H. R., Kim, H. J., Lee, I. S., Kozukue, N., Levin, C. E., & Friedman, M. (2011). Free Amino Acid and Phenolic Contents and Antioxidative and Cancer Cell-Inhibiting Activities of Extracts of 11 Greenhouse-Grown Tomato Varieties and 13 Tomato-Based Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12801–12814.

<https://doi.org/10.1021/JF202791J>

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013).

Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical*

Microbiology Reviews, 26(4), 822–880. [https://doi.org/10.1128/CMR.00022-](https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13/ASSET/1535F48F-03D1-4FCC-A2D1-996296B3EB69/ASSETS/GRAPHIC/ZCM9990924420008.JPEG)

[13/ASSET/1535F48F-03D1-4FCC-A2D1-](https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13/ASSET/1535F48F-03D1-4FCC-A2D1-996296B3EB69/ASSETS/GRAPHIC/ZCM9990924420008.JPEG)

[996296B3EB69/ASSETS/GRAPHIC/ZCM9990924420008.JPEG](https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13/ASSET/1535F48F-03D1-4FCC-A2D1-996296B3EB69/ASSETS/GRAPHIC/ZCM9990924420008.JPEG)

Cubillos, L., & Pava, L. (2021). *Evaluación de la extracción de pigmentos vegetales como la antocianina a partir de diferentes frutos silvestres para uso alimenticio* [Fundación Universidad de América]. <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/8305>

- Díaz, R., Carrillo, C., Zambrano, J., García, A., & Triana, E. (2017). Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de hojas de tres variedades de *Mangifera indica* L. -. *Cumbres*, 3(2), 61–69. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6550756>
- Duarte, A., Jiménez, J., Pineda, J., González, C., & García, M. (2020). Extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* (*Pleurotaceae*) por maceración dinámica. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 61–74. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.72409>
- Elles, E., Salcedo, M., Muñoz, M., & Mendoza, R. (2010). Validación de la técnica de recuento de Coliformes Totales y *E. coli* por el método filtración de membrana en el laboratorio de control de calidad de Aguas de Cartagena S.A E.S.P. *Ciencia y Salud Virtual*, 2(1), 21–30. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6635296>
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2018.5500>
- Espinoza, S. R., Ortiz, P. R., & López, A. H. M. (2017). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las hojas de *Laurusnobilis* y *Thymusvulgaris*. *CIENCIA UNEMI*, 10(24), 46–50. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol10iss24.2017pp46-50p>
- Estrada-García, T., López-Saucedo, C., Thompson-Bonilla, R., Abonce, M., Lopez-Hernandez, D., Santos, J. I., Rosado, J. L., DuPont, H. L., & Long, K. Z. (2009). Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican

Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 98. <https://doi.org/10.1128/JCM.01166-08>

Evangelista, Z., Reyes, N., & Rodríguez, I. (2018). Antimicrobial evaluation of plant essential oils against pathogenic microorganisms: In vitro study of oregano oil combined with conventional food preservatives. *Acta Universitaria*, 28(4), 10–18. <https://doi.org/10.15174/AU.2018.1817>

Favier, G. I., Lucero, C. S. M., Lazarte, V., & Escudero, M. E. (2013). *Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of Salmonella spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina*. *Food Control*, 29(1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.05.056>

Franco, P., Ramírez, L., Orozco, M., & López, L. (2013). Determinación de *Escherichia Coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Rev. Lasallista Investig.*, 10(1), 91–100. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-44492013000100009&script=sci_abstract&tlng=es

Gaitán, E. (2018). *Efecto de aditivos naturales, adicionados en el alimento, en la supervivencia de Oreochromis niloticus infectada con bacterias patógenas* [Instituto Politécnico Nacional]. https://www.lareferencia.info/vufind/Record/MX_b247bcd46e86489c503d51ff84567a5f/Description#tabnav

Garzón, J. (2018). *Uso del ajo y/o sus compuestos activos como agente antimicrobiano en la Industria de Alimentos* [Universidad Nacional Abierta y a Distancia].

<https://repository.unad.edu.co/handle/10596/21491>

Gao, J., Tang, X., Dou, H., Fan, Y., Zhao, X., & Xu, Q. (2010). Hepatoprotective activity of *Terminalia catappa* L. leaves and its two triterpenoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(11), 1449–1455. <https://doi.org/10.1211/0022357044733>

González, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernández, E., & Villareal, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella spp.* y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30(1), 73–94.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S012055522014000100009

Hall, G. V., Kirk, M. D., Ashbolt, R., Stafford, R., Lalor, K., Bell, R., Combs, B., Crerar, S., Dalton, C. B., Dempsey, K., Givney, R., Gregory, J., Hardy, B., Hogg, G., Li, J., Merritt, T., McKay, I., Millard, G., Mwanri, L., ... Williams, J. (2006). Frequency of infectious gastrointestinal illness in Australia, 2002: regional, seasonal and demographic variation. *Epidemiology & Infection*, 134(1), 111–118. <https://doi.org/10.1017/S0950268805004656>

Havelaar, A., Kirk, M., Torgerson, P., Gibb, H., Hald, T., Lake, R., Praet, N., Bellinger, D., de Silva, N., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F., & Devleeschauwer, B. (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Medicine*, 12(12).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1001923>

Hernández, M., García, L., Rojo, D., & Olivares, D. (2013). Almendro de la India: potencial biológico valioso. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 41–47.

<https://www.yumpu.com/es/document/read/13747348/almendro-de-la-india-potencial-biologico-valioso>

Hevira, L., Zilfa, Rahmayeni, Ighalo, J., Aziz, H., & Zein, R. (2021). Terminalia catappa shell as low-cost biosorbent for the removal of methylene blue from aqueous solutions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 97, 188–199.

<https://doi.org/10.1016/J.JIEC.2021.01.028>

Horrillo, A., García, S., Crespo, E., Tejerina, D., & Mesías, F. (2021). Desarrollo de productos cárnicos innovadores para el consumidor: percepciones hacia las hamburguesas de cordero enriquecidas con aditivos naturales. *XIII Congreso de Economía Agroalimentaria*, 523–527.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8294717&info=resumen&idioma=SPA>

Huete, M., & Brenes, P. (2019). *Detección de Escherichia coli y Salmonella spp en alimento listo al consumo: pollo asado expendido en distintos supermercados del distrito I y V de la ciudad de Managua, diciembre 2017 - enero 2018* [Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua]. <https://repositorio.unan.edu.ni/11984/>

Instituto Colombiano de Bienestar Familiar – Regional Norte de Santander. (2022, junio)._

Programa manejo de residuos convencionales, especiales y peligrosos.

https://www.icbf.gov.co/system/files/procesos/pg20.sa_programa_de_manejo_de_residuos_convencionales_especiales_y_peligrosos_regional_norte_de_santander_v5.pdf

Instituto Colombiano de Bienestar Familiar – Regional Norte de Santander. (2020, septiembre). *Programa manejo de residuos convencionales, especiales y peligrosos.*

https://www.icbf.gov.co/system/files/procesos/pg20.sa_programa_manejo_de_residuos_solidos_regional_norte_de_santander_v3.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2022, octubre). *Notificaciones por evento semana 41 del 2022 - Datos básicos.*

<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiOGE3MDkzN2EtZDRlMS00MWZkLTkwMWItZTdhMGExOGY0ZGU2IiwidCI6ImE2MmQ2YzdiLTlmNTktNDQ2OS05MzU5LTM1MzcxNDc1OTRiYiIsImMiOiJ9>

Instituto Nacional de Salud. (2018). *Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica 52.* <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/boletinepidemiologico/2018%20bolet%20C3%ADn%20epidemiol%20C3%B3gico%20semana%2052.pdf>

Instituto Nacional de Salud INS. (2017). *Protocolo de vigilancia en salud pública.* Instituto Nacional de Salud INS. <https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/PRO-Enfermedad-transmitida-por-alimentos.pdf>

Jiménez, M. (2014). Curso Método Soxhlet en Alimentos. https://edoc.tips/download/curso-matodo-soxhlet-en-alimentos-1_pdf

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:2, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

Llamuca, A. (2018). *Extracción de colorantes naturales de jamaica (Hibiscus sabdariffa), Mora Andina (Rubus glaucus) y Uva (Vitis vinifera) para el uso en la industria de alimentos.*

[Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/8904>

Loaiza, J., Sánchez, M., Henao, S., & Cardona, N. (2011). Detección de bacterias contaminantes en huevos para consumo en Medellín y su área Metropolitana. *Ces. Medicina. Veterinario. Zootec.* , 6(2), 20–28.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S190096072011000200003&script=sci_abstract&tlng=es

López, A., Burgos, T., Díaz, M., Mejía, R., & Quinteros, E. (2018). Contaminación microbiológica de la carne de pollo en 43 supermercados de El Salvador. *Alerta, Revista Científica Del Instituto Nacional de Salud*, 1(2 (julio-diciembre)), 45–53.

<https://doi.org/10.5377/ALERTA.V1I2.7134>

Luján, M., Gutiérrez, F., Ventura, L., Dendooven, L., Mendoza, M., Cruz, S., García, O., & Abud, M. (2012). Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de *Bursera graveolens* y *Taxodium mucronatum* de Chiapas, México Chemical composition and antimicrobial activity of *Bursera graveolens* and *Taxodium mucronatum* essential oils from Chiapas, México. *Gayana Bot.*, 69, 7–14.

http://www2.udec.cl/~gvalencia/pdf/GB2012_69_ne_Lujan-Hidalgo_etal.pdf

Mantilla, E. (2019). *Presencia de bacterias aerobias mesófilas, Escherichia coli y Salmonella sp. en carne fresca de bovinos beneficiados en el Matadero Municipal de Cajamarca*

[Universidad Nacional de Cajamarca].

<https://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/3093>

Marrero, D., & Morales, L. (2016). Identification of polyphenolic acids in the methanolic extract from *Terminalia catappa* Linn leaves. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 223–233. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2016/cpm162j.pdf>

Martin, D. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>

Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271–278. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/65031469/flavonoides_3_-libre.pdf?1606332405=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DLos_flavonoides_propiedades_y_acciones_a.pdf&Expires=1685983029&Signature=ImJhdDzrPLtPbcyI6Z4K-5RPIDB3~J-9R1B5OG2QE6NMGUAnIKW1OU11TKrBngt3jKInxO4LpAPRHHUZGUB5b-I0~uUWrBHGAl2FfyMJgrwIT1j1pq9Cz34R1DegQVXQO3zwF1DurG7cLUn5LCNLy3dqnIry-fy2u~KG0XTjYZas0vI8iZwC4YJ33a4f9jsKZhZk6m8y7R0EL8LeuaL284RZRyCyf4MOENuabqrl7eSHIF9MWeCpaFCGdIAxiPMI311KtA2i0-bBt9CGMI~jiH7S3saLoUOk8ERy

Mata Pariente, N., Rumayor Zarzuelo, M., & Hernando García, M. (2020). Brote de origen alimentario por *Campylobacter* en un centro educativo de la Comunidad de Madrid. *Revista Madrileña de Salud Pública*, 3(2), 1–3. <https://doi.org/10.36300/REMASP.2020.040>

Ministerio de Salud y Protección Social. *Resolución 0719 de 2015*, (2015) (testimonio de Ministerio de Salud y Protección Social).
<https://www.invima.gov.co/documents/20143/344791/resoluci%C3%B3n0719de2015anexoT%C3%A9cnico.pdf>

Mininel, F., Leonardo, C., Espanha, L., Resende, F., Varanda, E., Vilegas, W., & dos Santos, L. (2014). Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and their mutagenic activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/676902>

Montaño, A., Jiménez, R., Campos, R., Martínez, V., Román, A., & Hernández, A. (2018). Actividad antimicrobiana de extractos naturales, una alternativa a los aditivos químicos sintéticos. *Boletín de Ciencias Agropecuarias Del ICAP*, 4(8).
<https://doi.org/10.29057/ICAP.V4I8.3342>

Mora, A., Parra, J., Chaverri, J., & Arias, M. (2013). Determinación de la capacidad antimicrobiana del té verde (*Camellia sinensis*) contra los agentes potencialmente patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63(3), 247–253. <https://www.alanrevista.org/ediciones/2013/3/art-8/>

Navarro Palacios, C. (2022). *Films activos de PHBV con ácidos ferúlico y p-cumárico. Cinética de liberación y actividad antibacteriana* [Universidad Politécnica de Valencia].

<https://riunet.upv.es/handle/10251/188240>

Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A., & García, M. (2012). Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 29(5), 504–510. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000600004>

Olórtegui, P. (2014). Efecto de la aplicación de tres dosis de bioles en el crecimiento de almendro (*Terminalia catappa* Linn) en fase de vivero - Tingo María. [Universidad Nacional Agraria de la Selva]. <https://1library.co/document/zln8806q-efecto-aplicacion-bioles-crecimiento-almendro-terminalia-catappa-maria.html>

Oyeleye, S. I., Adebayo, A. A., Ogunsuyi, O. B., Dada, F. A., & Oboh, G. (2018). Phenolic profile and Enzyme Inhibitory activities of Almond (*Terminalia catappa*) leaf and Stem bark. *International Journal of Food Properties*, 20(S3), 810–821.

<https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1375945>

Pastrana, Y., Durando, A., & Acevedo, D. (2017). Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 56–65.

[https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)56-65](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)56-65)

Peñalver, M. (2021). *Cinética de liberación y actividad antibacteriana de ácidos fenólicos incorporados en films de PLA-PHBV* [Universitat Politécnica de Valencia].

<https://riunet.upv.es/handle/10251/171592>

- Púa, A., & Navas, N. (2014). Calidad higiénica y determinación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en carne de cerdo en expendios de Barranquilla. @limentech, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 12(1), 15–22. <https://doi.org/10.24054/16927125.V1.N1.2014.909>
- Quinlan, J. (2013). Foodborne illness incidence rates and food safety risks for populations of low socioeconomic status and minority race/ethnicity: a review of the literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(8), 3634–3652. <https://doi.org/10.3390/IJERPH10083634>
- Quinto, E., Caro, I., Villalobos, L., Mateo, J., de Mateo, B., & Redondo, M. (2019). Food Safety through Natural Antimicrobials. *Antibiotics*, 8(4), 208. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS8040208>
- Richardson, L. C., Cole, D., Hoekstra, R. M., Rajasingham, A., Johnson, S. D., & Bruce, B. B. (2021). Foods Implicated in U.S. Outbreaks Differ from the Types Most Commonly Consumed. *Journal of Food Protection*, 84(5), 869–875. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-293>
- Rico, N., Espinosa, W., & López, D. (2021). Actividad antimicrobiana de polifenoles extraídos de frutos de diferentes especies del género *Vaccinium*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 26(2). <https://doi.org/10.1002/FSN3.1437>
- Rodríguez, A., Troncoso, R., Sánchez, A., González, D., Ruiz, E., Zamora, R., Ceceña, C., Grimaldo, O., & Aviles, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y

Fusarium oxysporum. Revista Argentina de Microbiología, 47(1), 72–77.

<https://doi.org/10.1016/J.RAM.2014.12.005>

Rodríguez, R., Rojo, G., Martínez, R., Piña, H., Ramírez, B., Vaquera, H., & Cong, M. (2014).

Envases inteligentes para la conservación de alimentos. *Ra Ximhai*, 10(6), 151–173.

Santos, M. (2017). *Informe de evento Enfermedades Transmitidas por Alimentos*.

<https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ETA%202017.pdf>

Serna, L., Guarnizo, A., & Valencia, L. (2012). Factores de riesgo de etas, en una comunidad

universitaria en Colombia. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(1),

116–126. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/799>

Shu, E., Pusparajah, P., Nurul, A., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance.

<https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>, 8(3), 284–293.

<https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>

Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Revista Salud Uninorte*, 32(1), 105–122.

<https://doi.org/10.14482/SUN.32.1.8598>

Su, L.-H., & Chiu, C.-H. (2007). Salmonella: Clinical Importance and Evolution of Nomenclature. *Revista Médica Chang Gung*, 30(3), 210–219.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17760271/>

- Tajkarimi, M., Ibrahim, S., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2010.02.003>
- Tierra, V. (2018). *Extracción de colorantes naturales de Camote (Ipomoea batatas), Col Morada (Brassica oleracea var. capitata) y Maíz Morado (Zea mays L.) para el uso en la industria de alimentos*. [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/9025>
- Tofiño, A., Ortega, M., Herrera, B., Fagroso, P., & Pedraza, B. (2017). Conservación microbiológica de embutido cárnico artesanal con aceites esenciales *Eugenia caryophyllata* y *Thymus vulgaris*. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 30–41. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\).591](https://doi.org/10.18684/BSAA(15).591)
- Tuitice, A., & Jibaja, M. (2021). *Antocianinas y su aplicación como colorantes naturales para alimentos* [Quito: UCE]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22622>
- Valencia, M. (2018). Métodos de extracción de aceite esencial de la semilla de moringa (Moringa oleífera) [Universidad Rafael Landívar]. <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjrkd/2018/06/17/Valencia-Maylin.pdf>
- Vega, A., de León, J. A., & Reyes, S. M. (2017). Determinación del Contenido de Polifenoles Totales, Flavonoides y Actividad Antioxidante de 34 Cafés Comerciales de Panamá. *Información Tecnológica*, 28(4), 29–38. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000400005>

- Vega, N., & Torres, M. (2021). Evaluación de compuestos fenolicos de (*Citrus sinensis*) y su capacidad antioxidante. *Ciencia En Desarrollo*, 12(2), 109–117.
<https://doi.org/10.19053/01217488.V12.N2.2021.11635>
- Vera, C., & Vilela, L. (2021). *Análisis bacteriológico (Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Salmonella spp) en carne bovina procedente de matadero municipal para consumo humano* [Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López].
<https://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/1395>
- Vijaya, A., Divya, N., Punniya, P., & Vijaya, A. (2015). An updated review of Terminalia catappa. *Pharmacognosy Reviews*, 9(18), 93–98. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.162103>
- Villacís, K. (2020). *Determinación del perfil de sensibilidad antibiótica en Escherichia coli y Salmonella spp. aisladas de carne aviar en el Ecuador*.
<http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/18532>
- Westmoreland, A., Maier, L., & Oberpaur, C. (2019). Efecto antimicrobiano in vitro del extracto foliar de salvia blanca (*Sphacele salviae* (Lindl.) Briq.) sobre diferentes microorganismos patógenos. *Agro Sur*, 47(2), 31–40. <https://doi.org/10.4206/AGROSUR.2019.V47N2-04>
- Wong, J., Aguilar, P., Veana, F., & Muñiz, D. (2020). Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23(0).
<https://doi.org/10.22201/FESZ.23958723E.2020.0.255>
- World Health Organization. (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases*.

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1

Yakubu, Y., Talba, A., Chong, C. M., Ismail, I. S., & Shaari, K. (2020). Effect of *Terminalia catappa* methanol leaf extract on nonspecific innate immune responses and disease resistance of red hybrid tilapia against *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Reports*, 18, 100555. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2020.100555>

Ying, W. (2023). Impactos de la suplementación de quercetina después del ejercicio. *Revista Brasileira de Medicina Do Esporte*, 29. https://doi.org/10.1590/1517-8692202329012022_0400

Yucra, N. (2015). Evaluación del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum* L.), en la vida útil de la carne fresca de res y la concentración inhibitoria de *Escherichia coli* [Universidad Nacional del Altiplano]. In *Universidad Nacional del Altiplano*. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3275118>

Zurita, A., Köller, A., & Zabalaga, R. (2021). Extracción de aceite de amaranto utilizando la técnica Soxhlet y extracción asistida por Ultrasonido. *Acta Nova*, 10(2), 246–255. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1683-07892021000200246&lng=es&nrm=iso&tlng=es