



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, 18 de septiembre de 2019

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

María del Pilar Cortés Gaona, con C.C. No. 1075312309, autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y EXTRACTOS DE *Moringa oleifera* COMO ALTERNATIVA PARA CONTRARRESTAR *Shigella sonnei* ATCC 2593 presentado y aprobado en el año 2019 como requisito para optar al título de Ingeniero Agrícola.

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: 

Vigilada Mineducación



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y EXTRACTOS DE *Moringa oleifera* COMO ALTERNATIVA PARA CONTRARRESTAR *Shigella sonnei* ATCC 25931

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Cortés Gaona	María del Pilar

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Amorocho Cruz	Claudia Milena

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
—	—

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Ingeniero Agrícola

FACULTAD: Ingeniería

PROGRAMA O POSGRADO: Agrícola

CIUDAD: Neiva

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2019

NÚMERO DE PÁGINAS: 33

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas__x_ Fotografías__x_ Grabaciones en discos__ Ilustraciones en general__ Grabados__ Láminas__
Litografías__ Mapas__ Música impresa__ Planos__ Retratos__ Sin ilustraciones__ Tablas o Cuadros__x_

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO: fotos análisis sensorial, formato análisis sensorial



PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Alimento funcional	Functional food
2. Probiotico	Probiotic
3. Actividad antimicrobiana	Antimicrobial activity
4. Análisis sensorial	Sensory analysis

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

En este estudio se evaluaron en condiciones *in vitro* 4 Bacterias Acido Lácticas (BAL) aisladas de café, queso y leche materna y extractos de hojas de *M. oleifera* sobre *Shigella sonnei* ATCC 25931 usando la prueba de difusión de discos y pocillos. Todas las cepas BAL fueron estudiadas mediante pruebas de antibiogramas con: Penicilina G, Ceftriaxona y Ciprofloxacino. Además, se realizó análisis sensorial adicionando las hojas de *M. oleifera* en polvo a la carne de cerdo (T₁, T₂, T₃), mediante escala hedónica considerando atributos como apariencia, sabor, olor, textura, amargo e impresión general. Los resultados mostraron que los extractos de hojas de *M. oleifera* y la presencia de componentes proteicos (bacteriocinas) de las BAL no inhibieron el crecimiento de *Shigella sonnei* ATCC 25931; sin embargo las BAL presentaron actividad antagónica frente a *Shigella sonnei* ATCC 25931 debido a la presencia de células, componentes celulares y la presencia de ácido láctico, las BAL presentaron sensibilidad a los antibióticos evaluados. Las pruebas realizadas son de carácter cualitativo y el efecto inhibitorio se atribuye a la cepa y no a una generalización de especie o género; no obstante, los resultados pueden ser de utilidad en futuras investigaciones *in vivo*. En cuanto al análisis sensorial de carne de cerdo con polvo de *M. oleifera* se encontró aceptación de atributos como sabor, olor y textura, poca aceptación en apariencia, amargo e impresión general, donde la aceptación del producto se da con los menores contenidos de polvo de hoja de moringa.



ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

In this study, 4 Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from coffee, cheese and breast milk and leaf extracts of *M. oleifera* on *Shigella sonnei* ATCC 25931 were evaluated *in vitro* using the disk and well diffusion test. All the LAB strains were studied by means of antibiograms tests with: Penicillin G, Ceftriaxone and Ciprofloxacin. Also, sensory analysis was performed by adding the leaves of *M. oleifera* powder to pork (T₁, T₂, T₃), by hedonic scale considering attributes such as appearance, taste, smell, texture, bitterness and general impression. The results showed that *M. oleifera* leaf extracts and the presence of LAB protein components (bacteriocins) did not inhibit the growth of *Shigella sonnei* ATCC 25931; however, the LAB presented antagonistic activity against *Shigella sonnei* ATCC 25931 due to the presence of cells, cellular components and the presence of lactic acid, the LAB presented sensitivity to the antibiotics evaluated. The tests performed are qualitative and the inhibitory effect is attributed to the strain and not to a generalization of species or genus; however, the results may be useful in future investigations *in vivo*. Regarding the sensory analysis of pork with *M. oleifera* powder, acceptance of attributes such as taste, smell and texture, little acceptance in appearance, bitterness and general impression was found, where product acceptance is given with the lowest dust content of moringa leaf.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Jurado: Wilson Rodrigo Cruz Flor

Firma:

Nombre Jurado: Wilmer Licerio Ladino Garzón

Firma:

BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y EXTRACTOS DE *Moringa oleifera* COMO ALTERNATIVA PARA CONTRARRESTAR *Shigella sonnei* ATCC 25931

Cortés-Gaona, M^a. P¹, Amorocho-Cruz, C. M²

RESUMEN

En este estudio se evaluaron en condiciones *in vitro* 4 Bacterias Acido Lácticas (BAL) aisladas de café, quesillo y leche materna y extractos de hojas de *M. oleifera* sobre *Shigella sonnei* ATCC 25931 usando la prueba de difusión de discos y pocillos. Todas las cepas BAL fueron estudiadas mediante pruebas de antibiogramas con: Penicilina G, Ceftriaxona y Ciprofloxacino. Además, se realizó análisis sensorial adicionando las hojas de *M. oleifera* en polvo a la carne de cerdo (T₁, T₂, T₃), mediante escala hedónica considerando atributos como apariencia, sabor, olor, textura, amargo e impresión general. Los resultados mostraron que los extractos de hojas de *M. oleifera* y la presencia de componentes proteicos (bacteriocinas) de las BAL no inhibieron el crecimiento de *Shigella sonnei* ATCC 25931; sin embargo las BAL presentaron actividad antagonista frente a *Shigella sonnei* ATCC 25931 debido a la presencia de células, componentes celulares y la presencia de ácido láctico, las BAL presentaron sensibilidad a los antibióticos evaluados. Las pruebas realizadas son de carácter cualitativo y el efecto inhibitorio se atribuye a la cepa y no a una generalización de especie o género; no obstante, los resultados pueden ser de utilidad en futuras investigaciones *in vivo*. En cuanto al análisis sensorial de carne de cerdo con polvo de *M. oleifera* se encontró aceptación de atributos como sabor, olor y textura, poca aceptación en apariencia, amargo e impresión general, donde la aceptación del producto se da con los menores contenidos de polvo de hoja de moringa.

PALABRAS CLAVE: alimento funcional; probiotico; actividad antimicrobiana; análisis sensorial

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151133301@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

ABSTRACT

In this study, 4 Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from coffee, cheese and breast milk and leaf extracts of *M. oleifera* on *Shigella sonnei* ATCC 25931 were evaluated *in vitro* using the disk and well diffusion test. All the LAB strains were studied by means of antibiograms tests with: Penicillin G, Ceftriaxone and Ciprofloxacin. Also, sensory analysis was performed by adding the leaves of *M. oleifera* powder to pork (T₁, T₂, T₃), by hedonic scale considering attributes such as appearance, taste, smell, texture, bitterness and general impression. The results showed that *M. oleifera* leaf extracts and the presence of LAB protein components (bacteriocins) did not inhibit the growth of *Shigella sonnei* ATCC 25931; however, the LAB presented antagonistic activity against *Shigella sonnei* ATCC 25931 due to the presence of cells, cellular components and the presence of lactic acid, the LAB presented sensitivity to the antibiotics evaluated. The tests performed are qualitative and the inhibitory effect is attributed to the strain and not to a generalization of species or genus; however, the results may be useful in future investigations *in vivo*. Regarding the sensory analysis of pork with *M. oleifera* powder, acceptance of attributes such as taste, smell and texture, little acceptance in appearance, bitterness and general impression was found, where product acceptance is given with the lowest dust content of moringa leaf.

KEY WORDS: functional food; probiotic; antimicrobial activity; sensory analysis

1. INTRODUCCIÓN

La divulgación de enfermedades causadas por microorganismos patógenos es una preocupación necesaria debido a que constituye un factor de riesgo para la salud pública (Barragán, 2012). Asimismo la resistencia a los antimicrobianos de los patógenos bacterianos, incluidos los del género *Shigella*, se ha reconocido cada vez más como un problema importante que trasciende las fronteras internacionales y causa una contrariedad a la salud pública (Qiuxia *et al.*, 2018). Los aislamientos de *Shigella* resistentes a múltiples fármacos (MDR) emergentes, en particular los que tienen resistencia a las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de espectro extendido, han agravado esta carga mundial de salud, llevando a un aumento de la morbilidad, mortalidad y costos de tratamiento (Bardhan *et al.*, 2010).

Shigella sonnei esta compuesta por 4 serogrupos principales, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, causan más de 164,000 muertes al año, con 55,000 entre los niños menores de 5 años de edad, siendo identificado como uno de los agentes más importantes de diarrea según la Organización Mundial de la Salud (OMS), principalmente en los países en desarrollo (Cheila, *et al.*, 2010), lo que representa el 11% de todas muertes por diarrea global (Frenck *et al.*, 2018), además son agente causal de la shigelosis o disentería bacilar, una enfermedad que causa fiebre alta, trastornos neurológicos y moco-piohemorrágico disentería (Penatti *et al.*, 2007). En EE.UU. *Shigella sonnei* es la especie más comúnmente aislada en heces fecales, mientras *Shigella flexneri*, la cual causa enfermedad clínica más severa, ha sido más a menudo aislada en sangre (Baskin, 1987).

Moringa oleífera Lam. pertenece a una familia mono-genérica llamada *Moringaceae*, que incluye 13 especies de arbustos y árboles originarios de la India y África, y, distribuidos en muchos otros países tropicales y áridos (Saucedo *et al.*, 2018). Es un árbol caducifolio de crecimiento rápido, de tamaño mediano, propagado en esquejes y semillas, se caracteriza por hojas tripinnadas, pecíolos amarillos o blancos, vainas colgantes de 3 lados, corteza corchosa gris blanquecina, flores axilares bisexuales, pedunculadas, blancas o cremosas, semillas aladas globulares, cápsulas acanaladas pendulares y raíces primarias tuberosas blandas y fisuradas (Swati *et al.*, 2018).

Esta planta se conoce universalmente como la planta milagrosa o el árbol de la vida (Adewumi *et al.*, 2018). Se valora por sus múltiples propiedades económicas, medicinales y nutraceuticas en todo el mundo y por su capacidad para tratar más de 300 enfermedades, todas las partes de la Moringa, incluidas las vainas inmaduras, las hojas, las semillas maduras, las flores y las raíces, han sido consumidas por los humanos durante mucho tiempo para una variedad de aplicaciones (Swati *et al.*, 2018). Puesto que son fuente de diferentes compuestos bioquímicos con efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antioxidantes y antimicrobianos (Torres *et al.*, 2013), debido a que contiene altos niveles de caroteno (vitamina A), vitaminas B1, B2, B3, C, E, K, además de calcio, hierro, potasio, cobre, magnesio, zinc, todos los aminoácidos esenciales y antioxidantes: ácido ascórbico, flavonoides, fenoles, carotenoides, entre otros (Bonal *et al.*, 2012).

El uso de *M. oleífera* para controlar diversas infecciones provocadas por microorganismos es bien conocido, estudios *in vitro* han comprobado la actividad antimicrobiana de la mayoría de las partes de la moringa sobre los microorganismos patógenos. La inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* por extractos acuosos de las hojas fue demostrada por científicos guatemaltecos, así mismo otros autores demostraron la actividad antifúngica de aceites esenciales de las

hojas y de extractos alcohólicos de las semillas y las hojas contra dermatofitos como *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (Martin *et al.*, 2013).

Otra de las características distintivas de la planta de moringa es que en sus hojas, se acumulan altos contenidos de compuestos fenólicos (Valdez *et al.*, 2015), los compuestos fenólicos en general, incluye a polifenoles, taninos, flavonoides, flavonoles, coumarinas, los cuales son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. (Cai *et al.*, 2006; Echavarría *et al.*, 2016). Para obtener extractos del polvo de *M. oleifera* se conoce que el solvente cloroformo tiene afinidad con compuestos medianamente polares, saponinas, alcaloides; y así mismo el solvente metanol tiene afinidad con compuestos polares, polifenoles, azúcares, grupos hidróxilo y carboxilo (Caviedes, 2019)

Los extractos acuosos de hoja de *M. oleifera* son buenos prospectos para la aplicación de alimentos porque pueden preservar alimentos al inhibir la oxidación de lípidos y controlar una amplia gama de microorganismos patógenos, como bacterias y hongos, que son trascendentales en la industria alimentaria (Saucedo *et al.*, 2018). Estudios bacteriológicos demostraron la actividad antimicrobiana de los extractos de semillas de moringa, los cuales floculan bacterias Gram positivas y Gram negativas del mismo modo que lo hacen con los coloides del agua. Su acción bacteriostática consiste en la disrupción de la membrana celular por inhibición de enzimas esenciales (Suárez *et al.*, 2003).

Por otra parte, el conocimiento de cultivos lácticos se originó en el siglo XVIII, cuando agricultores de África, Asia, y Europa observaron el comportamiento de la leche cruda en meses cálidos (Bedolla *et al.*, 2004). Las bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecen al *phylum firmicutes* que distingue alrededor de 20 géneros, los principales son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisellas*. Las BAL comprende un diverso grupo de organismos Gram-positivos, formadores de no esporas, no motilidad y forma de coco y carencias de catalasa (Savadogo *et al.*, 2006), son coco bacilos de longitud variable y grosor de 0.5 – 0.8 μm . Según la fermentación de la lactosa las BAL se clasifican en homofermentativas (producen ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias) y, según la temperatura de crecimiento se clasifican en mesófilos y termófilos (Bertrand *et al.*, 2003), donde la temperatura ideal de incubación es de 20-25°C y 40-45°C respectivamente (Blanco *et al.*, 2006).

Las BAL se caracterizan por la producción de sustancias antimicrobianas (ácidos láctico y acético, metabolitos), (Murray *et al.*, 2009) y de numerosas bacteriocinas, en las cuales se fundamenta su potente acción probiótica, antimicrobiana y bioconservadora (Daeschel *et al.*, 1993). Por tales propiedades, cumplen un importante papel en los procesos de bioconservación de la industria alimentaria (Vinderola *et al.*, 2006), la FAO ha adoptado la definición de probióticos como microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable en el huésped (Grajek *et al.*, 2005), en los últimos años estas se han aplicado como probióticos debido a su capacidad de controlar la microbiota intestinal y a su acción para evitar la colonización y el crecimiento de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal (Ray *et al.*, 1994).

La principal función de las BAL es la formación de ácidos orgánicos, esencialmente ácido láctico (Bouzar *et al.*, 1997). En la tecnología de productos alimentarios cumplen funciones de: formación de sabor ácido, inhibición de organismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa,

producción de gas requerida para la formación de “ojos” en los quesos y son muy utilizadas como probióticos (Parra, 2010).

Las BAL producen varios componentes antimicrobianos los cuales inhiben el crecimiento de organismos esporádicos relevantes. Actualmente, la producción de bacteriocinas producidas por bacterias del genero *Lactobacillus* ha resultado exitosa en alimentos como la carne, para el control de ciertos microorganismos patógenos, como *Salmonella spp.* y *E. coli* (Ray *et al.*, 1994) al igual que está demostrado que, las levaduras fermentadas por *Lactobacillus plantarum*, inhibe el crecimiento de *Fusarium* (Parra, 2010).

El tratamiento que se realiza con los antibióticos, no siempre es eficaz y en numerosas ocasiones origina resistencia, por ende, es de suma importancia encontrar técnicas naturales para controlar y atenuar las infecciones y/o enfermedades causadas por este patógeno. Estableciendo éstas necesidades, la investigación se fundamentará en evaluar el efecto antimicrobiano de extractos de hojas de *M. oleífera* y BAL frente al patógeno *Shigella sonnei* ATCC 25931.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de extractos de *M. oleífera* y BAL como alternativas para contrarrestar *Shigella sonnei* ATCC 25931.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Examinar la actividad antimicrobiana de los extractos de la hoja deshidratada de *Moringa oleífera* (hexano, cloroformo y metanol) para contrarrestar a *Shigella sonnei* ATCC 25931.

Analizar el efecto en presencia y ausencia de células de BAL con pH ácido y neutro aisladas de diversos orígenes (mamífero humano, proceso de fermentación de café, quesillo) frente a *Shigella sonnei* ATCC 25931.

Conocer el impacto que tiene el polvo de moringa en la carne de cerdo mediante un análisis sensorial.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Extractos de hojas secas de *M. oleífera*

Los extractos de hojas secas de *M. oleífera* (hexano, cloroformo y metanol) que se utilizaron provienen del proyecto de investigación (Figura 1): Promoción del consumo de *Moringa oleífera* como complemento nutricional, atendiendo las propiedades antimicrobianas (Caviedes, 2019).



Figura 1. Extractos vegetales de hojas secas de *M. oleifera*.

3.2 Cepas

3.2.1 Cepa bacteriana *Shigella Sonnei* ATCC 25931

Se activó el patógeno de la cepa de referencia *Shigella sonnei* ATCC 25931 (KWIK STIK, Francia, Europa), extrayendo el líquido hidratante de esta cepa para inocularlo con un asa de platino en medio de agar triptona de soya (Tryptone Soya Agar, Oxoid, Reino Unido) mediante el método triple estría, para así obtener un cultivo puro; la placa se incubó (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h (Figura 2).

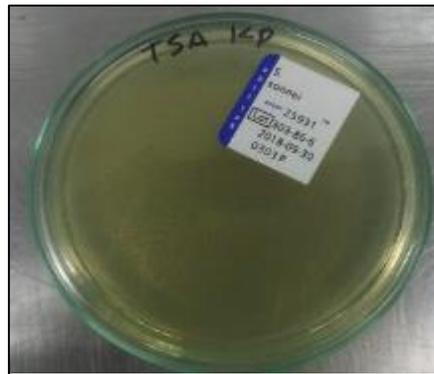


Figura 2. Activación del patógeno de referencia *Shigella sonnei* ATCC 25931.

Orden de crecimiento del patógeno

Se realizó resiembra en el medio de agar TSA y agar método estándar - P.C.A (Plate Count Agar, Conda, España) para el ensayo de actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas secas de *M. oleifera* y BAL respectivamente, se incubaron a temperatura de 37°C durante 24h, posteriormente una porción del crecimiento en placa se depositó en 9 ml de agua de peptona (Merck KGaA, Alemania) homogenizando en Vortex (Benchmark Scientific BV1000, Taiwán) hasta escala McFarland 0.5%, realizando diluciones seriadas con volúmenes de 1000 µl entre tubos hasta la dilución (-9) y sembrándose en superficie con asa de platino un volumen de 100 µl. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24h. En todos los casos la resiembra se hizo por duplicado. Fue identificada fenotípicamente mediante tinción Gram.

Recuento unidades de crecimiento microbiano

El conteo del orden de crecimiento del patógeno (colonias) se determinó con la siguiente ecuación (1).

$$UFC \cdot ml^{-1} = \left(\frac{NC}{V \cdot ND} \right) \quad (1)$$

Donde,

NC: número de colonias de crecimiento en placa, **V**: volumen de siembra (0.1 ml) y **ND**: dilución de conteo de colonias.

3.2.2 Cepas BAL

Se activaron las cepas BAL (L, D, JC, 12) conservadas a -20°C de la colección del laboratorio de Microbiología de alimentos (Agroindustria, Universidad Surcolombiana) de investigaciones antecedentes. Las BAL L y D provienen del proyecto de investigación: Caracterización de las bacterias ácido lácticas (BAL), hongos y levaduras que inciden durante el proceso de fermentación de café arábica (*coffea arábica*) y su influencia en el análisis sensorial y calidad de la taza (Ladino, 2017); la BAL 12 procede de la investigación: Evolución de atributos de calidad en queso huilense en almacenamiento refrigerado (Cortés, 2015) y la BAL JC es proveniente de leche materna (Figura 3).



Figura 3. BAL (JC, D, L, 12) conservadas en crioviales a -20°C .

Para la activación, se tomó una porción de ellas realizando siembra en superficie en medio de agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS, Conda, España) incubadas (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h, posteriormente se depositó una porción de ellas con un asa de platino en agar MRS mediante el método triple estría, para así obtener un cultivo puro. Finalmente se realizó resiembra en superficie en agar MRS, incubándose a 37°C por 24 horas. Fueron identificadas fenotípicamente mediante tinción Gram.

3.2.2.1 identificación bioquímica BAL JC

Para el estudio de la cepa JC se hizo con el sistema API 50 CHL (BioMérieux). El cultivo en placa de 24 horas en agar MRS se inocular en medio 50CH (púrpura) hasta escala McFarland 2%. Se llenaron los pocillos de la galería recubriendo la cúpula con aceite de parafina (BioMérieux) para establecer condiciones de anaerobiosis incubadas a 37°C por 48 horas. Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH, observándose un cambio de color (amarillo, verde, negro). Los resultados obtenidos constituyen el

perfil bioquímico (49 carbohidratos) y permiten la identificación del microorganismo con la ayuda de un programa informático de identificación: paquete estadístico apiwebTM.

3.3 Ensayos actividad antimicrobiana

3.3.1 Evaluación de los extractos de hojas secas de *M. oleífera*

Se evaluó mediante la técnica de difusión de pocillos. Los extractos vegetales Hexano, Cloroformo y Metanol, preparados en 3 diferentes concentraciones: Hexano (10, 20 y 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$), Cloroformo y Metanol (10, 30 y 50 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$), se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO-Panreac, Alemania) al 30%. El antibiótico Ceftriaxona (Nirlife-Aculife, India) se utilizó como control positivo y el Dimetilsulfóxido al 30% (DMSO-Panreac, Alemania) como control negativo. ⁶

Mediante un sacabocados estéril (Kheir *et al.*, 2014) se diseñaron 5 pocillos de 7 mm de diámetro en el medio de agar TSA donde estaba inoculado en superficie el cultivo de *Shigella sonnei* ATCC 25931 de resiembra ajustado a escala McFarland 0.5%. En todos los casos se adicionó volúmenes de 50 μl a cada pozo.

Las placas se dispusieron en refrigeración (Indufrial, Colombia) a 4°C durante una hora (pre-difusión) y seguidamente se incubaron a 37°C durante 17h. La zona de inhibición por los extractos se midió con una regla en milímetros (Kheir *et al.*, 2014). En todos los casos se realizaron duplicados (Figura 4).

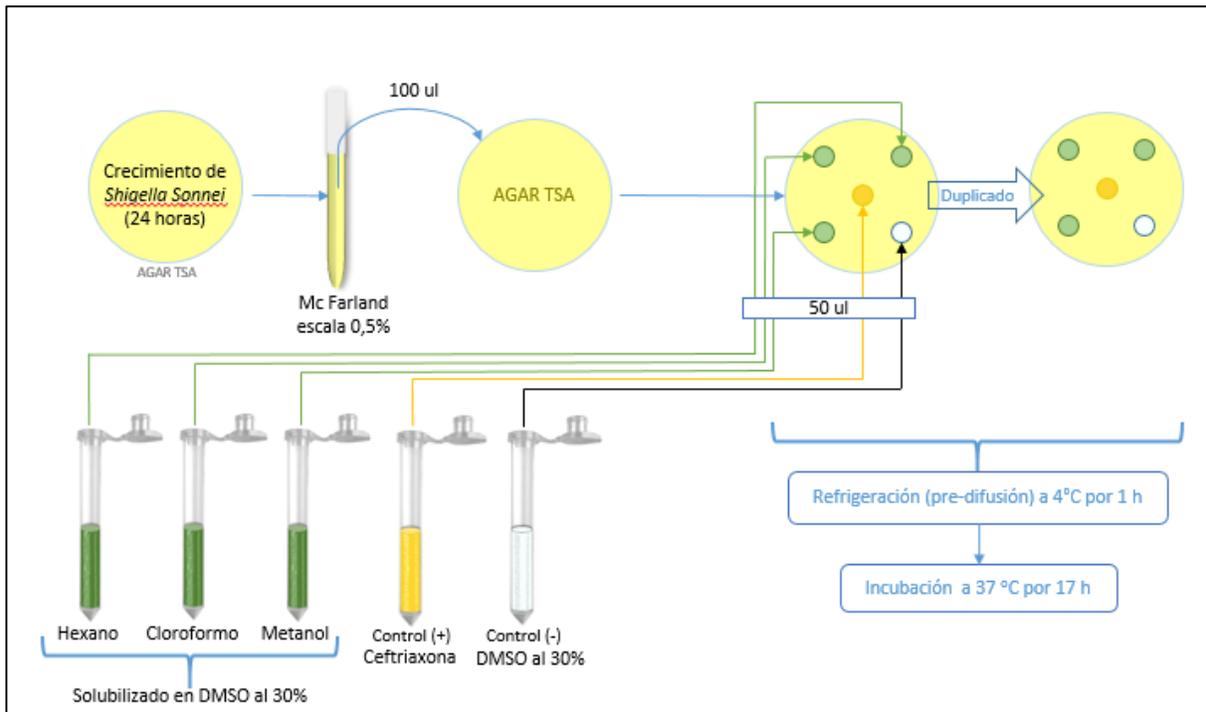


Figura 4. Esquema del ensayo de actividad antimicrobiana de los extractos de *M. oleífera* frente a *Shigella sonnei* ATCC 25931.

3.3.2 Evaluación de Bacterias ácido lácticas (BAL)

Se evaluó el efecto de las BAL en presencia y ausencia de células con pH ácido y neutro frente al patógeno *Shigella sonnei* ATTC 25931.

3.3.2.1 Método de discos

Para evaluar la inhibición de los patógenos en presencia de células de las BAL con pH ácido, se utilizó la técnica de difusión de discos. De cada cepa (JC, L, D, 12) se cortó un disco de 7 mm de diámetro usando un sacabocados estéril (Kheir *et al.*, 2014) de un cultivo en masa de 24 horas en agar MRS. Los discos se depositaron en el medio de agar PC donde estaba inoculado en superficie el cultivo de *Shigella sonnei* ATCC 25931 ajustado a escala McFarland 0.5%. Además, se realizó un pocillo para el control positivo, al cual se le adicionó 50µl del antibiótico Ceftriaxona (Nirlife-Aculife, India). Las placas se incubaron a 37°C durante 15 h. La franja de inhibición por las BAL evaluadas se midió con una regla en milímetros (Kheir *et al.*, 2014). En todos los casos se realizó por duplicado (Figura 5).

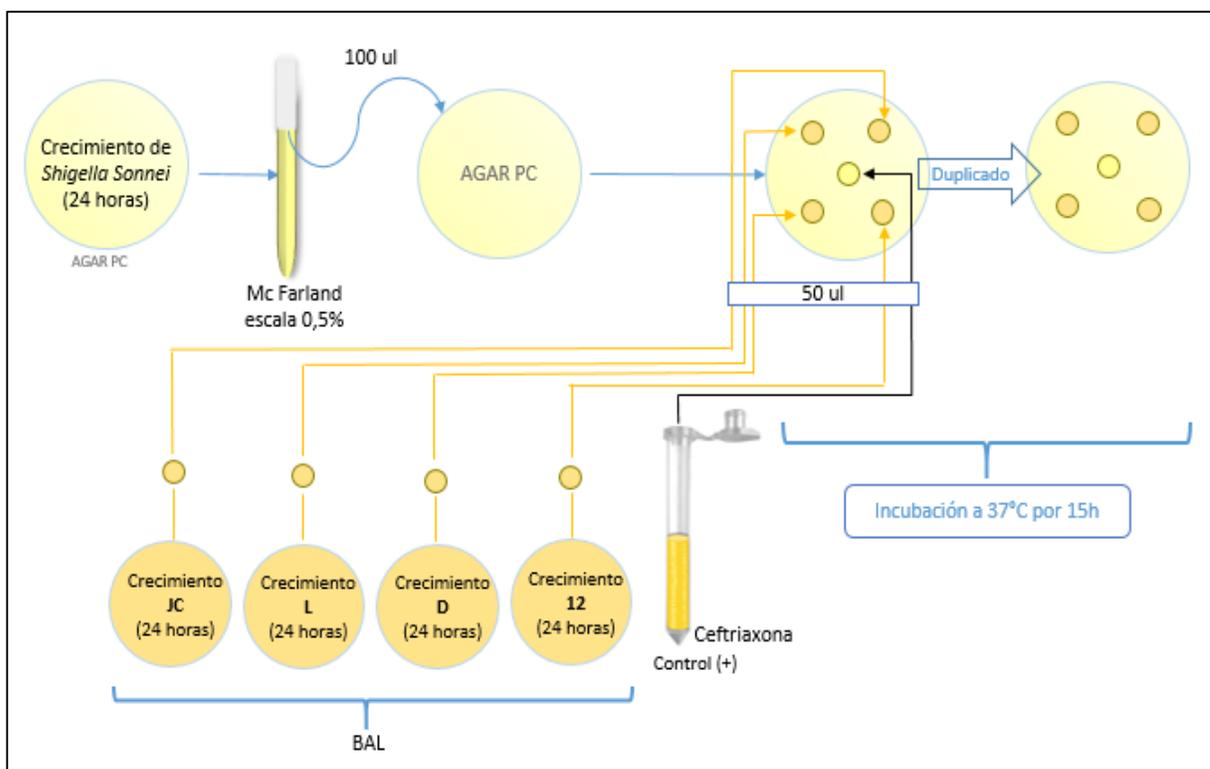


Figura 5. Esquema del ensayo de actividad antimicrobiana en presencia de células BAL (pH ácido) contra *Shigella sonnei* ATTC 25931.

3.3.2.2 Método de pocillos

Se consideró mediante la técnica de difusión de pocillos, para evaluar la inhibición de los patógenos en ausencia de las células de las BAL con pH ácido (4-5) y neutro (7).

Inicialmente se realizó un filtrado de células de las BAL, donde en cada caso se depositaron una porción de ellas (provenientes de un cultivo en masa de 24 horas en agar MRS), en tubos que

contenían caldo de Man, Rogosa, Sharpe (MRS Broth, Oxoid, Inglaterra) llevándolas a escala McFarland 2%, incubados a 37°C (Figura 6), pasadas las 24h se adicionó el líquido en Eppendorf (Nest, china) de 1,5 y 15 ml para pH ácido y neutro respectivamente, para llevarlos a la centrifuga (Heraus- pico 17, Thermo Scientific, Alemania) y centrifuga (Hettich-EBA 200, Alemania) a 6000 rpm durante 10 minutos respectivamente. Finalmente con ayuda de filtros de jeringa de membrana de acetato de celulosa (CA) de 0,2 µm (Sartorius stedim-Minisart, Alemania) se separó el sobrenadante, para obtener la sustancia libre de células (Figura 7).

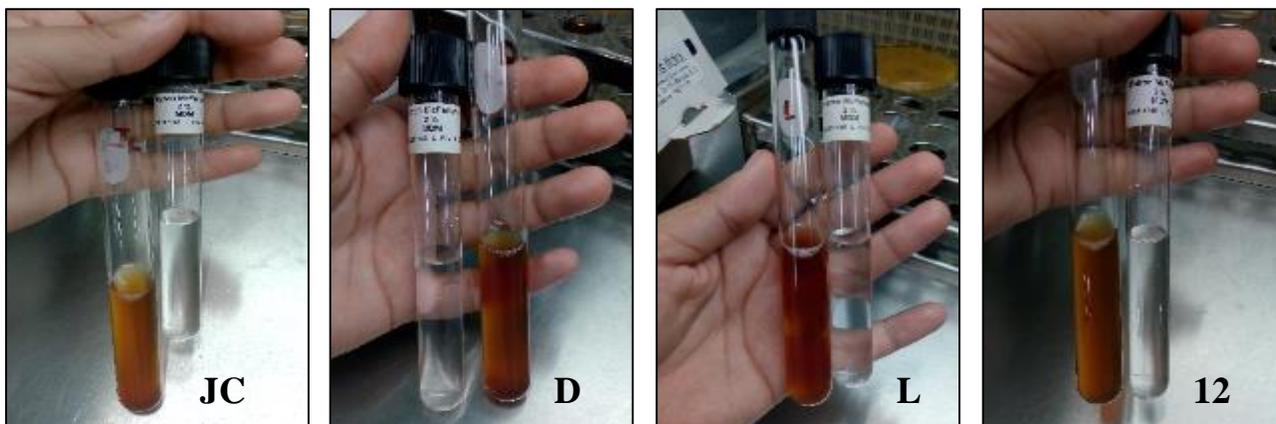


Figura 6. Siembra de las BAL (JC, D, L, 12) en caldo MRS.



Figura 7. A) Centrifuga B) micro centrifuga C) filtros Sartorius stedim D) liquido sobrenadante de las BAL en eppendorf.

En la prueba en ausencia de células de BAL con pH neutro, el pH se verificó con cinta medidora y se ajustó con hidróxido de sodio (NaOH, Emsure, Alemania) al 1% normal.

Se seccionaron 5 pocillos de 7 mm de diámetro usando un sacabocados estéril (Kheir *et al.*, 2014) en agar PC donde estaba inoculado en superficie el cultivo de *Shigella sonnei* ATCC 25931 ajustado a escala McFarland 0.5%, se adicionaron en los pocillos 50 µl de cada sobrenadante y, como control positivo, el antibiótico Ceftriaxona (Nirlife-Aculife, India). Las placas se dispusieron en incubación

a 37°C durante 15h. La franja de inhibición por las bacterias ácido lácticas aisladas se midió con una regla en milímetros (Kheir *et al.*, 2014). En todos los casos se realizó por duplicado (Figura 8).

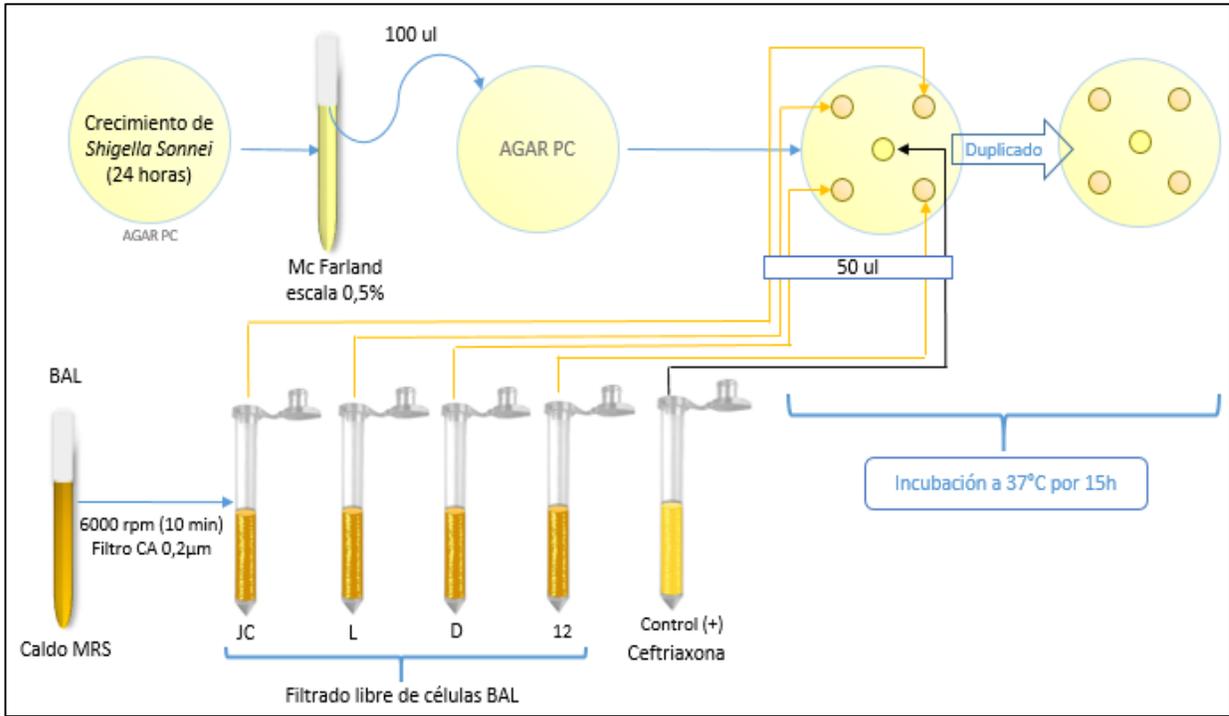


Figura 8. Esquema del ensayo de actividad antimicrobiana en ausencia de células BAL (pH ácido y neutro) contra *Shigella sonnei* ATTC 25931.

3.3.2.3 Antibiogramas

Se evaluaron las BAL (JC, L, D, 12) mediante la técnica de difusión de pocillos con los antibióticos Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200.000 U.I.), Ceftriaxona (Nirlife-Aculife, India) y Ciprofloxacino (Bioquímico Pharma S.A, Colombia) en medio de agar MRS, donde se cortaron 3 pocillos de 7 mm de diámetro usando un sacabocados estéril (Kheir *et al.*, 2014), en cada pocillo se adicionó 50 µl del respectivo antibiótico. Finalmente se incubaron a 37°C durante 17 h. La zona de inhibición generada por los antibióticos se midió con una regla en milímetros (Kheir *et al.*, 2014). En todos los casos se hizo por duplicado.

Calculo de la zona (%) de inhibición

Para demostrar la capacidad inhibitoria de los extractos de *M. oleifera*, las BAL y la susceptibilidad de estas últimas frente a los antibióticos, se determinó mediante la siguiente ecuación (2), (Barragán, 2012).

$$\%IH = \left(\frac{\phi H_{ext} - \phi H_b}{\phi H_{cp} - \phi H_b} \right) * 100 \quad (2)$$

Donde,

ØH_{ext}: halo del extracto, **ØH_b**: halo del blanco (7 mm) y **ØH_{cp}**: halo del control positivo

3.4 Efecto del polvo de moringa en carne de cerdo

3.4.1 Cosecha de hojas de *M. oleífera*

Las hojas frescas de *M. oleífera* se obtuvieron de ramificaciones secundarias, adquiridas de la Granja Experimental de la Universidad Surcolombiana (Figura 9).



Figura 9. Hojas frescas de *M. oleífera*

3.4.2 Secado y almacenamiento de hojas *M. oleífera*

Las hojas se situaron en bandejas de aluminio para secarlas en estufa (Memmert, Alemania) a 40°C, se recomienda la deshidratación entre 40 y 50 °C para mantener la coloración verde (García, 2014; López, 2016); durante 24 horas, una vez seco el material se molió y tamizó en malla No. 35 (500 µm), posteriormente fueron almacenadas en bolsas de polietileno con sello hermético para el análisis sensorial (Zaffer *et al.*, 2014), (Figura 10).



Figura 10. A) Bandejas de aluminio con hojas frescas B) Almacenamiento hojas secas C) licuado de hojas D) Almacenamiento del polvo de hojas previamente tamizado.

3.4.3 Análisis sensorial

Se realizó una prueba hedónica sensorial con una población de 30 personas, en busca de la aceptación del polvo de moringa adicionado en carne de cerdo. El estudio constaba de 3 tratamientos (Figura 11), presentados a continuación:

T₁ – 10 gr de cerdo

T₂ – 10 gr de cerdo + 0.25 gr polvo de la hoja seca de *M. oleifera*

T₃ – 10 gr de cerdo + 0.50 gr polvo de la hoja seca de *M. oleifera*



Figura 11. A) T₁, carne de cerdo B) T₂, carne de cerdo con 0,25 gr de adición de moringa C) T₃, carne de cerdo con 0,50 gr de adición de moringa.

La prueba se realizó en la sala de análisis sensorial del Centro Surcolombiano de investigación en café – CESURCAFE (Agroindustria, Universidad Surcolombiana). A cada evaluador se le transmitió las siguientes recomendaciones: los atributos a evaluar (apariencia, olor, sabor, textura, amargo (pronunciado-leve) e impresión general) y la escala, donde esta tiene una puntuación de 1-10 en el cual, 10 es agradable y 1 desagradable (ANEXO 2), resaltando que en la evaluación debían usar las gafas con filtro rojo que se encontraban en los cubículos, para mantener la parcialidad a la hora de calificar, principalmente la apariencia. Posteriormente los evaluadores se ubicaron en los cubículos para efectuar el análisis sensorial con duración aproximada de 20 minutos (Figura 12). La prueba sensorial inicio a las 9:00 am con una duración total de dos horas y media. Los partícipes fueron hombres y mujeres pertenecientes a la Universidad Surcolombiana. Los resultados se registraron para su respectivo análisis.



Figura 12. Contenido de los cubículos

3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se estableció con el empleo del programa informático StatGraphics (Centurión XVI Versión 16.1.03). Se realizó un análisis de varianza ANOVA multifactorial con un nivel del 95,0% de confianza, para los resultados de actividad antimicrobiana de BAL en presencia y ausencia de células obtenidos en laboratorio, determinando así, como los factores implicados (BAL y Métodos de difusión: discos y pocillos) afectan significativamente sobre el porcentaje de inhibición, permitiendo una comparación entre ellos y finalmente, con los datos recolectados del análisis sensorial, se realizó un análisis de ANOVA simple con un nivel del 95,0% de confianza, para cada atributo estimado, identificando así, los atributos sensoriales que se diferencian entre los tratamientos (1,2,3) de carne cerdo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Cepas

4.1.1 Cepa bacteriana *Shigella Sonnei* ATTC 25931

A partir de la suspensión (escala McFarland 0,5%) se obtuvieron colonias aisladas de características circulares con bordes irregulares, cóncavos, opacos, translúcidas, blancuzcas, lechosas, lisas y con diámetros de 1 a 3 mm de espesor; se observan bacilos, identificando la bacteria de tipo Gram negativa (Figura 13).

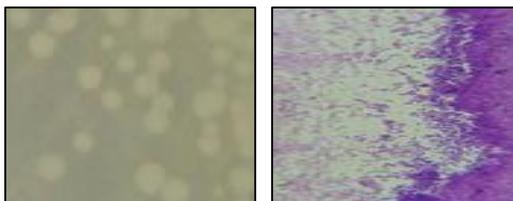


Figura 13. Fotografía macroscópica y microscópica de *Shigella Sonnei* ATTC 25931

Los tratamientos de actividad antimicrobiana (Extractos de moringa, BAL en presencia y ausencia de células) tienen concentraciones de $7,374 \pm 0.203$, $7,202 \pm 0.227$ y $7,435 \pm 0.078$ Log_{10} UFC/ml de la cepa bacteriana *Shigella Sonnei* ATTC 25931 (Tabla 1).

Tabla 1. Orden de crecimiento de la cepa bacteriana *Shigella sonnei* ATTC 25931

	Tratamientos actividad antimicrobiana	$\text{Log UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$
Patógeno <i>S. sonnei</i> ATCC 25931	Extractos de <i>M. oleifera</i>	$7,374 \pm 0.203$
	BAL en presencia y ausencia de células (pH ácido)	$7,202 \pm 0.227$
	BAL en ausencia de células (pH neutro)	$7,435 \pm 0.078$

4.1.2 Cepas BAL

Las cepas nativas JC, L, D y 12 tienen las siguientes características macroscópicas y microscópicas:

Cepa 12 (Figura 14), esta cepa tiene colonias de forma redondeada de color blanco en la periferia, en el centro color lechoso, con diámetro de 3 mm; se observaron bacilos, identificando la bacteria como Gram positiva (Cortés, 2015).

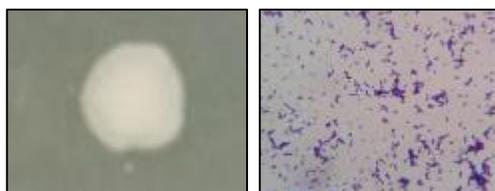


Figura 14. Fotografía macroscópica y microscópica de la cepa 12.QYB20-1 (Cortés, 2015)

Cepa L (Figura 15), tiene colonias de color blanca opaca, con diámetro de 8 mm de forma circular con apariencia de anillos concéntricos; se observaron bacilos, identificando la bacteria como Gram positiva (Ladino, 2017).

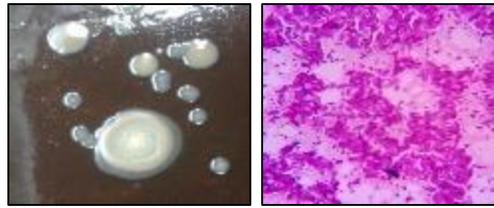


Figura 15. Fotografía macroscópica y microscópica de la cepa L.CBS24-3 (Ladino, 2017)

Cepa D (Figura 16), tiene colonias de color blanca lechosa, con diámetro 4 mm de forma circular definida; se observaron bacilos cortos con extremos lisos – sin agrupación, identificando la bacteria como Gram positiva (Ladino, 2017).

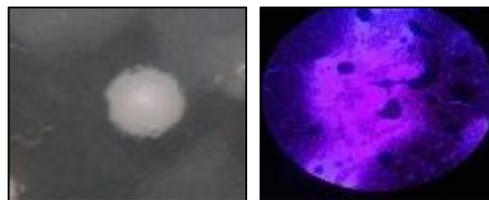


Figura 16. Fotografía macroscópica y microscópica de la cepa D.CPAO-4 (Ladino, 2017).

Cepa JC (Figura 17), tiene colonias de características circulares, cóncavas, amarillosas, lechosas, con diámetros de 1 mm aproximadamente de espesor; se observa cocos, las bacterias son de tipo Gram positiva.

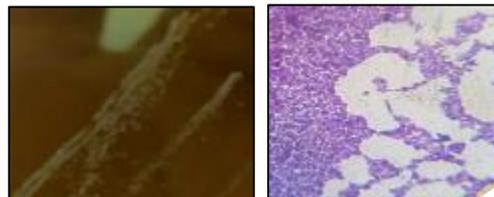


Figura 17. Fotografía macroscópica y microscópica de la cepa JC (Leche materna).

Identificación bioquímica BAL JC

La bacteria ácido láctica JC es catalasa positiva y fue identificada como *Lactobacillus acidophilus* 3, cabe resaltar que esta prueba bioquímica es una estimación de la identificación de esta cepa, puesto que tiene más afinidad con las características fenotípicas, no es del todo fiable. Es importante realizar pruebas más específicas tales como las de biología molecular.

4.2 Ensayos actividad antimicrobiana

4.2.1 Evaluación de los extractos de hojas secas de *M. oleífera*

La tabla 2 presenta los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas secas de *M. oleífera*.

Tabla 2. Zonas de inhibición de diferentes concentraciones de los extractos de *M. oleifera*

Extracto	Hexano			Cloroformo			Metanol			C. negativo	C. positivo
	Concentración $\mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$									Volumen 50 μl	
	10	20	30	10	30	50	10	30	50	Inhibición (mm)	
<i>S. sonnei</i> ATCC 25931	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	50,42 \pm 0,138

*R: resistencia

La tabla 2 presenta los extractos vegetales y las concentraciones evaluadas, se evidencia resistencia de la cepa de referencia *Shigella sonnei* a los extractos (Figura 18); confirmación del efecto inhibitorio en el control positivo (halos de inhibición considerables frente al patógeno) y resistencia en el control negativo. Los resultados evidencian que los extractos de moringa obtenidos no tienen la capacidad de inhibir a *Shigella sonnei* ATCC 25931, cuando la población es $7,374 \text{ Log ufc}\cdot\text{ml}^{-1}$. Adicionalmente, puede atribuirse a las concentraciones mínimas inhibitorias; Rahman *et al* (2009) presentaron efecto inhibitorio de extracto de hoja fresca en etanol frente a *S. Sonnei* con concentraciones de $117.5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$ e informaron crecimiento microbiano con extracto de hoja seca a la misma concentración, además de sensibilidad de *S. sonnei* a la tetraciclina. Por lo tanto, es conveniente incrementar las concentraciones de los extractos vegetales.

Por otra parte, en investigaciones con extractos de moringa frente a otros patógenos se encontró: Kheir *et al* (2014) publicaron potencial bactericida de extractos de semilla de *Moringa* en alcohol y agua, seguido en menor medida del extracto de hojas y flores en alcohol. Respecto al extracto de hojas en alcohol obtuvieron una concentración mínima inhibitoria de $62.5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$, evidenciando halos de inhibición de 7 mm con concentraciones de $125 \mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$ frente a *S. aureus* ATCC 25923; Gomashe *et al* (2014) informaron resistencia microbiana de *S. aureus* frente a extractos de cloroformo, etanol y metanol de hojas de *Moringa* con concentración de $30 \mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$ y sensibilidad a la Gentamicina a la misma concentración de los tratamientos y Yentude *et al.*, en 2015, publicaron que el extracto de etanol de *M. oleifera* exhibió una actividad de amplio espectro y mostró un mayor potencial en su capacidad para inhibir todos los aislamientos de despojos de carne de res, que el extracto acuoso de *M. oleifera*. Esto puede ser el resultado de los fitoquímicos inherentes (alcaloides, saponinas, fenoles, taninos, flavonoides, esteroides, filobataninos, etc.) según lo informado por Bukar *et al.*, 2010 es el hecho de que estos fitoquímicos se disuelven fácilmente en etanol en comparación con el agua.

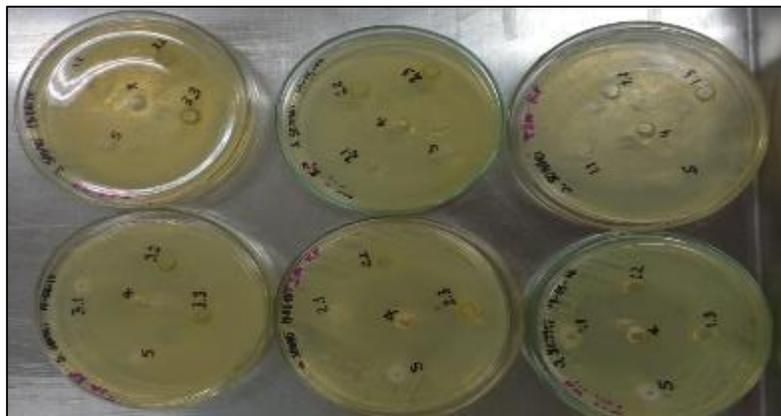


Figura 18. Ensayo de inhibición con extractos de *M. oleifera* contra *Shigella sonnei* ATCC 25931.

4.2.2 Evaluación de Bacterias ácido lácticas (BAL)

4.2.2.1 Método de discos

La tabla 3 presenta los resultados obtenidos en la evaluación de las BAL en presencia de células:

Tabla 3. Zona de inhibición de las BAL con el método de difusión de discos.

BAL	JC	L	D	12	C. positivo
	<i>S. sonnei</i> ATTC 25931				
Inhibición	Volumen 50 µl				
(mm)	16,00 ± 0,283	28,50 ± 0,707	29,25 ± 0,106	24,75 ± 0,884	52,50 ± 0,288
Zona (%)	19,78	47,25	48,90	39,011	100

Se evidencia formación de halos inhibitorios en las BAL en todas las cepas nativas, sin embargo no tiene una zona elevada de inhibición frente al patógeno *Shigella sonnei*. Se confirma la acción del control positivo con un halo de diámetro de 52,50 mm aproximadamente (Figura 19).

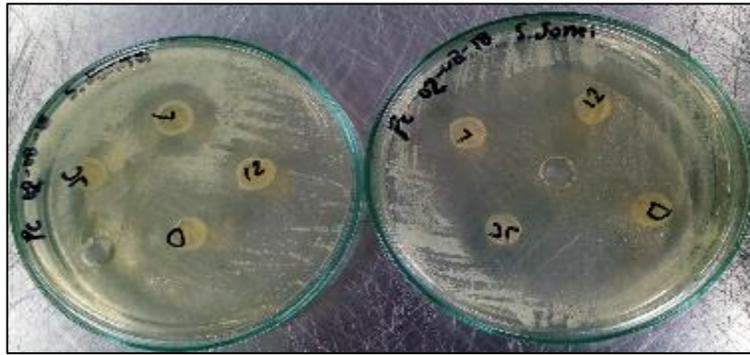


Figura 19. Ensayo de inhibición en presencia de células BAL (pH ácido) contra *Shigella sonnei* ATTC 25931.

4.2.2.2 Método de pocillos

La tabla 4 presenta los resultados adquiridos en la evaluación de las BAL en ausencia de células (pH ácido).

Tabla 4. Zona de inhibición de las BAL con el método de difusión de pocillos (pH ácido).

BAL	JC	L	D	12	C. positivo
	<i>S. sonnei</i> ATTC 25931				
Inhibición	Volumen 50 µl				
(mm)	R	16,50 ± 0,173	21,50 ± 0,311	R	55,50 ± 0,253
Zona (%)	-	19,59	29,90	-	100

*R: resistencia

Los ácidos orgánicos de las cepas L y D Inhibieron *Shigella sonnei* ATTC 25931, por otra parte los metabolitos de las cepas JC y 12 no inhibieron al patógeno *Shigella sonnei*, Se denota que cada BAL produce metabolitos diferentes y se considera que la actividad antimicrobiana es dependiente de la

cepa y no es una característica que se generalice al grupo de BAL. Se reafirma la acción del control positivo con halos de diámetro de 55,50 mm aproximadamente (Figura 20).



Figura 20. Ensayo de inhibición en ausencia de células BAL (pH ácido) contra *Shigella sonnei* ATTC 25931.

La tabla 5 presenta los resultados de la evaluación de las BAL en ausencia de células (pH neutro).

Tabla 5. Zona de inhibición de las BAL con el método de difusión de pocillos (pH neutro).

BAL	JC	L	D	12	C. positivo
<i>S. sonnei</i> ATTC 25931					
Volumen 50 µl					
Inhibición (mm)	R	R	R	R	54,50 ± 0,420
Zona (%)	-	-	-	-	100

*R: resistencia

En condiciones de pH 7 se estudia el efecto de las bacteriocinas frente a *Shigella sonnei* ATCC 25931 y los resultados muestran que las BAL evaluadas no poseen bacteriocinas que inhiban en crecimiento del patógeno en estudio, se ratifica la acción del control positivo con halos de diámetro de 55,50 mm aproximadamente (Figura 21).

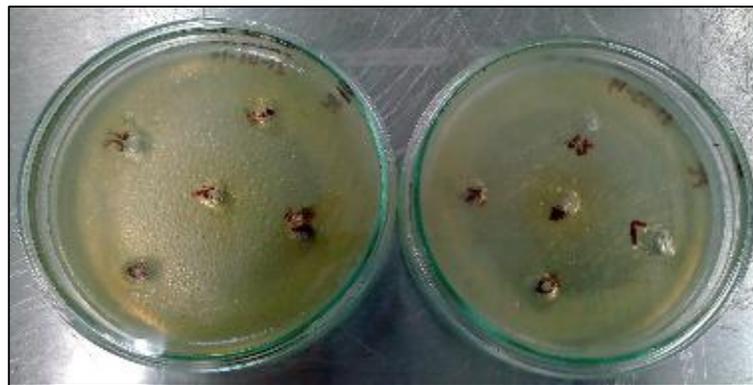


Figura 21. Ensayo de inhibición en ausencia de células BAL (pH neutro) contra *Shigella sonnei* ATTC 25931.

En las pruebas *in vitro*, el método de discos mostro una considerable inhibición de BAL frente al patógeno, siendo D y L las cepas de mayor zona de inhibición con 48,90% y 47,25% respectivamente; en la técnica de pocillos con pH ácido, los ácidos orgánicos de las cepas D y L inhibieron el crecimiento

del patógeno con una zona de inhibición de 29,90% y 19,59% respectivamente, y en la técnica de pocillos con pH neutro, las bacteriocinas de las BAL estudiadas no inhibieron en el crecimiento de la cepa bacteriana (Figura 22).

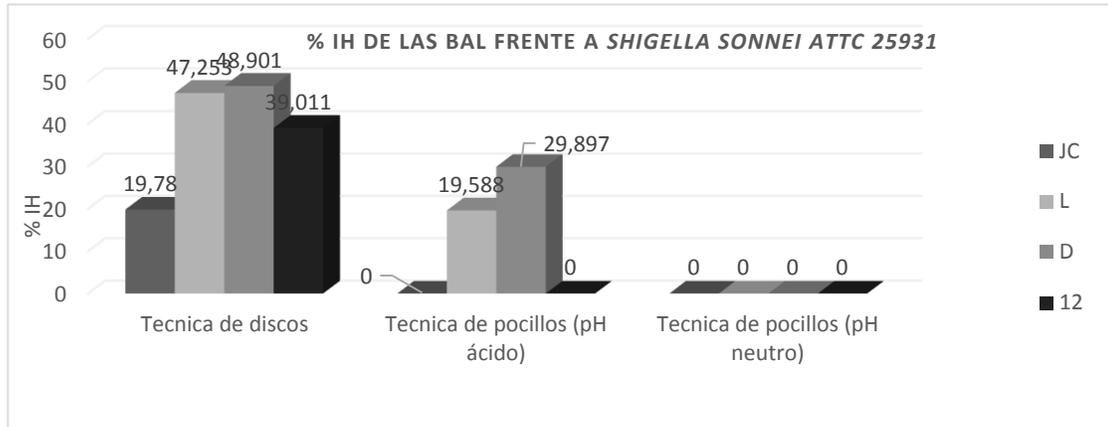


Figura 22. Porcentaje de inhibición BAL frente a *S. sonnei*

En la tabla 6 se observa los valores-P obtenidos mediante ANOVA multifactorial para los factores BAL y método, estos valores prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Los 3 valores-P son menores que 0,05, es decir, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre %IH con un 95,0% de nivel de confianza. Se deduce que el efecto inhibitorio de las BAL frente a *Shigella Sonnei* ATCC 25931 presenta diferencias significativas ($p < 0.05$) entre BAL y métodos.

Tabla 6. Valor-P de los factores BAL y método

	BAL	METODO	INTERACCIONES
Valor-P	0,0000	0,0001	0,0305

En la figura 23 se evidencia la grafica de medias del porcentaje de inhibicion en cada uno de los metodos, difiriendo que el metodo con mayor porcentaje de inhiacion frente al patogeno *shigella sonnei*, es el metodo de discos, donde se encuentran las celulas de las BAL.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

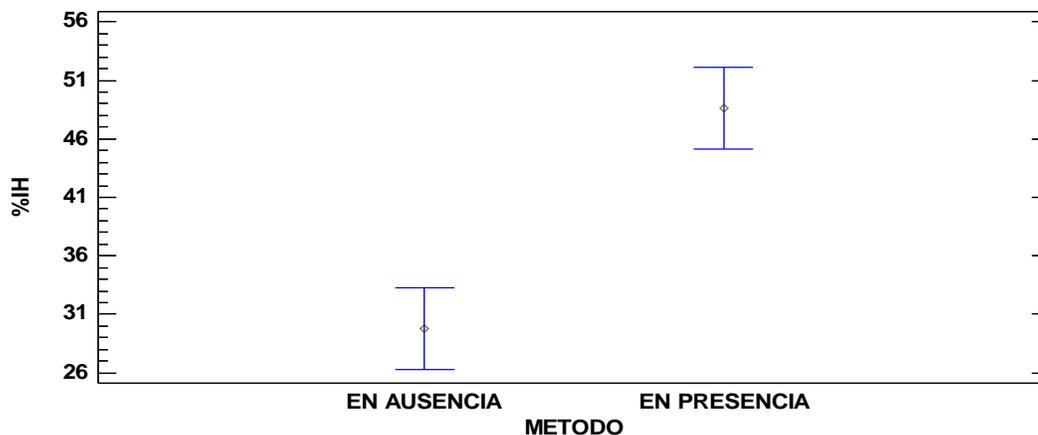


Figura 23. Medias del %IH de las BAL con los métodos de difusión

Se observa el comportamiento de cada una de las BAL respecto al control positivo con los métodos de difusión, así mismo se contrasta que las BAL con un mayor grado de Inhibición se presenta en el método de difusión de discos; la cepa nativa D es la que tiene un mayor comportamiento tanto en el método de discos (presencia) como en el método de pocillos (ausencia). Cabe resaltar que el efecto antimicrobiano que tienen las cepas nativas de BAL frente al patógeno *Shigella sonnei* ATCC 25931 es dependiente de estas mismas, no se puede afirmar que todas las cepas nativas de queso, café y leche materna tengan esta actividad antimicrobiana frente al patógeno *Shigella sonnei* ATCC 25931, Las pruebas realizadas son cualitativas; sin embargo, pueden ser de utilidad en futuras investigaciones *in vivo* (Figura 24).

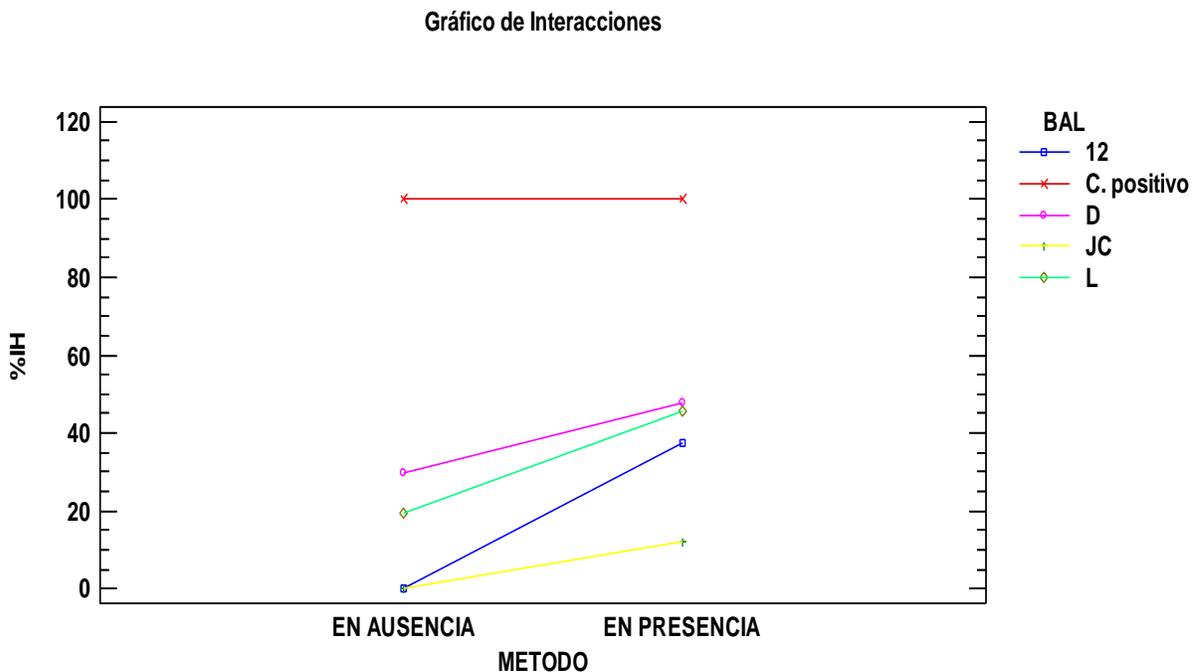


Figura 24. Gráfico de interacciones de las BAL con los diferentes métodos

Los resultados obtenidos de las BAL frente a *Shigella sonnei* ATCC 25931 en condiciones de pH 7, se relacionan con los hallazgos encontrados por el autor Amorochó en 2011, donde no tuvieron ningún efecto antagónico los sobrenadantes de las BAL estudiadas a pH 7 frente a las cepas de *Salmonella spp.* Estudiadas, estos resultados coinciden con otros estudios que concluyen la importancia de la presencia de células para adherirse y colonizar las células epiteliales del antro del estómago. Sin embargo, estudios frente a *H. pylori* mostraron que la mayor parte de las BAL evaluadas presentaron actividad inhibitoria en presencia y ausencia de células; otros autores han profundizado en evaluar el compuesto que está actuando, tales como: Smaoui *et al.*, 2010, donde establece que la cepa TN635 tiene un compuesto antimicrobiano de origen proteico, estable al calor, activo entre pH 3 y 11, con una masa molecular aproximada de 4 KDa y con efecto bactericida frente a *Listeria ivanovii* BUG 496. Estos estudios han identificado que los compuestos por estas BAL son más activos a pH ácidos que en condiciones neutras, donde se asume que se ha generado ácido láctico, pero es importante tener una identificación molecular, la cual permita identificar si solo hay presencia de este ácido o se presentan otros ácidos orgánicos, es transcendental para investigaciones posteriores cuantificar la concentración de estos compuestos.

Además, en el estudio de Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra se encontró que este producto contiene bacterias ácido lácticas que muestran actividad antimicrobiana contra los patógenos de *H. pylori*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis* (Amarocho, 2011), del mismo modo, otros autores aseguran que encontraron cepas ácido lácticas obtenidas de alimentos que inhibieron el crecimiento de estos mismos patógenos (Maragkoudakis *et al.*, 2009; Thirabunyanon *et al.*, 2009). Conjuntamente en el estudio de actividad antimicrobiana de 131 cepas de bacterias de ácido láctico aisladas de ovejas lecheras Guirra en cepas de *Salmonella* usando pruebas de difusión en agar (en presencia y ausencia de células BAL), se mostró que se requiere de alta concentración de sobrenadante para observar un efecto inhibitorio mediante el ensayo de difusión en agar, se sugiere así que, *in vivo*, este efecto antimicrobiano afectaría cerca a las bacterias patógenas en la superficie epitelial solo si se producen altas cantidades de sustancias antimicrobianas. Por lo tanto, la actividad antibacteriana de estas cepas de bacterias del ácido láctico parece ser consecuencia de la actividad de diferentes factores con diferente potencia y espectro de acción (Amarocho *et al.*, 2009)

Investigaciones *in vitro* relacionadas con BAL demostraron que: en 2018, Masalam *et al.*, estudiaron 46 BAL provenientes de leche cruda y fermentada en Arabia Saudita, contra siete cepas indicadoras bacterianas, los resultados indicaron actividad antibacteriana del sobrenadante libre de células (SFC) de 25 (54.35%), 38 (82.61%), 33 (71.72%), 31 (67.39%), 11 (23.91%), 33 (71.72%) y 38 (82.61%) cepas BAL contra *E. faecalis*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella sonnei*, *S. aureus*, MRSA y *Listeria monocytogenes*, respectivamente. Y, la bacteria patógena *Yersinia pseudotuberculosis* fue sensible a todas las concentraciones (50, 75, 100 y 150 µl) de *Lactococcus lactis* (Jurado *et al.*, 2016), según Khemariya *et al.*, (2014) el *Lc. lactis* es capaz de producir compuestos como ácido, peróxido de hidrógeno y nisina, los cuales se han identificado por contribuir en la actividad antimicrobiana de esta bacteria.

4.2.2.3 Antibiogramas

La tabla 7 presenta los resultados de la prueba microbiológica para determinar la susceptibilidad de las BAL con 3 tipos de antibióticos.

Tabla 7. Resultados del antibiograma.

BAL	JC	L	D	12
Antibiótico	Volumen 50 µl			
	Inhibición (mm)			
A	28,250 ± 0,106	36,500 ± 0,353	55,000 ± 0,212	46,000 ± 0,848
B	34,250 ± 0,247	28,500 ± 0,565	41,250 ± 0,318	39,750 ± 0,318
C	33,250 ± 0,035	26,000 ± 0,212	32,750 ± 0,247	39,000 ± 0,070

Nota. A: Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200.000 U.I.). **B:** Ceftriaxona (Nirlife-Aculife). **C:** Ciprofloxacino (Benemid-Bioquimico pharma S.A).

La BAL que mayor sensibilidad mostro fue la D con el antibiótico Penicilina G. Benzatínica y Ceftriaxona respectivamente, así mismo, la BAL L mostro menor inhibición con los antibióticos ceftriaxona y Ciprofloxacino respectivamente. De manera general las BAL (L, JC, D, 12) al ser inhibidas *in vitro* por la concentración de los antimicrobianos (A, B, C) fueron susceptibles (Figura 25), evidenciando que los antibioticos tienen efectos inhibitorios en ellas; las BAL son suplementos

dietarios microbianos, viables, seleccionado que cuando son introducidos en suficientes cantidades, afectan benéficamente el organismo humano a través de sus efectos en el tracto intestinal (Khalil, 2007; Grajek *et al.*, 2005), la concentración sugerida de BAL está en el rango 10^6 - 10^7 UFC/g de producto (Ruiz *et al.*, 2008; Hummel *et al.*, 2007), por tanto si se quiere combatir una infección provocada por el patógeno *Shigella sonnei* ATCC 25931, se debería suministrar la BAL sola sin el antibiótico para que sea efectiva, debido a que los antibióticos son moléculas bactericidas/bacteriostáticas que controlan infecciones bacterianas, su uso incorrecto favorece multirresistencia o falla terapéutica en el caso de cepas bacterianas naturalmente resistentes, generando así un riesgo para la salud (Rodríguez *et al.*, 2016).

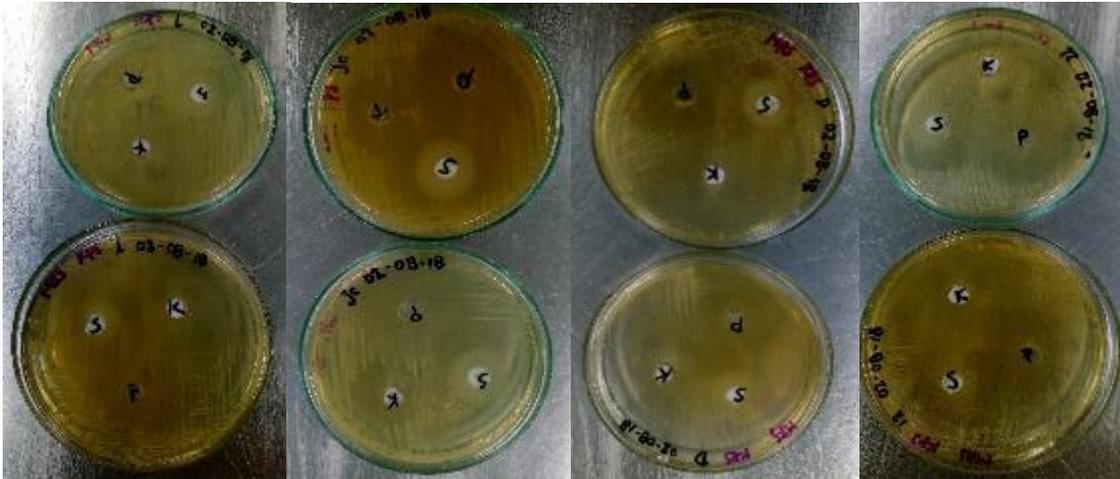


Figura 25. Evaluación de los antibiogramas: BAL (pH ácido) frente antibióticos (A, B, C).

4.3. Efecto del polvo de moringa en carne de cerdo

4.3.1 Cosecha, secado y almacenamiento de hojas *M. oleífera*

Se recolectaron hojas frescas de *M. oleífera*, esta labor se realizó sin maltratos a ramificaciones y hojas del árbol, el secado se realizó en la estufa por convención forzada, a una temperatura de 40°C para evitar la pérdida de sus propiedades, las hojas adquirieron un aspecto verdoso opaco, estas alcanzaron una humedad del 3,36% aproximadamente, almacenándose por 2 semanas en bolsas polietileno con sello hermético (Ziploc). La elaboración del polvo con el tamiz No. 35 fue el más adecuado para las características físicas requeridas en el análisis sensorial.

4.3.2 Análisis sensorial

Se realizó la identificación de aceptabilidad de cada uno de los aspectos estimados en la prueba hedónica sensorial del polvo de *M. oleífera* adicionado en carne de cerdo, manifestando en la tabla 8 los resultados obtenidos:

TABLA 8. Razón-F y nivel de significancia obtenido en ANOVA simple con un nivel del 95,0% de confianza, para los atributos evaluados en los tratamientos 1, 2 y 3.

ATRIBUTOS	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
-----------	----------------	----------------

Apariencia	19,69	0,0000
Sabor	1,49	0,2308
Olor	0,88	0,4166
Textura	1,84	0,1643
Amargo	5,02	0,0086
Impresión general	3,31	0,0413

En la tabla 8, el análisis estadístico manifiesta que los atributos de olor, sabor y textura no adquirieron diferencias estadísticamente significativas, teniendo en cuenta que el valor-P es mayor de 0,05, sin embargo, los atributos de apariencia, amargo e impresión general si obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con valor- P menor de 0,05.

Las gráficas de las medias de cada uno de los atributos del análisis sensorial se muestran a continuación, con el fin de describir detalladamente cada atributo evaluado.

4.3.2.1 Apariencia

En la figura 26 se observa las medias de los puntajes derivados del atributo apariencia en cada uno de los tratamientos, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la media de Apariencia entre un nivel de Tratamiento y otro, con valor-P igual a 0,0000. La diferencia entre ellos se manifiesta notablemente entre el primer y los dos últimos tratamientos, con puntuación mayor en T₁ y menor entre T₂ y T₃. El atributo apariencia es el menos aceptado en la prueba sensorial.

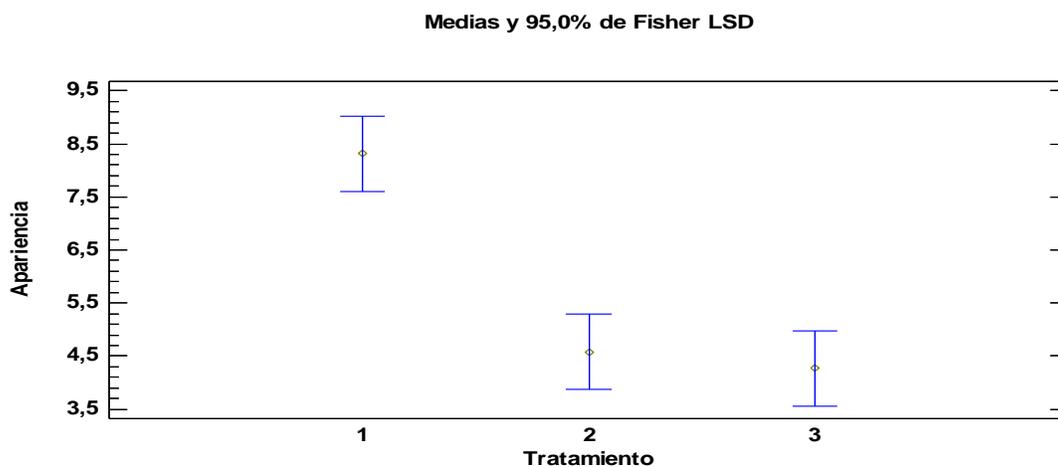


Figura 26. Medias del atributo: Apariencia

4.3.2.2 Sabor

En la figura 27 se observa las medias de los puntajes derivados del atributo Sabor en cada uno de los tratamientos, todos los tratamientos tienen un traslape indicador, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Sabor entre un nivel de Tratamiento y otro, con valor-P igual a 0,2308. Donde el T₁ (testigo) no presenta diferencias significativas respecto a los 2

tratamientos consecutivos, enfatizando que el T₃ tuvo una buena calificación. Concluyendo así, que al deleitar las muestras con la adición del polvo de *M. oleifera* en la carne de cerdo es aceptada con las cantidades suministradas.

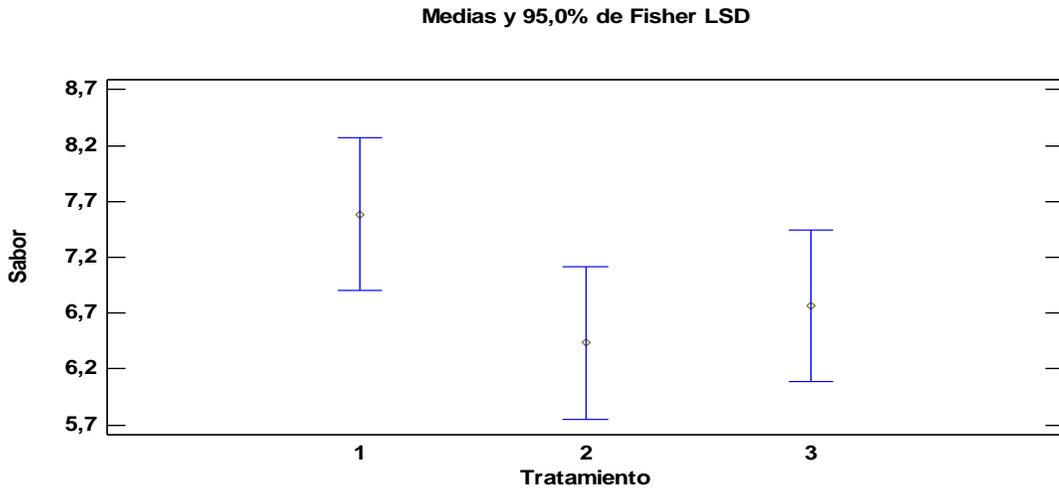


Figura 27. Medias del atributo: Sabor

4.3.2.3 Olor

En la figura 28 se observa las medias de los puntajes derivados del atributo Olor en cada uno de los tratamientos, los tratamientos tienen un traslape significativo, donde el atributo del olor no presenta diferencias significativas entre un tratamiento y el otro, es similar al atributo del Sabor, sin embargo la puntuación del traslape entre los T₂ y T₃ son muy afines. Se infiere que el polvo de *M. oleifera* no afecta considerablemente el olor del producto.

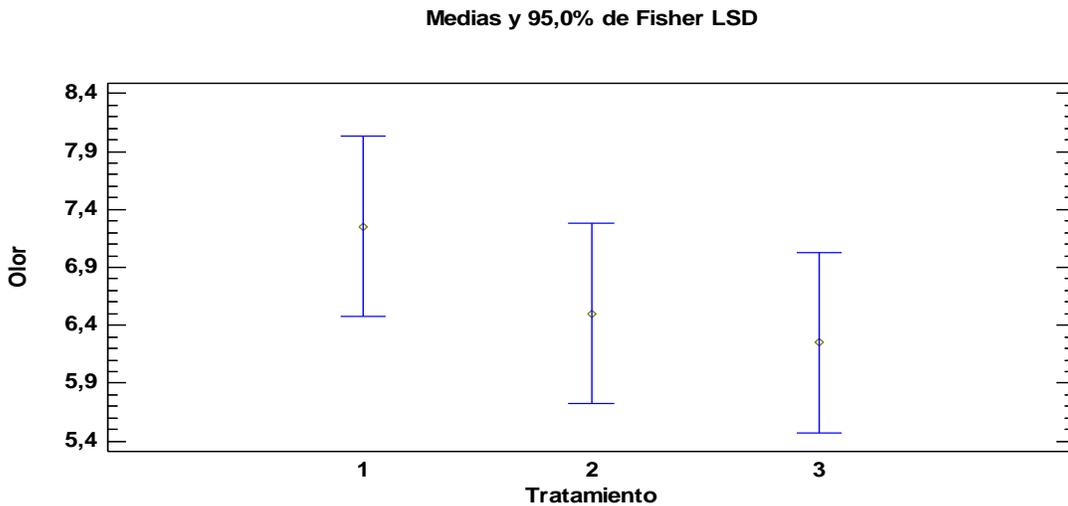


Figura 28. Medias del atributo: Olor

4.3.2.4 Textura

En la figura 29 se observa las medias de los puntajes derivados del atributo Textura en cada uno de los tratamientos, entre tratamientos se evidencia traslape, los T₂ y T₃ se asemejan considerablemente,

cabe resaltar que respecto al T₁ no es muy notoria su intersección, sin embargo no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Textura entre un nivel de Tratamiento y otro. Es de resaltar que en comparación con el tratamiento testigo (T₁), el T₂ tuvo mejor puntuación que el T₃. Relacionando así, que la textura no afecta de manera pronunciada el producto.

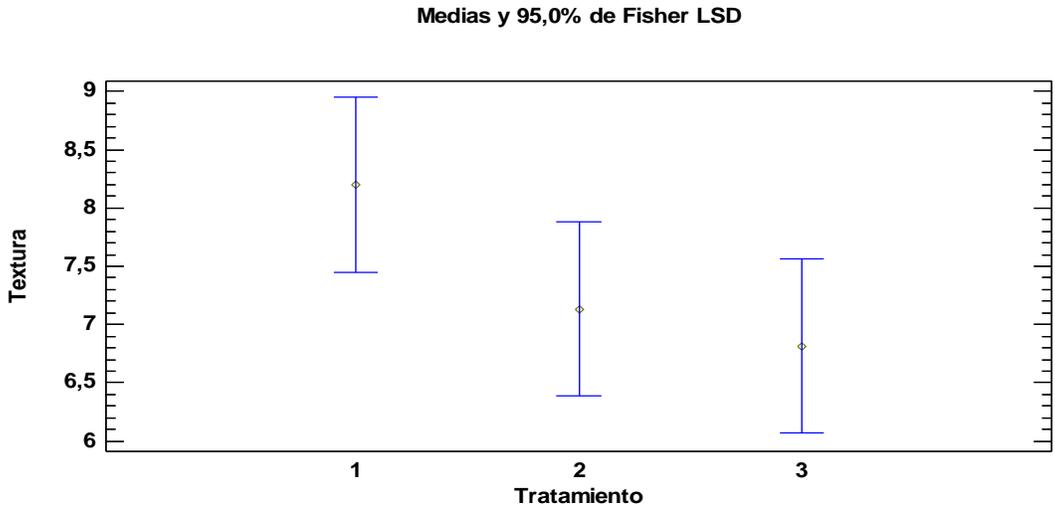


Figura 29. Medias del atributo: Textura

4.3.2.5 Amargo

En la figura 30 se observa las medias de los puntajes derivados del atributo Amargo en cada uno de los tratamientos, los T₂ y T₃ traslapan considerablemente, pero el T₁ presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) frente a los otros tratamientos. Este atributo es importante en el análisis sensorial puesto que es característico de la planta *M. oleifera*. Es transcendental mencionar que este atributo tuvo una puntuación muy baja respecto a los otros, y además, que siendo T₁ el tratamiento testigo (cerdo sin adición de moringa) fue el más bajo, siendo menos aceptada, se puede deducir que el polvo de *M. oleifera* aparte de aplicarse como una adición, conlleva a darle un sabor agradable a la carne de cerdo.

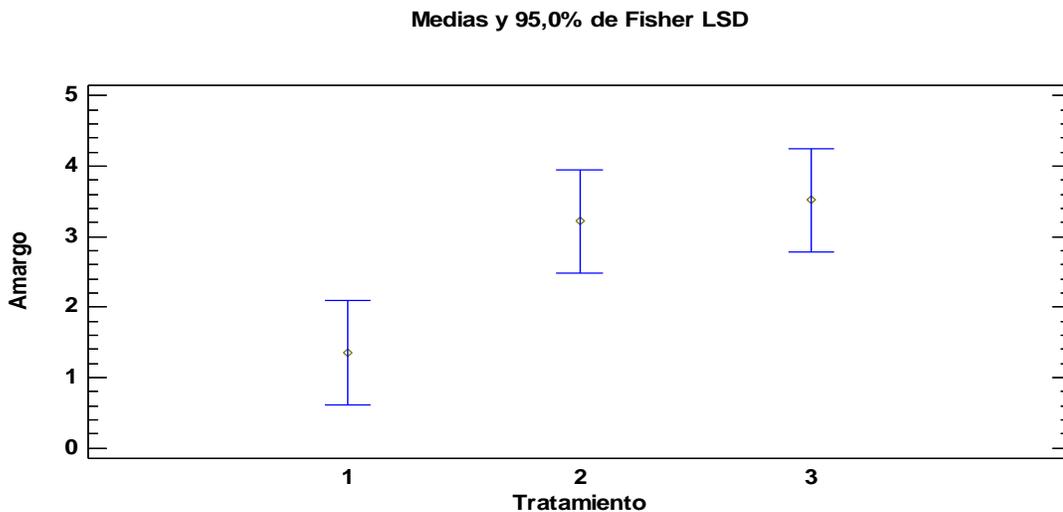


Figura 30. Medias del atributo: Amargo

4.3.2.6 Impresión General

Para finalizar, en la figura 31 se observa las medias de los puntajes derivados del atributo Impresión General en cada uno de los tratamientos, se evidencia que entre tratamientos hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Existe un ligero traslape entre T₂ y T₃ obteniendo puntajes más próximos entre ellas pero más bajos que el T₁. Sin embargo este atributo contiene puntajes más altos que el atributo de apariencia y amargo (Figura 26 y 30).

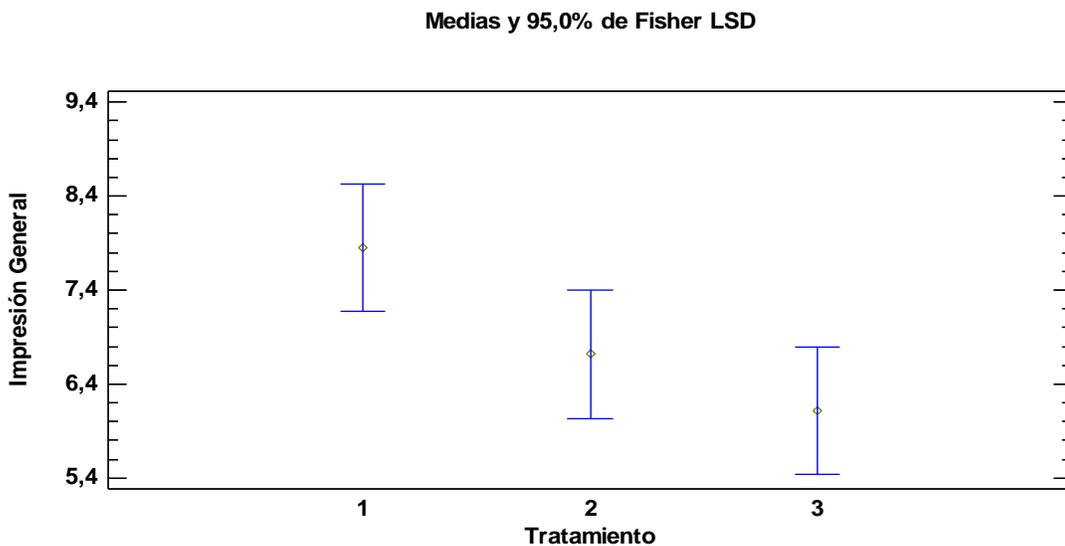


Figura 31. Medias del atributo: Impresión General

En términos generales, tanto el tratamiento 2 y 3 en comparación al tratamiento testigo (T₁) presentaron una buena aceptación en la mayoría de los atributos evaluados siendo el T₂ la muestra con mayor afinidad. Se concluye que la aceptación del producto está inversamente relacionada con la cantidad de adición de polvo *M. oleifera*, es decir a menor cantidad de polvo *M. oleifera* mayor aceptación.

Es importante realizar estudios no solo sensoriales sino microbiológicos en la carne porcina con las alternativas naturales expuestas (*M. oleifera* y BAL), puesto que se conoce que la carne bovina y derivados cárnicos constituyen un sustrato excelente para el aislamiento de *Lactobacillus* spp. productores de bacteriocinas (Schillinger, *et al.*, 1989). La carne porcina, en tanto, no ha sido matriz de estudio para el aislamiento de *Lactobacillus* hasta el momento. Por otra parte, la carne de cerdo y sus subproductos representan una excelente matriz para el desarrollo de patógenos, un estudio reciente ha detectado *Salmonella* spp. y *S. aureus* en muestras obtenidas en distintas etapas de la cadena productiva porcina (Colello *et al.*, 2016). Por lo tanto, estos patógenos pueden ser el origen de diversas enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), de allí la importancia de investigar una alternativa por un medio biológico, a través de la aplicación de cepas BAL que puedan controlarlos o disminuirlos en toda la cadena de producción porcina, esto representaría una alternativa beneficiosa tanto para la producción de carne y productos porcinos como para la salud pública (Ruiz *et al.*, 2017).

5. CONCLUSIONES

Los extractos de *M. oleifera* en concentraciones de hexano (10, 20 y 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$), cloroformo y metanol (10, 30 y 50 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$) y, los compuestos proteicos antibacterianos (Bacteriocinas) de las BAL aisladas de queso huilense, de proceso de fermentación de café y de leche materna no inhibieron el crecimiento de *Shigella Sonnei* ATCC 25931, sin embargo, las BAL mediante la presencia de las células, sus componentes, exclusión competitiva de nutrientes o presencia de ácido láctico si lograron inhibir el crecimiento del patógeno. La actividad antimicrobiana es dependiente de la cepa láctica y de la cepa patógena, no se puede atribuir a un género o especie en general. Por tanto, las cepas BAL evaluadas pueden emplearse en la producción de alimentos saludables y seguros. Además, se evidencio que el uso de las hojas de *M. oleifera* deshidratada en cantidad de 0,25 gr en carne como la de cerdo tuvo buena aceptación. Conjuntamente se demostró una amplia efectividad del antibiótico frente *Shigella Sonnei* ATCC 25931.

Recomendaciones

- Se recomienda para futuras pruebas conocer la dosis de siembra de las BAL.
- El estado de los extractos dificulta el cumplimiento del desarrollo de la metodología propuesta, no permite una homogenización completa, es importante tener extractos acuosos.
- Realizar estudios de actividad antimicrobiana en carne de cerdo con las alternativas naturales expuestas (*M. oleifera* y BAL).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adewumi, T., Oyeyinka, Samson, A., (2018). Moringa oleifera as a food fortificant: Recent trends and prospects. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. Volume 17. Pages 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.02.002>

Amorocho-Cruz, C. M., (2011). *Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra*. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Amorocho-Cruz, C. M., García-Hernández, J., Moreno-Trigos, Y., Jimenez-Belenguer, A., Ferrús-Pérez, M. A., Hernández-Pérez, M., (2009). *In vitro* effect of lactic acid bacteria isolated from guirra sheep against *Salmonella* spp. Department of Biotechnology, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Bardhan, P., Faruque, A., Naheed, A., & Sack, D. A., (2010). Decreasing Shigellosis-related Deaths without Shigella spp.-specific Interventions. *Asia. Emerging Infectious Diseases*, 16(11), 1718-1723. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1611.090934>

Barragán, C. C. D., (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Consultado el 18 de abril de 2018. <http://www.redalyc.org/pdf/579/57928310009.pdf>

Baskin, D. H., (1987). Shigella bacteriemia in patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Gastroenterol*; 82(4):338-41.

Bedolla, S., *et al.*, (2004). Introducción a la Tecnología de los alimentos. Ed. México: Limusa, pp 78.
Bertrand-Harb, C., Ivanova, Iskrai., Dalgarrondo, Michele., Haertllé, T., (2003). Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yoghurt fermentation. *International Dairy Journal - INT DAIRY J*. 13. 39-45. Doi.10.1016/S0958-6946(02)00140-1

Blanco, S., delahaye, P., Frangenas, N., (2006). Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Revista facultad de agronomía (Maracay) Venezuela*. Vol. 32, p. 131-144.

Bonal, R. R., Rivera, O., R.M., Bolívar, C. ME., (2012). *Moringa oleifera*: una opción saludable para el bienestar. *MEDISAN (B. aires)*. *Sci Vol.16 No.10*, Octubre 2012, pp.1596-1599. Consultado el 03 de Agosto de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102930192012001000014&lng=es&tlng=es

Bouzar F., Cerning J., Desmazeaud M., (1997). Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed – strain starter cultures in yogurt production, *Journal Dairy Science*. Vol. 80, pp. 2310-2317.

Bukar, A., Uba, A., Oyeyi, T. I., (2010). Antimicrobial profile of Moringa Lam extracts against some food borne microorganisms. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences* 3 (1): 43-48

Cai, Y., Sun, M., Xing J., Luo, Q., Corke, H., (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Science*, 78(25), 2872-2888.

Caviedes-Losada, A. F., (2019). *Promoción del consumo de Moringa oleifera como complemento nutricional, atendiendo las propiedades antimicrobianas* (tesis de pregrado). Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.

Cheila, D., M. C., Geimba, P. M., Heidrich do Amaral, P., Tondo, C. E., (2010). Antimicrobial resistance and PCR-ribotyping of *Shigella* responsible for foodborne outbreaks occurred in southern Brazil. Food Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000400015>

Colello, R., Cáceres, M. E., Ruiz, M. J., Sanz, M., Etcheverría, A. I., Padola, N. L., (2016). From farm to table: Follow-up of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* throughout the pork production chain in Argentina. Front Microbiol. 7:93, Doi:103389/fmicb.2016.00093.3

Cortés-Macías, E. T., (2015). *Evolución de atributos de calidad en queso huilense en almacenamiento refrigerado* (tesis de pregrado). Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.

Daeschel, M. A., (1993). Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. D.G. Hoover, L.R. Steenson (Eds.), Bacteriocins of lactic acid bacteria, Academic Press, pp. 63-91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-355510-6.50012-9>

Echavarría, A., Armas, H. D., Matute-L, N. L., Jaramillo, C., Rojas-de-Astudillo, L., Benítez, R., (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales. Revista Ciencia UNEMI Vol. 9, N° 20, pp. 29 – 35.

Frenck, R.W., Baqar, S., Alexander, W., Dickey, M., McNeal, M., El-Khorazaty, J., Baughman, H., Hoeper, A., Barnoy, S., Suvarnapunya, A. E., Kaminski, R.W., Venkatesan, M. M., (2018). A Phase I trial to evaluate the safety and immunogenicity of WRSs2 and WRSs3; two live oral candidate vaccines against *Shigella sonnei*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.063>

García, F. J., (2014). Evaluación de los efectos del proceso de secado sobre la calidad de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) y la Hierbabuena (*Mentha spicata*). Ed. Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Colombia. pp.104

Gomashe, A. V., Gulhane, A. P., Junghare, P. M., Dhakate, A. N., (2014). Antimicrobial Activity of Indian Medicinal Plants: *Moringa oleifera* and *Saraca indica*. Int.J.Curr.Microbiol.App. Sci. Consultado el 6 de Agosto de 2018. <https://www.ijemas.com/vol-3-6/Ashok%20V.%20Gomashe,%20et%20al.pdf>

Grajek, W., Olejnik, a., Sip, a., (2005). Review Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. Acta Biochimica Polonica. Vol. 52, p 665-671

Hummel, A., *et al.*, (2007). Antibiotic Resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. Applied and environmental microbiology. Vol 73, p. 730-739

Jurado-Gómez, H., Romero-Benavides, A., Morillo-Garcés, A., (2016). Cinética, prueba de crecimiento y efecto de inhibición de *Lactococcus lactis* sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. Biotecnología en el Sector Agropecuario. Vol 14 No. 2 (18-2 8). DOI: 10.18684/BSAA (14)18-28

Khalil, r. *et al.*, (2007). Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. African Journal of Biotechnology. Vol 6, p. 939-949

Kheir, M. S., Kafi, S. K., Elbir, H., (2014). The antimicrobial activity and phytochemical characteristic of moringa oleifera seeds, leaves, and flowers. World Journal of Pharmaceutical Research. Consultado el 5 de Agosto de 2018. <https://www.researchgate.net/publication/2709632638>

Khemariya, P., Singh, S., Nath, G., Gula-Ti, A., (2014). Diversity Analysis, Batch Fermentation and Characterization of Nisin in Identified Strains of lactococcus lactis spp. lactis. Food Biotechnology. p. 142–161.

Ladino-Garzón, W. L., (2017). *Caracterización de las bacterias ácido lácticas (BAL), hongos y levaduras que inciden durante el proceso de fermentación de café arábica (coffea arabica) y su influencia en el análisis sensorial y calidad de la taza* (tesis de pregrado). Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.

López, M. R. L., (2016). Curvas de secado y su relación a características sensoriales, composición química y uso energético de follaje de *Moringa oleifera* Lam. Ed. Universidad Nacional Agraria-Facultad de Recursos Naturales y del Ambiente. Nicaragua. 70 p.

Maged, S. Bin Masalam., Ahmed, Bahieldin., Mona, G. Alharbi., Saad, Al-Masaudi., Soad, K., Al-Jaouni., Steve, M. Harakeh., Rashad, R. Al-Hindi., (2018). Isolation, Molecular Characterization and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria in Saudi Raw and Fermented Milk. Hindawi. Volume 2018, 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/7970463>

Maragkoudakis, P. A., Mountzouris, K.C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D., Tsakalidou, E., (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food microbiology*, pp.219-226.

María, J. Ruiz., Rocío, Colello., Nora, L. Padola., Analía, I. Etcheverría., (2017). Efecto inhibitorio de Lactobacillus spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos, Revista Argentina de Microbiología, Volume 49, Issue 2, , Pages 174-177, SSN 0325-7541, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>.

Martín, C., Martín G., García A., Fernandez, T., Hernández E., Puls, J., (2013). Potenciales aplicaciones de Moringa oleífera. Una revisión crítica. Vol. 36, No. 2, pp 137-149.

Murray P., Rosenthal, K., Pfaller, M., (2009). *Staphylococcus* y cocos Gram positivos relacionados. (Eds.), Microbiología médica (6.^a ed.), Elsevier, España, pp. 209-224.

Parra, R. A., (2010), Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Vol. 8, No. 1. Consultado el 12 de septiembre de 2018, <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>

Penatti, M. P. A., Hollanda, L. M., Nakazato, G., Campos, T. A., Lancellotti, M., Angellini, M., Brocchi, M., Rocha M. M. M., Dias da Silveira W., (2007). Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil. Consultado 03 de agosto de 2018, <http://www.scielo.br/pdf/bjmb/v40n2/6429.pdf>

Qiuxia, Ma., Yong, Huang., Jian, Wang., Xuebin, Xu., Jane, Hawkey., Chaojie, Yang., Beibei, Liang., Xiaofeng, Hu., Fuli, Wu., Xiaoxia, Yang., Jinyan, Wang., Rongrui, Li., Peng, Li., Jing, Xie., Leili, Jia., Ligui, Wang., Rongzhang, Hao., Yigang, Tong., Kathryn, E. Holt., Shaofu, Qiu., Yansong, Sun., Hongbin, Song., (2018). Multidrug-resistant *Shigella sonnei* carrying the plasmid-mediated *mcr-1* gene in China, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume 52, Pages 14-21, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.02.019>.

Rahman, M. M., Sheikh, I. M., Sharmin, A. S., Islam, S. M., Rahman, A. M., Rahman, M. M., Alam, F. M., (2009). Antibacterial Activity of Leaf Juice and Extracts of *Moringa oleifera* Lam. against Some Human Pathogenic Bacteria. Consultado el 5 de agosto de 2018. <http://cmuj.cmu.ac.th/sites/default/files/pdf/NaturalSciences/Volume%208,%20Number%202,%20July-December%202009/09%20Journal%202009%20V8-2.pdf>

Ray, B., Daeschel, M. A., (1994). Bacteriocins of starter culture bacterium. V.M. Dillon, R.G. Board (Eds.), *Natural antimicrobial systems and food preservation*, CAB International, Wallingford, United Kingdom. pp. 133-165.

Rodríguez, S. C., Recalde, R. D., Padilla, S. L., (2016). Análisis del uso de antibióticos en antibiogramas de urocultivos realizados por un laboratorio clínico de la región centro-occidental de Colombia. <http://dx.doi.org/10.22267/rus.171903.100>

Ruiz, S., et al. (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*. Vol 80 p. 715-721

Saucedo-Pompa, S., Torres-Castillo, J. A., Castro-López, C., Rojas, R., Sánchez-Alejo, E. J., Ngangyo-Heya, M., Martínez-Ávila. G. C. G., (2018). *Moringa* plants: Bioactive compounds and promising applications in food products. *Food Research International*. Volume 111. Pages 438-450. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.062>.

Savadogo, A., et al., (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria- a minireview. *African journal of Biotechnology*. Vol. 5, pp 678-683.

Schillinger, U., Locke, F. K., (1989). Antibacterial activity of *Lactobacilli* sake isolated from meat. *Appl Environ Microbiol*. 55: 1901-6.13

Smaoui, S., Elleuch, L., Bejar, W., Karray-Rebai, I., Ayadi, I., Mathieu, F., Bejar, S., Mellouli, L., Mathieu, F., Chouayekh., (2010). Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Appl Biochem Biotechnol*, 162, pp.1132-1146.

Suárez, M., Entenza, J.M., Doerries, C., (2003). Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. *Biotechnol. Bioeng*. Pp. 81

Swati, Gupta., Rohit, Jain., Sumita, Kachhwaha., S. L. Kothari., (2018). Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam. Review of current status and future possibilities, *Journal of Herbal Medicine*. Volume 11. Pages 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.07.003>

Thirabunyanon, M., Boonprasom, P., Niamsup, P., (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol Lett*, 31, pp.571-576.

Torres, C. J. A., Sinagawa, G. S. R., Martinez, A. G. C. G., Lopez, F. A. B., Sanchez, G. E. I., Aguirre, A. V. E., Torres, A. R. I., Olivares, S. E., Osorio, H. E., Gutierrez, D. A., (2013). *Moringa oleifera*: phytochemical detection, antioxidants, enzymes and antifungal properties. *Phyton (Buenos Aires). Sci*, Vol.82 No. 2, December 2013, pp.193-202. Consultado el 03 de Agosto de 2018, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S185156572013000200006&lng=es&tlng=es

Valdez-Solana, M. A., Mejía, V. Y., Téllez, A., García, G., Salas, J., Alba, J. J., Sierra, E., (2015). Nutritional content and elemental and phytochemical analyses of *Moringa oleifera* grown in Mexico. *Journal of Chemistry* 2015: 1-9; DOI: 10.1155/2015/860381

Vinderola, G., et al., (2006). Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*. Vol 36 p. 254-260.

Yetunde, E. Alozie., Comfort, U. Sonye., (2015). Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera* Leaf against Isolates of Beef Offal. *British Microbiology Research Journal* 9(2): 1-7. DOI: 10.9734/BMRJ/2015/17554

Zaffer, M., Ahmad, S., Sharma, R., Mahajan, S., Gupta, A., Agnihotri, K. R., (2014). Antibacterial activity of bark extracts of *Moringa oleifera* (Lam). Against some selected bacteria. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.27, No.6, November 2014, pp.1857-1862. Consultado el 17 de abril de 2018. http://www.academia.edu/9885848/Antibacterial_activity_of_bark_extracts_of_Moringa_oleifera_Lam._against_some_selected_bacteria

ANEXOS

ANEXO 1. ANALISIS SENSORIAL



Atributo apariencia



Atributo sabor



Atributo olor



Atributo textura



Atributo amargo



Atributo impresión general

