

Determinación de las propiedades conservantes del fruto del algarrobo (*Hymenaea courbaril linneaus*) para la industria de alimentos

Luz María Alzate Tamayo*,
Diana María Arteaga González**,
Yamilé Jaramillo Garcés***

Resumen

Introducción. *Hymenaea courbaril Linneaus*, es conocida por sus propiedades antibacteriales, antifúngicas y nutricionales debido a sus características químicas y bromatológicas, constituyendo un interesante recurso para la investigación de su fruto como fuente natural con propiedades conservantes para la industria de alimentos. **Objetivo.** Evaluar la capacidad antimicrobiana del fruto del algarrobo sobre un microorganismo indicador de calidad en alimentos (*Escherichia coli*, ATCC 25922). **Materiales y métodos.** Se definieron las concentraciones en extracto alcohólico y acuoso de la pulpa, la cáscara y las semillas para inhibir el crecimiento del microorganismo. Utilizando la técnica de difusión en pozos con algunas modificaciones, la cepa de *E. coli* se sometió a la acción de los diferentes extractos. **Resultados.** En los ensayos preliminares, los mejores resultados se obtuvieron con la semilla en extracto alcohólico, por lo que se descartaron la pulpa, la cáscara y el extracto acuoso de semilla debido a su poca o nula acción inhibitoria. El espectro antibacterial se determinó por medio de la Concentración Mínima Inhibitoria del 20% para el extracto alcohólico de la semilla. Esto se logró con las pruebas en las que el extracto fue empleado a intervalos semanales. **Conclusiones.** De acuerdo con los resultados, es posible afirmar que la parte de la fruta del

* Ingeniera de Alimentos, especialista en Aseguramiento de la Calidad Microbiológica de los Alimentos. Docente Corporación Universitaria Lasallista.

** Ingeniera de Alimentos. Docente Fundación Universitaria Católica del Norte.

*** Ingeniera de Alimentos. Asesora Instituto Tecnológico de Ciencia Alimentaria (INTAL)

algarrobo que presenta mejor actividad antimicrobiana es la semilla con diámetros de halos entre 15 y 25 mm comparados con los de la cáscara y la pulpa que no presentaron halos de inhibición significativos (menores a 15 y cero respectivamente), por lo que se concluye la existencia de sustancias con potencial inhibidor de fuente natural en el algarrobo para la industria de alimentos.

Determination of the preservative properties of carob tree's pulp (*Hymenaea courbaril linneaus*) for food industries

Abstract

Introduction. *Hymenaea courbaril Linneaus* is well known because of its anti-bacterial, antifungal and nutritional properties, give its chemical and dietetic characteristics, being an interesting resource for the study of its fruit as a natural source of preservative properties for food industries. **Objective.** To evaluate the antimicrobial capability of the carob tree's fruit on a microorganism taken as an indicator of food quality (*Escherichia coli*, ATCC 25922). **Materials and methods.** Concentrations were defined in the alcoholic and the aqueous extract of the pulp, the peel and the seeds, in order to inhibit the microorganism's growth. By the use of the well diffusion technique, with some modifications, the *E. coli* strain was subjected to the different extracts. **Results.** In the preliminary tests, the best results were obtained with the seed in the alcoholic extract. Therefore, the pulp, the peel and the aqueous extract of the seed were disregarded, due to their small or null inhibitory action. The anti bacterial spectrum was determined by the use of Minimum Inhibitory Concentration at 20% for the alcoholic extract of the seed. This was achieved with the tests in which the extract was used in intervals of a week. **Conclusions.** According to the results, it is possible to say that the part of the carob tree's fruit that has the highest antimicrobial activity is the seed, with diameters between 15 and 25 mm, compared to those of the peel and the pulp, which did not have significant inhibition values (under 15 and zero, respectively), Therefore, it is concluded that there are substances with a high inhibitory potential

Introducción

Algunos de los componentes de la pulpa de la algarroba (*Hymenaea courbaril Linneaus*) tienen, en la industria farmacéutica, propiedades terapéuticas (antidiarreas y catarral) y en la industria alimentaria, propiedades quimioprolácticas. Estas propiedades están relacionadas con su composición química y bromatológica.

La tendencia al uso de conservantes naturales en la industria alimenticia se ha incrementado en los últimos años como reemplazo de los de origen sintético

cuyo uso por encima de las dosis permitidas puede ocasionar efectos antitiroideos, efectos sobre el comportamiento, sobre la reproducción, efectos mutágenos, productos de carácter cancerígeno, ocasionar desórdenes en el organismo tipo alergias e hiperactividad en los niños¹ y en la actualidad son los de mayor empleo. Por ello, esta investigación representa un paso muy importante para la industria de alimentos, en el sentido en que se podrán ofrecer alternativas saludables de conservación de los alimentos y, como consecuencia inherente, la protección de las personas que consuman los productos que los contengan.

La presente investigación pretendió evaluar la capacidad antimicrobiana de la fruta del algarrobo midiéndola sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, un microorganismo indicador de calidad en alimentos.

Para lo anterior, se ensayaron los extractos acuosos y alcohólicos de la pulpa, cáscara y semilla a diferentes concentraciones sobre el microorganismo, utilizando la técnica modificada de difusión en pozos.

El algarrobo, cuya domesticación comenzó hace unos cuatro milenios, puede servir de ilustración para un relato ejemplar que exponga cómo el hombre, desde los comienzos de la agricultura, a lo largo de los siglos, supo utilizar con discernimiento recursos vivos de la naturaleza.

Debido a las características químicas y bromatológicas halladas en sus diferentes partes y que pueden considerarse como antimicrobianos naturales, la presente investigación pretendió evaluar la capacidad antimicrobiana de la fruta sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, un microorganismo indicador de calidad en alimentos. Para la realización de este trabajo se ensayaron los extractos acuosos y alcohólicos de la pulpa, cáscaras y semillas a diferentes concentraciones sobre el microorganismo, utilizando la técnica modificada de difusión en pozos.

En el presente trabajo, como primera etapa de una serie de investigaciones, se determinó que el fruto del algarrobo contiene propiedades antimicrobianas, cuya caracterización química será objeto de la siguiente etapa de investigación.

Por la revisión bibliográfica, se esperaba obtener excelentes resultados en la pulpa, sin embargo, se obtuvieron mejores inhibiciones en la semilla triturada y molida.

El objetivo de descubrir un conservante natural que pueda reemplazar a los conservantes de origen químico utilizados actualmente en la industria de alimentos, cuyo uso por encima de las dosis permitidas puede ocasionar la aparición de enfermedades como el cáncer, representa un paso muy importante para la industria de alimentos, en el sentido que se podrán ofrecer alternativas saludables de conservación de los alimentos, y como consecuencia inherente, la protección de las personas que consuman los productos que lo contengan.

Marco referencial

Aditivos alimentarios

Los aditivos son sustancias añadidas intencionalmente a los alimentos para mejorar su estabilidad o sus propiedades organolépticas o nutritivas².

Los aditivos más importantes son los edulcorantes, las sales, los acidulantes, los antimicrobianos que suelen llamarse “conservadores”, los antioxidantes, los emulgentes, los colorantes, los nutrientes y los aromas y sabores.

Conservantes

Los conservantes son los aditivos más utilizados y los de uso más justificado porque impiden que los alimentos se deterioren, prolongan su vida útil, mejoran su conservación y preservan sus propiedades iniciales evitando que los microorganismos o los procesos de oxidación los alteren. Los conservantes pueden ser de origen sintético o de origen natural³.

El uso de antimicrobianos está muy restringido por las leyes, solo pueden usarse los de una corta lista (lista positiva) y éstos sólo en casos determinados en las reglamentaciones específicas, y en ningún caso pueden utilizarse para enmascarar malas técnicas sanitarias².

Conservantes sintéticos. Son moléculas que no existen en la naturaleza, sino que han sido diseñadas y sintetizadas por el ser humano³.

Actualmente se conocen varios tipos de conservadores de origen químico, entre los que se encuentran:

- Anhídrido sulfuroso y bisulfitos.
- Ácido benzoico.
- Ácido acético.
- Ácido propiónico.
- Ácido sórbico.
- Esteres del ácido p-hidroxi-benzoico.
- Nitritos y nitratos².

Conservantes naturales. Son sustancias no sintéticas que proceden de extractos vegetales y que poseen compuestos fenólicos u otras sustancias cuya acción tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de ciertos microorganismos patógenos o tienen acción antioxidante sobre los alimentos³.

Por lo anterior, la estabilidad de algunos alimentos frente a la invasión por algunos microorganismos se explica por la presencia en aquéllos de dichos conservantes naturales. Se sabe, por ejemplo, que algunas especias contienen aceites esenciales que poseen actividad antimicrobiana. Entre estos aceites esenciales

están el eugenol en el clavo, la alisina en el ajo, el adehído cinámico y eugenol en la canela, el isotiocianato de alilo en la mostaza, el eugenol y el timol en la salvia, y el carvacrol (isotimol) y el timol en el orégano. Los derivados del ácido hidroxicinámico (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico y ácido clorógeno) que se encuentran en las frutas, en las hortalizas, en el té, en la melaza, y en otras fuentes vegetales, todos ellos presentan actividad antibacteriana y, algunos, actividad antifúngica⁴.

Los extractos de la semilla de toronja y de otros cítricos también se emplean; tienen un espectro amplio de actividad debido a que alteran las membranas celulares⁵.

Conservantes de extracción biotecnológica. Son productos extraídos a partir de bacterias, entre los que se encuentran:

- Nisina.
- Natamycina o piramicina⁶
- Polylysinas
- Lysosymas
- Tetraciclinas⁷.

Además de los agentes antes mencionados, que son los más empleados en la industria alimentaria, existen muchos compuestos que igualmente restringen el crecimiento microbiano mediante diferentes mecanismos. El anhídrido carbónico (CO₂) se ha usado en la conservación de derivados cárnicos, bebidas, leche y otros productos. Algunos países emplean el peróxido de hidrógeno en leche, carne y pescado. Los ácidos orgánicos como el cítrico, el tartárico, el fumárico, entre otros, influyen en el control microbiano. Los ésteres del glicerol, como el monolaurato de glicerilo, actúan en concentraciones elevadas y en productos altos en lípidos. Los ácidos grasos y varios antioxidantes fenólicos han mostrado igualmente tener un efecto inhibitor, así como el eritorbato de sodio⁵.

Descripción del algarrobo

Nombre científico: *Hymenaea courbaril* Linneaus

Familia: *Fabaceae* / *Caesalpinaceae* (Leguminosae)⁸.

Nombre común: algarrobo, copal, guapinol, jatoba

Nombre comercial: Brazilian cherry, jatoba⁹

Botánica. Los algarrobos presentan enormes variaciones de forma biológica y de tipo floral. Los árboles pueden alcanzar los 40 metros de altura, y son interesantes debido a la cantidad y a las propiedades de sus frutos y semillas. Su corteza es pardo rojiza con manchas blancuzcas horizontales amorfas, ramifica a partir de la mitad del fuste y tiene ramas muy retorcidas. Posee hojas bifoliadas, alternas, asimétricas, con puntos translúcidos y una venación poco prominente¹⁰. Sus

flores son blancas o cremas, miden cerca de 3.5 cm de diámetro. Cada flor con cinco sépalos de color verde, cinco pétalos blanco amarillentos con finas rallas purpúreas y 10 estambres con anteras de color rojo, densas y muy aromáticas¹¹. En la Fotografía 1, se puede apreciar un árbol del algarrobo, localizado en el Jardín Botánico de Medellín, “Joaquín Antonio Uribe”.



Fotografía 1. Árbol del Algarrobo, Jardín Botánico “Joaquín Antonio Uribe”, Medellín

Fuente: Fotografía tomada por las autoras.

Los frutos son tipo legumbre con una cáscara o pericarpo que es muy dura y leñosa, mide 0.5 cm de espesor y es de color rojizo a marrón oscuro, y entre la cáscara y las semillas tiene un polvo blanco o mesocarpo, pulpa harinosa, comestible, dulce, agradable de color pardo crema a verdoso, que los indígenas usaron como ingrediente de la mazamorra; estos frutos miden como 13 cm de largo por 6 de ancho y 2.5 cm de grosor, y se les puede ver maduros colgando en el árbol por un período prolongado^{10, 12}. Un solo árbol de *H. courbaril* puede producir 100 vainas en un año, pero no necesariamente cada año¹³.

En las fotografías 2, 3, 4 y 5, tomadas por las autoras, se pueden observar de *Hymenaea courbaril* L, un fruto o vaina, la pulpa, las semillas aún cubiertas de un poco de pulpa y las semillas que han sido lavadas, respectivamente.



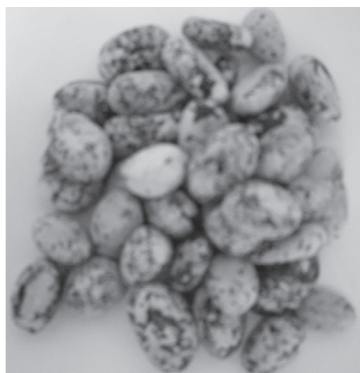
Fotografía 2. Fruto de algarrobo

Fuente: Fotografía tomada por las autoras.



Fotografía 3. Pulpa de algarrobo

Fuente: Fotografía tomada por las autoras.



Fotografía 4. Semillas de algarrobo sin lavar

Fuente: Fotografía tomada por las autoras.



Fotografía 5. Semillas de algarrobo lavadas

Fuente: Fotografía tomada por las autoras.

Sinónimos. El algarrobo, *Hymenaea courbaril* Linneaus, se le conoce también con los siguientes sinónimos:

- *Hymenaea animifera* Stokes
- *Hymenaea candolleana* Kunth
- *Hymenaea multiflora* Klein hoonte
- *Hymenaea resinifera* Salibs
- *Hymenaea retusa* Wild. Ex Hayne
- *Hymenaea stilbocarpa* Hayne
- *Inga megacarpa* M.E. Jones^{14,15,16,17}.

Nombres vulgares. La palabra “algarrobo” deriva del árabe “*al carub*”, que significa el árbol por antonomasia¹⁸ y es el nombre más común con que se conoce en diferentes lugares de América Latina. Sin embargo, dependiendo del país se han encontrado diferentes denominaciones como se mencionan a continuación.

- Algarrobillo, copal, guapinol nazareno y pecueco (Colombia)
- Courbaril, algarrobo (Panamá)
- Cuapinol, guapinol (Costa Rica)
- Hoja de cuchillo, palito colorado, pacay (Guatemala)
- Palca, laka, guapinol (Honduras)
- Nancitón (Guatemala)
- Locust, kawanari (Guyana Francesa)
- Yutahy, jataí, guapinole (México)
- Jatobá, jatahy (Brasil)
- Lokustbaum, johannesbrotbaun (Alemania)
- Pecueca, azúcar huayo o copal (Ecuador)
- Corobore (Venezuela)
- Caguairan (Cuba)
- Abatí, timbary (Paraguay)
- Pampa estoraque (Perú)
- Garrofer, garrofera, garrove (Cataluña)
- Carrubo (Italia)
- Alfarrobeira (Portugal)
- Caroubeir (Francia)
- Copinol (España)
- Kharroub (Arabia)
- Karob tree (Inglés)^{8,19,20}

Existen otros nombres vulgares como Jatobá, stinking toe, algarrobo, azúcar huayo, jataí, copal, brazilian copal, courbaril, cayenne copal, demarara copal, gomme animee, pois confiture, guapinol, guapinole, loksi, South American locust²¹.

Usos del algarrobo. Se menciona entre las especies frutales, aunque no sea su uso más frecuente, con fines de enfatizar el extraordinario valor nutritivo de la pulpa comestible que rodea las semillas. Es uno de los alimentos vegetales más ricos que se conocen por su alta concentración en almidón y proteínas, y constituía una parte importante de la dieta de muchos pueblos indígenas. La pulpa es dulce, se consume cruda, se incorpora como harina en galletas y sopas, o se mezcla con agua para preparar una bebida llamada atole, y a los niños se les da con leche por ser un excelente alimento. También puede constituir un alimento

concentrado de primera calidad para animales. La madera es de excelente calidad, dura y pesada. El tronco produce una resina llamada copal, que tiene usos medicinales y es usada también para hacer barnices e inciensos. La corteza contiene taninos y propiedades medicinales así como las hojas. Su savia, acabada de extraer, tiene color vinoso y se recomienda en casos de debilidad pulmonar, falta de apetito, digestiones difíciles, boca amarga, estado nervioso, bronquitis, asma, cistitis, beriberi, laringitis y blenorragia^{8, 20, 22}. Las semillas medicinalmente se han usado en casos similares a la savia; adicionalmente, se ha usado para tratar bronquitis, catarros, cistitis, diarrea, dispepsia, fracturas, indigestión, laringitis, malaria, reumatismo, úlceras, enfermedades venéreas, dolores de cabeza, artritis, magulladuras, espasmos, como expectorante, licor, purgativo, sedativo, tónico estomacal, vermífugo y antiséptico²³.

Características químicas. El análisis químico de *Hymenaea courbaril* L muestra que es rico en compuestos biológicamente activos, incluyendo diterpenos, sesquiterpenos, flavonoides y oligosacáridos. Los fitoquímicos de *Hymenaea courbaril* L son muy similares a otros árboles de bosque tropical productores de resina como el árbol copaiba. Algunos de esos químicos están en ambas plantas, tales como el ácido copálico, delta-cadineno, cariofilina y alfa-humuleno, que han mostrado una significativa actividad anti-inflamatoria, antibacterial, antifúngica y antitumoral en estudios clínicos. En otras investigaciones otro fitoquímico de *Hymenaea courbaril* L, la astilbina, en un estudio clínico en 1997, mostró propiedades antioxidantes y protectoras del hígado²¹.

Hymenaea courbaril L también contiene terpenos, y químicos fenólicos, los cuales son responsables de proteger el árbol del ataque de hongos en la selva; de hecho, el árbol de jatobá es uno de los pocos árboles en la selva que luce una corteza completamente limpia, sin ninguno de los mohos y hongos encontrados usualmente en muchos otros árboles en ambientes húmedos. Estos terpenos y fenoles antifúngicos han sido documentados en varios estudios y precisamente la actividad antifúngica del jatobá es atribuida a estos químicos²¹.

Los principales químicos encontrados en *Hymenaea courbaril* L incluyen alfa-copaeno, alfa-cubebeno, alfa-himachaleno, alfa-humuleno, alfa-muuroleno, alfa-selineno, astilbina, beta-bisaboleno, beta-bourboneno, beta-copaeno, beta-cubebeno, beta-grjuneno, beta-humuleno, beta-selineno, beta-sitosterol, calareno, ácidos carboxílicos, cariofilina, catequinas, clerodane diterpenos, ácido comúnico, copacamfeno, ácido copalico, cubebeno, ciclosativeno, cipereno, delta-cadineno, gamma-muuroleno, gamma-cadineno, ácido halimadienoico, heptasacáridos, ácido kovalenico, ácido labdadieno, octasacáridos, oligosacáridos, ácido ozico, polisacáridos, selinenos y taxifolina²¹.

Se han reportado flavonoides, terpenoides en diferentes partes de *Hymenaea courbaril*, como astilbina, beta-bourboneno, omega-cadineno, gama-cadineno,

cariofilina, isoenantiometilester del ácido comúnic, copacanfeno, alfa-copaeno, beta-copaeno, alfa-cobebeno, ciclosativeno, *Hymenaea courbaril* diterpeno, beta-gurjeneno, alfa himachaleno, humuleno, alfa y gama muuroleno, ácido 1, 2, 3-naftaleno-5-carboxílico, alfa y beta-selineno, beta-citosterol, un repelente de insectos hedichineno²⁴.

Farmacología y actividad biológica. El extracto etanólico demostró actividad antimicótica contra un patógeno vegetal *Pestalotia tiasubculturalis*, en una concentración de 3.0 mg/mL. La decocción de la corteza seca en dosis de 1g/kg en ratas tiene efecto diurético. El extracto etanólico y la resina han demostrado actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureuginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*²⁴.

Además de las propiedades antimicóticas, se ha documentado también que *Hymenaea courbaril* tiene actividad contra un amplio rango de levaduras incluyendo *Candida*. Otros estudios clínicos que han sido desarrollados desde los 70 han mostrado que tiene propiedades antimicrobianas, molusquicidas (mata y controla caracoles y babosas), y actividades antibacteriales, incluyendo acciones *in vitro* contra organismos tales como *E. coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus*. Además de esto un extracto acuoso de hojas de *Hymenaea courbaril* ha demostrado una significativa actividad hipoglucémica, produciendo una reducción significativa de los niveles de azúcar en la sangre, lo cual valida otros usos tradicionales²¹.

La corteza es astringente; contiene taninos con propiedades medicinales; el fruto es laxante; las semillas, capaces de producir abundante mucílago, por lo que se emplean así mismo como laxantes en preparaciones farmacéuticas industrializadas. Las hojas producen una resina tóxica con efectos repelentes sobre insectos comedores de hojas. Es una planta melífera¹².

La corteza de algarrobo en infusión tiene propiedades antidiarreicas, mientras que las algarrobas enteras en infusión se usan como laxante²⁵. La harina de algarrobo se emplea en el tratamiento sintomático de diarreas del lactante y del niño y para tratar vómitos, digestiones pesadas, intolerancia al gluten y enterocolitis por *Salmonella spp*²⁶.

Los taninos del algarrobo tienen un efecto astringente en el tracto gastrointestinal, lo que los hace útiles para tratar la diarrea. También se unen a las toxinas bacterianas, inactivándolas, e inhiben el crecimiento de las bacterias. Los azúcares forman la goma de algarrobo y se usan como espesantes, para absorber agua, un efecto que también puede ayudar a controlar la diarrea²⁷.

En Rain Tree Nutrition se reportan algunos de los efectos medicinales del algarrobo o Jatobá que se describen a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades herbolarias y medicinales del algarrobo

Acción Principal	Otras acciones	Dosificación estandarizada
Mata mohos y levaduras	Reduce los espasmos	Corteza:
Mata <i>Candida</i>	Descongestiona los bronquios	Decocción: ½ a 1 taza, una a tres veces al día
Incrementa la energía	Seca secreciones	
Mata bacterias	Incrementa la orina	
Estimula la digestión	Protege el hígado	Tintura: 1 a 3 mL dos veces al día
Medianamente laxante	Elimina parásitos intestinales	
Elimina radicales libres		

Fuente: RAIN TREE NUTRITION. Jatobá. [on line] Carson city: Rain Tree, s.f, rev. enero 18 de 2007. [citado el 24 de junio de 2008] URL disponible en: <http://www.rain-tree.com/jatoba.htm>

Métodos de evaluación de la capacidad antimicrobiana de los extractos de plantas

No existe una reglamentación ni estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas, como sí existe para los antibióticos. La mayoría de los métodos están basados en los utilizados para evaluar resistencia y/o susceptibilidad a los antibióticos. Los métodos usados para evaluar la actividad de extractos de plantas sobre bacterias y hongos son similares; se varía la forma de preparación del inóculo, el tipo de medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación²⁸.

Los métodos más comúnmente utilizados en el laboratorio por su sencillez y rapidez son:

- Técnica por difusión en agar con discos impregnados²⁹
- Técnica por difusión en pozos
- Método de dilución en medio líquido o en medio sólido^{28, 30}

Técnica por difusión en agar con discos impregnados. Genera datos cualitativos. Este método consiste en la adición de una cantidad determinada de un antimicrobiano u otra sustancia en un sustrato, (usualmente discos de papel) en la superficie del agar sobre el cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en estudio; cuando se coloca el disco impregnado en el agar, la sustancia capta humedad y se difunde radialmente hacia afuera del agar, formándose así un gradiente de concentración del producto alrededor del disco y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. La sustancia está presente a una concentración alta cerca del disco y afecta a microorganismos mínimamente sensibles; los micro-

organismos resistentes crecen hasta el disco. A medida que aumenta la distancia desde el disco, disminuye la concentración de la sustancia y solo los patógenos más sensibles resultan dañados. Si el agente inhibe el crecimiento bacteriano en torno al disco, se forma un anillo claro; cuanto más ancha es la zona que rodea el disco, más sensible es el patógeno. El diámetro del anillo es también función de la concentración inicial del antimicrobiano, de su solubilidad y de su tasa de difusión a través del agar^{28, 29} y dependerá de la sensibilidad del microorganismo, la carga del disco, el espesor de la capa de agar, el pH, y la composición del medio del cultivo, la capacidad de difusión del producto en el medio, la temperatura de incubación, la velocidad de duplicación bacteriana, el tamaño del inóculo y la fase de crecimiento del microorganismo en estudio²⁸.

En la actualidad, la prueba de difusión en agar más empleada es el *método de Kirby- Bauer*, desarrollada en 1960. Con un asa o aguja de inoculación, se tocan de cuatro a cinco colonias del patógeno a analizar que crece en agar y se inoculan en un caldo de cultivo; este se incuba durante unas pocas horas a 35° C hasta que se enturbia ligeramente, y se diluye hasta lograr una turbidez igual a un estándar. Se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión y se inocula con este en forma homogénea toda la superficie de un agar. Una vez que se ha secado la superficie de éste, aproximadamente unos cinco minutos, se colocan sobre ella los discos con el antimicrobiano en estudio con pinzas estériles o un aplicador. La placa se incuba a 35° C por 16 a 18 horas; transcurrido este tiempo se miden los diámetros de inhibición en milímetros²⁹.

Para la evaluación de los extractos de plantas se pueden emplear diversos medios de cultivo, como los agares Müeller Hinton, Triptona soja, Nutritivo e Infusión Cerebro Corazón²⁸.

Método de dilución en agar o en medio sólido. En este método se incorpora el producto a evaluar en un medio de cultivo. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está líquido. Se inocula una suspensión estandarizada de bacterias en una serie de placas de agar, cada una de las cuales contiene una concentración diferente del antimicrobiano³¹. Se incuba a 37° C durante 24 horas. La menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos es la CMI, que se observará en cada placa³⁰.

Métodos en medio de cultivo líquido. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes de la sustancia antimicrobiana que se encuentra diluida en el medio de cultivo líquido o caldo²⁸. El crecimiento de los microorganismos se observa mediante la aparición de turbidez en el medio o mediante su cambio de color debido al viraje del indicador de pH previamente añadido al medio³⁰.

Para esta prueba se requiere una serie de diluciones por cada antimicrobiano en estudio³⁰.

Método de difusión en pozos. Este método fue planteado en 1971 por los investigadores Tagg y McGiven para determinar la capacidad antimicrobiana de las bacteriocinas que liberan algunas bacterias ácido-lácticas con poder inhibitorio sobre otras bacterias³².

El método consiste en realizar una serie de pozos o hendiduras en un agar nutritivo de cinco milímetros de espesor contenido en una caja de petri empleando un sacabocado estéril de 4 mm de diámetro. El número de pozos depende del halo de inhibición esperado. La base de cada pozo se sella con 0.05 mL de agar nutritivo derretido, y luego se añaden a cada pozo cantidades estandarizadas (1, 2 ó 3 gotas) de la preparación de bacteriocinas³².

El medio inoculado se incuba a 37° C por una o dos horas para permitir la difusión de la bacteriocina en el medio. El agar entonces se afloja del borde de la caja de petri con una espátula estéril; el medio es invertido de modo que baje a la tapa, exponiendo el fondo del agar. Se aconseja el uso de las cajas de petri de vidrio en lugar de las de plástico para facilitar el retiro del gel. Se incuba nuevamente a la misma temperatura y tiempo para permitir el secado de la superficie expuesta, tiempo después del cual, esta superficie es inoculada con un cultivo líquido del microorganismo indicador en fase logarítmica de crecimiento. Las cajas son drenadas, secadas e incubadas con la base hacia arriba hasta que aparezca la zona de inhibición. La ventaja de este método es que permite que la bacteriocina se difunda en el medio antes de que el microorganismo indicador sea inoculado³².

Métodos modificados de difusión en pozos. Existen variantes o modificaciones a este método como los empleados por Paik y colaboradores en 1997 y Federico Sinche y colaboradores en 2005, en el cual el microorganismo indicador es adicionado al agar previamente derretido y mantenido a 45° C y luego es depositado en las cajas de petri estériles a las cuales se les hace cuatro agujeros o pozos de 6 u 8 mm de diámetro empleando una pipeta pasteur estéril. En los pozos se deposita la sustancia que se presume tiene actividad inhibitoria sobre el microorganismo indicador^{33, 34}.

Existe otra modificación al método utilizada por los investigadores Montville y Chen en 1999 y retomada por las investigadoras Gutiérrez y Acosta en 2008 en la cual se vierte agar en una caja de petri, al que se le realizan 4 pozos en la superficie solidificada (sin perforar completamente el agar). A los pozos se les adiciona la sustancia inhibidora a ensayar. El microorganismo de prueba se mezcla con agar semisólido derretido y se vierte sobre el agar formándose una doble capa. Se incuba a la temperatura y tiempo requeridos por el microorganismo de prueba^{35, 36}.

Concentración mínima inhibitoria. Los resultados de las pruebas se expresan como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que representa la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo^{29, 30}.

Escala de McFarland. Consiste en una serie de patrones de turbidez previamente calibrados, en donde se utilizan varios tubos de vidrio cerrados y enumerados de 0.5 a 10 (los cuales deben ser nuevos, con tapa rosca y de igual tamaño y diámetro; limpios y enjuagados de manera cuidadosa) de acuerdo con la concentración de microorganismos que se requiera y utilizándolos como patrón de referencia por medio de comparación visual aproximada o por espectrofotometría haciendo coincidir la absorbancia, (a 625 nm debe ser de 0.08 a 0.10 para el estándar de 0.5)^{30, 31, 37}.

Los estándares se preparan agregando los reactivos cloruro de bario (BaCl_2) 0.048 M (1.175% p/v) a ácido sulfúrico (H_2SO_4) químicamente puro 0.36 M (solución acuosa al 1% v/v) formándose en cada tubo un precipitado blanco de sulfato de bario (SO_4Ba), responsable de la turbidez^{30, 31, 37}. Los tubos se preparan adicionando las cantidades de reactivos indicados en la tabla 2.

Tabla 2. Estándares de McFarland

Patrón de turbidez N°	BaCl_2 al 1% (ml)	H_2SO_4 al 1%(ml)	Densidad aproximada de células (millones/ ml)
0.5	0.05	9.95	150
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

Fuente: MACFADDIN, Jean F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ª ed. Buenos Aires: Panamericana, 2004. 850 p.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE. Guías de prácticas de Microbiología. Práctica 11: Antibiograma por difusión en Agar. Departamento de Microbiología. España: Universidad Complutense, 2005. p. 18.

Estandarización del inóculo para métodos de evaluación de la capacidad antimicrobiana. El inóculo se estandariza utilizando una escala turbidimétrica como el patrón de McFarland. Se parte de un cultivo en caldo que ha sido incubado de cuatro a seis horas, cuando se considera que el crecimiento se encuentra en fase logarítmica. Se deben tomar muestras de varias colonias de aspecto similar para disminuir la variación en la población bacteriana. La densidad de la suspensión se ajusta hasta aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro, comparando la turbidez con el estándar de McFarland de 0.5 y proceder a su inoculación en la prueba elegida^{31, 38}.

El inóculo también puede prepararse por el método de suspensión directa de colonias, el cual consiste en tomar colonias jóvenes de la superficie de una placa de agar que ha sido incubada durante toda la noche y diluida hasta la densidad adecuada³¹.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Ciencias Biológicas (Microbiología y Biotecnología) de la Corporación Universitaria Lasallista de Caldas, Antioquia.

El microorganismo elegido fue *Escherichia coli* ATCC 25922 liofilizada. La cepa se rehidrató con la solución procedente de fábrica, se sembró luego en agar sangre y se incubó a 37°C durante 24 horas, pasadas.

La cepa indicadora utilizada para los ensayos se almacenó en crioviales a -20°C para mantenerla en óptimas condiciones de viabilidad antes de los ensayos respectivos.

Se emplearon como medios de cultivo agar nutritivo y caldo cerebro corazón de Merck y agar sangre preparado por MDM Científica.

Cada vez que se realizó un ensayo se tomó una perla criovial, se sembró en caldo cerebro corazón y se incubó a 37°C durante 24 horas. Se empleó el método de suspensión directa de colonias tomando una asada del cultivo en caldo cerebro corazón e inoculando un agar sangre que se incubó en las mismas condiciones. Pasado el tiempo de incubación se tomaron algunas colonias para diluirlas en agua peptonada al 0.1% hasta llevar a una concentración de 10^8 células, de acuerdo con el estándar de McFarland de 0.5. Se empleó este método, debido a que la coloración amarilla del caldo cerebro corazón de la primera incubación no permitía la comparación por turbidez. Luego este patrón se diluía hasta una concentración de 10^6 células.

Se realizaron los respectivos análisis microbiológicos al fruto del algarrobo con el fin de garantizar que las posibles propiedades antimicrobianas de este se deban a su composición química y no a la presencia de microorganismos que puedan aportar sustancias bioconservantes.

La pulpa fue mezclada con el respectivo solvente en un homogeneizador marca AES, modelo MIX2 de los laboratorios de Ciencias Biológicas de la Corporación Universitaria Lasallista para lograr una mejor calidad de la muestra.

Las semillas y las cáscaras se desinfectaron previamente con amonio cuaternario y luego se secaron a 60 °C en una estufa por 24 horas. Pasado este tiempo fueron molidas y trituradas en un molino de martillos en el laboratorio de operaciones unitarias de la Facultad de Ingeniería de La Universidad Pontificia Bolivariana y luego mezcladas en el homogeneizador AES MIX2 con cada extracto a trabajar y en las concentraciones determinadas. Luego de preparados los extractos se dejaban en agitación en el SHAKER por 24 horas, pasadas las cuales se guardaban en refrigeración a 7 °C para realizar los diferentes ensayos.

Los extractos fueron preparados con agua y con etanol al 90% y en concentraciones de 10 a 90%. Los extractos desde 50% en adelante no se dejaron trabajar por exceso de sustancia y apelmazamiento de la muestra, dejando solo los extractos bajos para los ensayos.

Por los resultados preliminares, se escogió el extracto alcohólico de las semillas para realizar los ensayos definitivos.

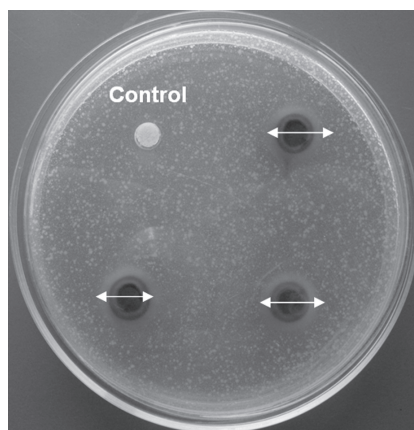
Determinación de la capacidad antimicrobiana. Por las consultas bibliográficas, la entrevista con la MSc Luz Adriana Gutiérrez Ramírez y la experiencia de las investigadoras, se definió realizar siete modificaciones a los métodos de difusión en pozo y discos impregnados con las pruebas preliminares para buscar el mejor comportamiento en cuanto a la difusión del extracto.

En todos los ensayos preliminares, se realizaron cuatro pozos en el agar de los cuales dos eran pozos para control, uno con agua destilada estéril y otro con alcohol al 90% (solventes empleados en la preparación de los extractos).

La interpretación de los resultados se realizó a las 24 horas de incubación. El diámetro del halo de inhibición se midió con una regla graduada considerando la zona que está libre de crecimiento, tal como se aprecia en la Fotografía 6, donde las líneas indican el diámetro del halo de inhibición. En caso de bacteriostáticos es aceptable un ligero velo dentro del halo. La presencia de colonias en el interior del halo indica contaminación, cultivo mixto o aparición de resistencia. Se considera que hay sensibilidad a una sustancia en el caso de Enterobacterias como la *Escherichia coli* si se presentan halos entre 15 y 25 mm³⁸.

En la prueba de pozos sencilla, no se obtuvieron buenos resultados de difusión de los extractos, razón por la cual se decidió ensayar algunas modificaciones, para mejorar dicha difusión como se explica a continuación:

Difusión en pozos con doble capa. En la primera capa se realizaron los pozos a los cuales se les adicionó el extracto en estudio y en la doble capa se adicionó el microorganismo de prueba.



Fotografía 6. Prueba de determinación de capacidad antimicrobiana

Fuente: Fotografía tomada por las autoras.

Discos impregnados con doble capa. En la primera capa, sin realizar pozos se depositaron discos de papel de filtro impregnados con el extracto y en la doble capa se adicionó el microorganismo.

Microorganismo en pozo y doble capa con el extracto. En la primera capa se realizaron los pozos y a ellos se les adicionó el microorganismo de prueba; en la doble capa se adicionó un mililitro del extracto en prueba.

Discos impregnados con doble capa modificado 1. En la primera capa sólida se adicionó 0.1 ml de microorganismo de prueba y se esparció con una espátula driglasky y luego se hicieron los pozos en donde se adicionó el extracto a ensayar impregnado en un disco de papel filtro; la segunda capa se adicionó sola.

Discos impregnados con doble capa modificado 2. A la primera capa, aún líquida, se le adicionó 1 ml del microorganismo indicador. Una vez se solidificó se adicionó el extracto investigado impregnado en un disco de papel filtro. De la misma manera que el anterior, la segunda capa se empleó sola.

Difusión en pozo del extracto sin doble capa. A la primera capa, aún líquida, se le adicionó 1 ml del microorganismo indicador. Una vez solidificada, se realizaron los pozos a los cuales se les adicionó el extracto. No se utilizó doble capa de agar.

Discos impregnados en difusión de pozos. Se trabajó igual al anterior, adicionándole a los pozos discos de papel de filtro y luego sobre el pozo se adicionó el extracto con una micropipeta. Con esta modificación se trabajaron los ensayos posteriores correspondientes al diseño experimental.

Los ensayos finales que se utilizaron en el diseño de experimentos, se realizaron con semilla molida, en concentraciones de 10 a 45%, debido a que en las

concentraciones mayores hubo absorción completa del solvente. El extracto empleado fue el alcohólico pues con el agua los resultados no fueron consistentes.

La prueba finalmente elegida fue la de difusión en pozos sencilla modificada por los discos impregnados, trabajando con el factor de McFarland 0.5, haciendo siembra en profundidad con 1 mL de *E. coli* ATTC 25922 en 20 ml de agar cuenta gérmenes. Se hicieron 4 pozos, se colocó un disco de papel en cada uno y se añadió a tres de ellos 30µl de la solución a estudiar en la concentración indicada y en el otro el solvente empleado para elaborar el extracto como control.

Diseño de experimentos

Definición de las variables independientes

- Concentración del extracto de las semillas
- Tipo de solvente: etanol o agua
- Tiempo que dura el extracto con actividad inhibitoria

Variables fijas

- Tipo de microorganismo: *Escherichia coli* ATCC 25922
- Concentración de microorganismos: Un millón
- Temperatura de operación (Incubación): 37 °C

Variable de respuesta

Diámetro del halo de Inhibición. Puesto que no existe una reglamentación ni estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas, como sí existe para los antibióticos, los halos de inhibición de referencia para determinar la capacidad inhibitoria de la algarroba fueron también los que se emplean en pruebas para antibiogramas. Se considera que hay sensibilidad a una sustancia en el caso de Enterobacterias como la *Escherichia coli* si se presentan halos entre 15 y 25 mm^{38, 39}.

Rangos de operación

Se trabajó con un diseño de experimentos factorial en donde las variables fijas son los solventes, y las variables independientes son el diámetro del halo de inhibición y la concentración del extracto.

Concentración del extracto. 10% a 90%, con avances de 5% en 5%

Tipo de solvente. Etanol y agua.

Este es un experimento de 2², donde la base son las variables fijas que son los tipos de solventes, alcohol y agua; el exponente son la variables independientes que son el diámetro del halo de inhibición y concentración del extracto.

Tiempo de acción inhibitoria. Los ensayos en este paso se realizaron con el solvente escogido según los rangos de operación establecidos y se consignaron en la tabla correspondiente.

Resultados

Análisis microbiológico a la materia prima

Los resultados de los análisis microbiológicos realizados a la materia prima se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Resultado de análisis microbiológicos a materia prima

Parámetro	Polvo	Cáscaras	Semillas
Mésofilos UFC/ gr	<10	<10	<10
Coliformes fecales NMP/gr	<3	<3	<3
Coliformes totales NMP/gr	<3	<3	<3
Mohos y levaduras UFC	<10	<10	<10

Fuente: Elaborada por las autoras.

Definición de los extractos

Los primeros ensayos fueron realizados con los extractos de la pulpa de la fruta del algarrobo, tanto en fase acuosa como alcohólica, sin obtenerse ningún halo de inhibición, por lo que se desecharon los consecutivos análisis con esta parte de la fruta. Para los ensayos siguientes y bajo los mismos parámetros, se trabajó con los extractos acuosos y alcohólico tanto de las cáscaras como de las semillas.

Los resultados con las cáscaras fueron también desechados debido a que no se obtuvieron halos de inhibición significativos (entre 15 y 25 mm) o los resultados fueron inconsistentes.

Finalmente, se realizó el diseño de experimentos con el extracto alcohólico y acuoso de las semillas; sin embargo, con el primer ensayo se pudo descartar el extracto acuoso para las siguientes pruebas debido a que no se obtuvieron halos de inhibición.

Estandarización de la prueba de determinación de la capacidad antimicrobiana

Con los ensayos preliminares se pudo determinar que el método en el cual presentaba mejor difusión el extracto fue en el que se combinó la difusión en pozos con discos impregnados sin utilizar doble capa.

Determinación de la capacidad antimicrobiana

De acuerdo con el diseño de experimentos realizado, se obtuvieron los resultados que pueden observarse en las tablas 4 y 5. En la tabla 4 se observan los datos obtenidos para diferentes concentraciones y extractos de la semilla; en las concentraciones de 25–50% en el extracto acuoso no se pudieron realizar los ensayos debido a que el agua absorbió toda la semilla y no queda fase acuosa para la prueba. Los datos de la tabla 4 fueron graficados mediante el programa MATLAB 7.0, tal como se aprecian en las gráficas 1 y 2.

Tabla 4. Resultados según el solvente utilizado

Concentración del Extracto (%)	Diámetro del halo de inhibición (mm)					
	Extracto en Agua			Extracto en Etanol		
Control	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	15	15	17
15	0	0	0	17	20	14
20	0	0	0	16	15	14
25				14	17	15
30				20	23	17
35				11	13	17
40				21	15	19
45				21	22	20
50				24	20	25

Fuente: Elaborada por las autoras.

El control utilizado fue agua para los extractos acuosos y etanol para los extractos alcohólicos.

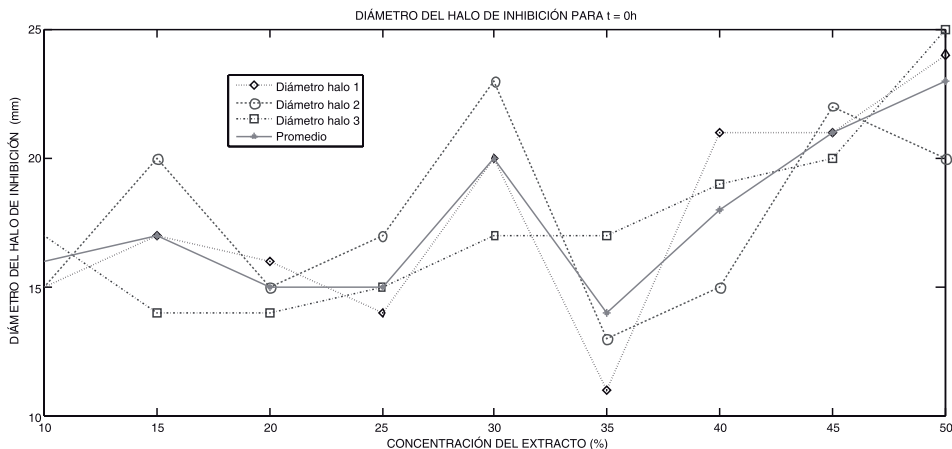
Tabla 5. Diámetro del halo de inhibición para Tiempo = t horas

Extracto (%)	Diámetro Halo Inhibición																								
	Tiempo = 0 horas	Tiempo = 168 horas	Tiempo = 360 horas	Tiempo = 528 horas	Tiempo = 696 horas	Tiempo = 864 horas	Tiempo = 1032 horas	Tiempo = 1032 horas	Tiempo = 1032 horas	Tiempo = 1032 horas															
Blanco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
10	15	15	17	12	16	19	11	13	12	14	14	13	10	10	10	10	10	10	10	10	13	12	14	15	13
15	17	20	14	17	20	12	*	*	*	12	13	13	12	10	10	11	13	12	12	12	17	14			
20	16	15	14	15	21	20	14	13	14	15	14	14	11	10	12	10	12	10	12	12	12	12	12	12	13
25	14	17	15	19	20	18	13	16	14	15	16	16	13	15	12	13	15	13	15	13	12	12	12	12	13
30	20	23	17	21	20	23	15	15	16	15	16	15	13	15	14	13	16	14	15	17	16				
35	11	13	17	13	23	20	16	15	16	15	15	17	17	15	14	14	15	15	16	17	15	15	16	17	15
40	21	15	19	20	19	17	20	26	21	16	17	16	18	15	17	17	16	19	14	12	12				
45	21	22	20	22	17	25	14	18	20	18	17	17	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

* La bacteria creció alrededor del pozo y en el resto del agar no se presentó crecimiento.

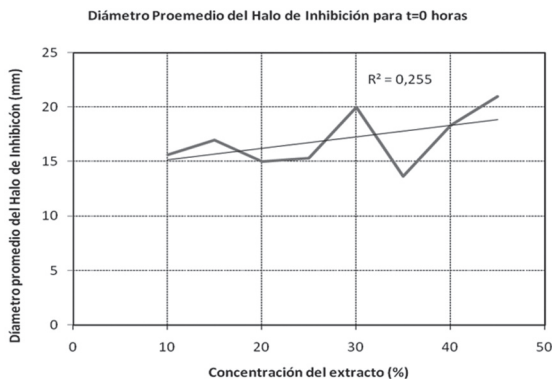
** No se hizo porque se absorbió toda la fase líquida.

Fuente: Elaborada por las autoras.



Gráfica 1 Diámetros de halos de inhibición obtenidos en t=0 horas

Fuente: Elaborada por las autoras.



Gráfica 2. Coeficiente de determinación (R²) para t = 0

Fuente: Elaborada por las autoras.

Determinación de la capacidad inhibitoria de los extractos a través del tiempo

La prueba que se realizó tuvo como variable el tiempo con la finalidad de determinar si los extractos conservaban sus actividades antimicrobianas después de pasar algunos días de su preparación, tiempos que se tomaron desde cero horas hasta 1032. Se presenta el coeficiente de determinación como la prueba de causa efecto entre las variables diámetro del halo y tiempo en horas.

El diámetro del halo de inhibición tiende a disminuir a los pocos días de preparación del extracto, pero vuelve a aumentar después de varios días. Esto puede deberse a que el solvente continúa con su acción extractora a través del tiempo, siendo mejor su resultado a mayor número de horas, en este caso, después de las 1032 horas.

Determinación de la propiedad inhibitoria en concentraciones menores al 10%

Para determinar si había una concentración mínima inhibitoria menor al 10%, se realizó un ensayo adicional con concentraciones entre 1 al 9%. Los resultados de dicho ensayo se pueden apreciar en la tabla 6.

Tabla 6. Diámetro del halo de inhibición para tiempo = 0 horas, de los extractos entre el 1 y el 9 %

Concentración del Extracto (%)	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	Extracto en Etanol		
Blanco	0	0	0
1	9	10	8
2	9	10	9
3	11	12	13
4	12	13	10
5	14	12	13
6	13	12	12
7	15	15	12
8	16	15	13
9	14	14	18

Fuente: Elaborada por las autoras.

Conclusiones

La pulpa no posee actividad inhibitoria, la cáscara presenta una discreta actividad inhibitoria en el extracto alcohólico y el extracto de semillas de algarrobo tiene un alto poder inhibitorio.

Es posible que exista una CMI menor al 20% debido a que el principio activo que da la característica inhibitoria no ha sido identificado ni purificado.

Se presume que las sustancias químicas con poder antimicrobiano presentes en las semillas del algarrobo no son hidrosolubles ya que sólo se lograron resultados positivos en los extractos alcohólicos.

Estadísticamente se concluye que los promedios de las réplicas no son representativos debido a una desviación estándar alta, la cual es posible resultado de una distribución aleatoria de la sustancia inhibitoria en el extracto, motivo por el cual se presentan halos de inhibición diferentes entre las repeticiones a iguales condiciones.

Los resultados del coeficiente de determinación (R^2) indican que hay una relación causa-efecto entre la concentración del extracto investigado y el poder inhibitorio.

En este caso en particular, el método de difusión en pozos modificado no permitió una réplica uniforme por lo cual se obtiene una desviación estándar alta. Sin embargo, por los resultados positivos de los halos y su tamaño mayor a 15 mm, la tesis queda demostrada: la fruta del algarrobo tiene propiedades conservantes.

Puesto que no existe una reglamentación ni estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas, como sí existe para los antibióticos, los ensayos preliminares se realizaron basados en estas pruebas con varias modificaciones, y se llegó a la conclusión de que la mejor modificación para el extracto del algarrobo es la combinación de difusión en pozos con discos impregnados.

Los halos de inhibición de referencia para determinar la capacidad inhibitoria de la algarroba fueron también los que se emplean en pruebas para antibiogramas.

Bibliografía

1. VALLEJO, María del Carmen. Toxicología y seguridad de los alimentos. Fondo Nacional Universitario, Bogotá: 1993. 227 p.
2. PRIMO YÚFERA, Eduardo. Química de los Alimentos. Síntesis: Madrid, 2000. 461 p.
3. PELAYO, Maite. Conservantes naturales. [En línea] España: CONSUMER EROSKI, 18 de enero de 2008 [citado en 14 de enero de 2009] Disponible en internet: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2008/01/18/173886.php>
4. JAY, James. Microbiología moderna de los alimentos. 4ª ed. Zaragoza: Acribia, 2002. 615 p.
5. BADUI DERGAL, Salvador. Química de los Alimentos. Pearson: México, 2006. 716 p.
6. PIRAMICINA. Catalogo de ventas. [En línea] Barcelona España: VGP Pharmachem, 2007 [Citado en 15 de enero de 2009] Disponible en internet: <http://www.pimaricina.com>
7. ECOBIO BIOTECH. Green Science for human Health. Catálogo de ventas. [En línea] China: TianJin Ecobio Biotech co., Ltda. 2007 [Citado en 15 de enero de 2009] Disponible en internet: <http://www.ecobio.com.cn/en/products/polylysine.htm>
8. RAMOS P., Yan Arley et al. El Algarrobo (*Hymenaea courbaril* L.) y el castaño (Compsonneura atopa (A.C. Sm.): dos especies alimenticias del Departamento del

- Chocó en peligro de extinción. En: Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó. N° 15, (2002); p. 72-77.
9. RODRÍGUEZ SÁNCHEZ, Lucía. *Hymenaea courbaril* L. [on line] Costa Rica: Finca Leola S.A., copyright 2003-2006. [citado el 30 de julio de 2008] URL Disponible en: http://www.fincaleola.com/guapinol_espa.html
 10. CATARINO, Fernando. El algarrobo: Una planta ejemplar. En: Naturota. Council of Europe. N° 73, (1993), p. 14-15.
 11. BARÓN P., Teresita y MORALES S., León. Árboles del valle de Aburrá. Medellín: Área Metropolitana, 2005. p. 63.
 12. Azúcar Huayo. [on line] Perú: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, s.f. [citado el 13 de junio de 2008] URL disponible en: www.unapiquitos.edu.pe/.../docentes/archivos/AZUCAR%20HUAYO.doc?PHPPHPSES=002265285e96190d918f597b9d470091
 13. VOZZO, J.A. *Hymenaea courbaril* L. [on line] USA: USDA Forest Service, s.f. [citado el 30 de julio de 2008] URL Disponible en: <http://www.rngr.net/Publications/ttsm/Folder.2003-07-11.4726/PDF.2004-03-03.4932/file>
 14. Documento N° 6871. [on line] Colombia: Ministerio de protección Social, s.f. [citado el 31 de julio de 2008] URL Disponible en: <http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/library/documents/DocNewsNo17421DocumentNo6871.PDF>
 15. *Hymenaea courbaril*. . [On line] sine loco: Species Plantarum 2., s.f. [citado el 3 de julio de 2008] URL disponible en: www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/20-legum21m.pdf –
 16. *Hymenaea courbaril* L. [on line] Colombia: CENICAFE, s.f. [citado el 31 de julio de 2008] URL Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=FLORA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mnfn=000633>
 17. *Hymenaea courbaril*. [On line] sine loco: herbaria.plants.ox.ac.uk, s.f. [citado el 3 de julio de 2008] URL disponible en: http://herbaria.plants.ox.ac.uk/ad314s/downloads/capitulos_especies_y_anexos/hymenaea_courbaril.pdf
 18. GALERA, F.M. Las especies del género *Prosopis* (algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico.[on line] Argentina: FAO, 2000. [citado el 30 de julio de 2008] URL disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/ad314s/ad314s00.HTM>
 19. TOUS MARTI, Joan y BATLLE CARAVACA, Ignacio. El algarrobo. Madrid: Mundiprensa; 1990. p. 13.
 20. BARRERO BARRERO, Delfín et al. Vegetación del Territorio CAR: 450 Especies de sus Llanuras y Montañas. Bogotá: Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca CAR, 2004. p. 32-33.
 21. RAIN TREE NUTRITION. Jatobá. [on line] Carson city: Rain Tree, s.f, rev. enero 18 de 2007. [citado el 24 de junio de 2008] URL disponible en: <http://www.rain-tree.com/jatoba.htm>

22. ACERO DUARTE, Luis Enrique. Plantas útiles de la cuenca del Orinoco. Bogotá: Ecopetrol y Corporinoquia, 2005. p. 206.
23. ZAMORA, Nelson. *Hymenea courbaril*. [on line] Costa Rica: Instituto nacional de la biodiversidad, 2004. [citado el 15 de junio de 2008] URL disponible en : <http://darnis.inbio.ac.cr/FMPPro?-DB=UBIpub.fp3&-lay=WebAll&-Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=1444&-Find>
24. MAHABIR P, Gupta. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED, 1995. p. 359-361.
25. FONT QUER, Pío. Plantas Medicinales: Dioscórides renovado. 4ª ed. Barcelona: Península, 2002. p. 350-35.
26. Algarroba. [On line] sine loco: La Herbloguistería, s.f. [citado el 8 de mayo de 2008] URL disponible en: <http://laherboguisteria.blogspot.com/feeds/posts/default>
27. Algarrobo (Carob). [en línea] Sine loco: Healthnotes, Copyright © 2004 [citado en 3 de julio de 2008] Disponible en internet: http://www.puritan.com/vf/healthnotes/HN_Live/Spanish/Es-Herb/Carob.htm
28. SHIVA RAMAYONI, Carlos Martín. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. [en línea] Departamento de Sanidad y anatomía animal, Facultad de Veterinaria, Barcelona, Universidad de Barcelona, 11 de julio de 2007. [citado en 16 de enero de 2009] Disponible en internet: http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/29598985.html
29. PRESCOTT, Lansing M. et al. Microbiología. 5ª ed. Madrid : Mc Graw Hill; 2004. 1240 p.
30. GRANADOS PEREZ, Raquel y VILLAVERDE PERIS, María Carmen. Microbiología. Tomo 2. Madrid: Paraninfo/Thomson Learning; 2002. 365 p
31. KONEMAN, Elmer W., et al. Koneman: Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas en Color. 6ª ed. Argentina: Panamericana, 2008. 1475 p.
32. TAGG, J.R and McGIVEN, A. R. Assay System for Bacteriocins. [en línea] Revista Applied microbiology. Estados Unidos. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 15 de marzo de 1971 [citado en 22 enero de 2009] V.21 N.5, p.943. Disponible en internet: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=377313&blob type=pdf>.
33. SINCHE, Federico. Estudio morfológico y funcional de las células circulantes de la concha prieta *Anadara similis*. [CD-ROM]. Revista Tecnológica ESPOL. Octubre de 2005, Vol. 18, N. 1, s.l., s.n. p.119-125, ISSN : 0257-1749.
34. PAIK, H.D. et al. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis subsp tochigiensis*. [CD-ROM] Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Society for Industrial Microbiology miércoles, 01 de octubre de 1997, Volume 19, Number 4, s.l., Springer Berlin / Heidelberg, p. 294-298.
35. MONTVILLE, T. J. and CHEN, Y. Mechanistic. Action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions En: Applied Microbiology and Biotechnology. Noviembre de 1999, vol. 50, no. 5., p.511-519.

36. GUTIÉRREZ RAMÍREZ, Luz Adriana y ACOSTA OTÁLVARO, Elly Vanesa. Determinación del potencial bactericida In vitro de un aislado nativo de *Lactobacillus casei* frente *E. coli*. En: REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN. Septiembre de 2008, vol. 5 no. 2, p. 68-73.
37. MACFADDIN, Jean F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ª ed. Buenos Aires: Panamericana, 2004. 850 p.
38. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE. Guías de prácticas de Microbiología. Práctica 11: Antibiograma por difusión en Agar. Departamento de Microbiología. España: Universidad Complutense, 2005. p. 18.
39. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE. Guías de prácticas de Microbiología clínica. Práctica 6: Antibiograma por difusión en Agar. Departamento de Microbiología. España: Universidad Complutense, 2006-2007. p. 27 y 28

