

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE
LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD
MEDIANTE SISTEMAS MODELO AMINOÁCIDO-AZÚCAR



MAYRA ALEJANDRA RODRÍGUEZ SERRATO

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Mayra Alejandra Rodríguez Serrato**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.

Dr. Roberto Rodríguez Ramírez
Director de Tesis

Dra. Angélica Ávila Villa
Secretario y Asesor Académico

Dr. Joel Arias Martínez
Vocal

Dra. Norma Patricia Silva Beltrán
Suplente

DEDICATORIA

A mi madre.

Este trabajo que hoy presento como culminación de mis estudios, no sería posible si tú no hubieras estado a mi lado, apoyándome, ayudándome, dándome fuerzas para seguir adelante, siempre con el amor incondicional de Madre. Muchas gracias por todo lo que me has dado en estos 23 años de vida. Te amo con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecer a mi Madre que estuvo conmigo desde el inicio de mi carrera hasta el final de ella, apoyándome incondicionalmente.

A mi familia que fue y es parte fundamental de este proyecto de vida, el poder terminar mi licenciatura.

A la Universidad de Sonora por permitirme estudiar la carrera de Químico Biólogo Clínico.

A mis maestros de la Universidad que dejaron un legado imborrable en mí, en especial al Dr. David, Dr. Oscar, Q. Armando Lizárraga y Q. Sandra, pilares fundamentales de mi carrera.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Roberto Rodríguez por permitir que realizara mi proyecto de tesis con él, así como la paciencia, la atención y la accesibilidad que siempre mostro hacia a mí. Muchas gracias.

A mis sinodales el Dr. Joel Arias, la Dra. Angélica Ávila y la Dra. Norma Patricia por su gran apoyo en la realización de mi proyecto de tesis.

Al Laboratorio de Biotecnología y Trazabilidad Molecular de los Alimentos de ITSON, en especial a la maestra Lorenia Reyes por otorgarme acceso a sus instalaciones para poder realizar mi trabajo experimental.

Y por último pero no menos importante, agradecer el apoyo que siempre me brindaron mis amigos que ya son parte de mi familia y que me han acompañado a lo largo de estos 9 semestres, Clarissa Núñez, Alejandra Martínez y Gerardo García.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
OBJETIVOS.....	ix
Objetivo General.....	ix
Objetivos Específicos.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Generalidades de la Reacción de Maillard.....	3
Mecanismo de Reacción.....	6
Alimentos Funcionales.....	9
Prebióticos.....	9
Probióticos.....	10
Generalidades de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
Cápsula y Capa de Polisacárido Extracelular.....	12
Peptidoglucano.....	13
Ácidos Teicoicos.....	13
Proteína A.....	13
Membrana Citoplasmática.....	14
Patogenia.....	14
Factores de Patogenicidad.....	14
Tratamiento.....	16
SARM.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Método de Difusión en Agar.....	18
Preparación del Sistema Modelo Glucosa-Lisina.....	18
Preparación de Estándar de McFarland.....	18
Preparación del Inoculo Bacteriano.....	18
Procedimiento para la Realización de la Prueba de Difusión en Agar.....	19
Aplicación de los Discos en las Placas Inoculadas.....	19
Lectura de las Placas e Interpretación de Resultados.....	19
Método de Microdilución en Placa.....	21
Preparación del Sistema Modelo Glucosa-Lisina.....	21

Preparación del Inoculo Bacteriano.....	21
Procedimiento para la Prueba de Microdilución en Placa.....	21
Primera lectura.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
Método de Difusión en Agar.....	24
Método de Microdilución en Placa.....	27
CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXOS.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Representación general del mecanismo de reacción de la “Reacción de Maillard”.....	5
2 Transposición de los productos de condensación.....	7
3 Representación de la pared celular de <i>S. aureus</i>	12
4 Preparación del sistema modelo glucosa-lisina.....	20
5 Aplicación de los discos en las cajas inoculadas	20
6 Microplaca ensayo y experimento.....	23
7 <i>Staphylococcus aureus</i> en agar no selectivo Mueller-Hinton.....	25
8 <i>Staphylococcus aureus</i> en agar sal y manitol.....	25
9 Metodología de difusión en agar y pocillos.....	26
10 Sistemas modelo glucosa-lisina después del tratamiento.....	29
11 Resultados obtenidos después de 18 horas de incubación.....	29
12 Porcentaje de inhibición del sistema modelo glucosa-lisina 0.1 M a100°C/30 min.....	35
13 Porcentaje de inhibición del sistema modelo glucosa-lisina 0.2 M 100°C/30min....	35
14 Porcentaje de inhibición del sistema modelo glucosa-lisina 0.3 M 100°C/30 min...	36
15 Porcentaje de inhibición del sistema modelo glucosa-lisina 0.1 M 130°C/30min....	36
16 Mecanismo propuesto para la capacidad antimicrobiana de las melanoidinas.....	38

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Porcentajes de inhibición de los sistemas modelo.....	30
2	Porcentajes de inhibición con respecto al control positivo	33

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la capacidad antimicrobiana de los productos de la reacción de Maillard mediante el sistema modelo Glucosa-Lisina sometido a diferentes temperaturas y tiempos de calentamiento.

Objetivos Específicos

- a. Elaborar y optimizar sistemas modelos aminoácido-azúcar (Glucosa-Lisina) en concentraciones de 0.1, 0.2, y 0.3 M para determinar la capacidad antimicrobiana.
- b. Activar y preservar la cepa certificada *Staphylococcus aureus* ATCC 9144.
- c. Evaluar el efecto antimicrobiano del sistema modelo Glucosa-Lisina sometido a dos diferentes temperaturas (100° y 130° C) y un tiempo de calentamiento (30 minutos) por el método de difusión en agar y microdilución en placa.
- d. Determinar si *Staphylococcus aureus* es sensible a los productos de la reacción de Maillard estimando el porcentaje de inhibición del sistema modelo Glucosa-Lisina mediante la metodología de microdilución en placa

RESUMEN

La reacción de Maillard forma parte de un conjunto de transformaciones que se dan de manera inevitable e irreversible en los alimentos sometidos a ciertas temperaturas. Es por ello que las investigaciones están centradas en encontrar los compuestos y las propiedades que estos podrían presentar. En esta investigación se evaluó la capacidad antimicrobiana del sistema modelo glucosa-lisina. Primeramente se obtuvieron los productos de la reacción de Maillard del sistema modelo glucosa-lisina a una concentración final de 0.1, 0.2 y 0.3 M. (a la cual fueron evaluados) cada uno sometido a dos diferentes temperaturas (100 y 130 °C) y un tiempo de calentamiento (30 minutos). Después se procedió a preparar el inóculo bacteriano de la cepa *S. aureus* ATCC 9144, ajustándolo a 0.5 en la escala de McFarland (1×10^8 UFC/ml), y fue utilizado para evaluar la capacidad antimicrobiana. Después de realizar ambas metodologías, de acuerdo con CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) se observó que en los ensayos (difusión en agar) la capacidad antimicrobiana de los productos de la reacción de Maillard no es apreciable, en cambio a nivel óptico (microdilución en placa) sí se observó una inhibición. La tendencia o porcentajes de inhibición que se estimaron variaron entre 62-91% en las diferentes etapas del crecimiento de *S. aureus*, con lo cual se pudo corroborar la capacidad antimicrobiana de los productos de la reacción de Maillard.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos oportunistas han estado ganando importancia los últimos años, siendo *Staphylococcus aureus* uno de los principales agentes causales de enfermedades nosocomiales a nivel intrahospitalario, este es considerado un patógeno importante productor de enterotoxinas, responsables del *síndrome del shock toxico* y de la *intoxicación por alimentos*. Otras enfermedades que causa este microorganismo son: *bacteriemia* y *endocarditis*, *Infecciones de heridas, prótesis y catéteres*, entre otras (Murray, 2008).

Hoy en día existe un abuso excesivo de los antibióticos, propiciando que la automedicación genere cepas resistentes de un sin número de bacterias, pero es *Staphylococcus aureus* el que llama la atención, ya que actúa como patógeno oportunista dentro de hospitales, comprometiendo la salud de los paciente; a su vez produce 5 tipos de enterotoxinas que son capaces de causar intoxicación al consumir alimentos contaminados, independientemente si la persona que ingiere dichas toxinas es inmunocompetente o no (Romero, 2010).

Aunado a todo esto existe una cepa de *Staphylococcus aureus* que es resistente a la mayoría de los antibióticos, el ya muy conocido SARM (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente) por sus siglas en inglés, el cual causa principalmente infecciones nosocomiales, pero se ha visto que esta bacteria se ha diseminado fuera de los hospitales. Esta súper bacteria puede provocar infecciones potencialmente letales y generalmente solo es posible tratarla con antibióticos intravenosos muy costosos.

La prevalencia de SARM en hospitales, varia ampliamente en reportes de todo el mundo, con cifras elevadas como las descritas en Corea (59%), o bajas como las descritas en Panamá (4.1%) (Lim y col., 2006).

Es por ello que la búsqueda de nuevas alternativas para su control han ido en aumento; los investigadores están mirando hacia otras posibles soluciones y no solo en los antibióticos sintéticos convencionales.

En la actualidad existen alimentos con propiedades funcionales, es decir que, además de cumplir su función de darnos las calorías necesarias y así obtener energía tienen un plus, pueden ayudarnos en la digestión, a bajar niveles de colesterol, dependiendo del

tipo de alimento que se trate, es decir, contienen componentes biológicamente activos benéficos para la salud y que nos ayudan a disminuir el riesgo de padecer enfermedades.

Algunos ejemplos de alimentos funcionales, ya sean naturales o sintéticos son los que contienen altos niveles de omega-3, soja, prebióticos y probióticos por mencionar algunos. Muchas de estas propiedades en los alimentos se les han atribuido a la reacción de Maillard que ocurre durante la cocción de algún alimento, es decir, cuando se le somete a una elevada temperatura el alimento adquiere ciertas propiedades funcionales, tales como capacidad antioxidante o quelante debido a la formación de los productos de la reacción de Maillard, la cual se ha venido estudiando a profundidad los últimos años, tal como lo muestra el trabajo realizado por Vhangani y col., (2012), donde demuestran la capacidad antioxidante que presentan los sistemas modelo fructosa-lisina y ribosa-lisina.

También existen varias investigaciones que han demostrado la capacidad antimicrobiana de algunos productos de la reacción de Maillard. En el 2012, Wu y col., utilizaron un complejo de xilano-quitosano-zinc para medir la capacidad antioxidante y antimicrobiana, esta última en *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus magaterium*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Los resultados arrojaron que el complejo xilano-quitosano tiene una acción débil contra *S. aureus*, pero no para *E. coli*.

La reacción de Maillard ha tomado gran importancia por las propiedades funcionales que puede presentar y su posible potencial benéfico para la salud, es por ello que el objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad antimicrobiana de los productos de la reacción de Maillard sobre *Staphylococcus aureus*.

ANTECEDENTES

Generalidades de la Reacción de Maillard

La reacción de Maillard designa un grupo muy complejo de transformaciones que traen consigo la producción de múltiples compuestos entre ellos las melanoidinas coloridas las cuales están presentes en la mayoría de los alimentos (Badui, 2006).

Para que esta reacción se lleva a cabo se requiere un azúcar reductor y un grupo amino libre proveniente de un aminoácido o una proteína. Esta reacción se da de forma natural ya sea por la cocción, horneado o asado de alimentos y es responsable del sabor, olor, color entre otras características de estos (Manzocco y col., 2011).

Estas reacciones las observó por vez primera el químico francés Louis-Carnille Maillard, en 1913, pero no fue sino hasta 1953 cuando se propuso un mecanismo de reacción general, donde el compuesto de Amadori se consideraba importante. Una de las características de algunos compuestos generados por el oscurecimiento de Maillard es la capacidad antioxidante, principalmente de las melanoidinas, que actúan como quelantes y eliminadoras de oxígeno. Dichas reacciones pueden hacer al alimento funcional (Badui, 2006).

Debido a su gran complejidad, esta reacción involucra una serie de aspectos que todavía no se conocen bien y que requieren más investigación. El comportamiento de los azúcares varía considerablemente según el pH, la temperatura, la presencia de otras sustancias, la actividad del agua, entre otras, por lo que pueden seguir diversas rutas químicas dependiendo de la composición del alimento (figura 1). Para entender mejor estos cambios, en muchos casos se emplean sistemas modelo de laboratorio con un estricto control sobre los parámetros que más influyen; en estas circunstancias resulta muy difícil comprender todo lo que ocurre en el matraz, y más aún extrapolar esta información a un alimento que contiene un gran número de sustancias desconocidas y capaces de reaccionar.

La estructura química de las melanoidinas es muy compleja; los estudios espectrofotométricos han demostrado la presencia de muchos dobles enlaces de

aminoácidos y de distintos grupos heterocíclicos. Casi todas las melanoidinas tienen su máxima absorción a 420 o 490 nm, por lo cual pueden ser cuantificadas a estas longitudes de onda. Por otra parte, mediante sus espectros en el infrarrojo o en el ultravioleta se ha podido seguir el curso de su formación (Martins y col., 2001).

Como se puede deducir, el número de compuestos que se genera por la reacción de Maillard en su conjunto es muy grande; muchos de ellos contienen grupos aldehído y grupos cetona, por lo que muestran una capacidad reductora muy alta, y en los sistemas modelo ha sido posible demostrar su efecto antioxidante.

La reacción de Maillard se ve influida por los siguientes parámetros:

- 1) A pH alcalino se incrementa la velocidad y alcanza un máximo a pH 10. Por lo contrario, el mecanismo se inhibe en condiciones muy ácidas, que normalmente no se encuentran en los alimentos.
- 2) Las temperaturas elevadas aceleran la reacción, pero debido a que su energía de activación es baja, se observa de igual manera hasta en condiciones de refrigeración.
- 3) Otro factor importante es la actividad del agua, por lo que los alimentos de humedad intermedia son los más propensos; una actividad del agua menor no permite la movilidad de los reactantes, lo que inhibe el mecanismo. Una actividad del agua mayor produce el mismo efecto ya que diluye los reactantes.
- 4) El tipo de aminoácido es decisivo, puesto que será más reactivo en la medida en que se incremente el tamaño de la cadena y tenga más de un grupo amino. Por esta razón, la lisina, con su amino en posición ϵ es el más activo.
- 5) Los azúcares reductores que más favorecen la reacción de Maillard son, en primer término, las pentosas, y en segundo las hexosas; asimismo, las aldosas actúan más fácilmente que las cetosas, y los monosacáridos son más efectivos que los disacáridos. Los ácidos nucleicos también intervienen, porque contienen ribosa altamente reactiva.
- 6) Metales como el cobre y el hierro tienen un efecto catalizador sobre la formación de las melanoidinas, lo que indica el carácter de oxidación-reducción de la última etapa de este mecanismo. El oxígeno y las radiaciones electromagnéticas actúan de manera semejante. La ausencia de estos agentes (metal, luz y oxígeno) no previene el inicio de la reacción, ya que sólo favorecen la polimerización final (Fenemma, 2010).

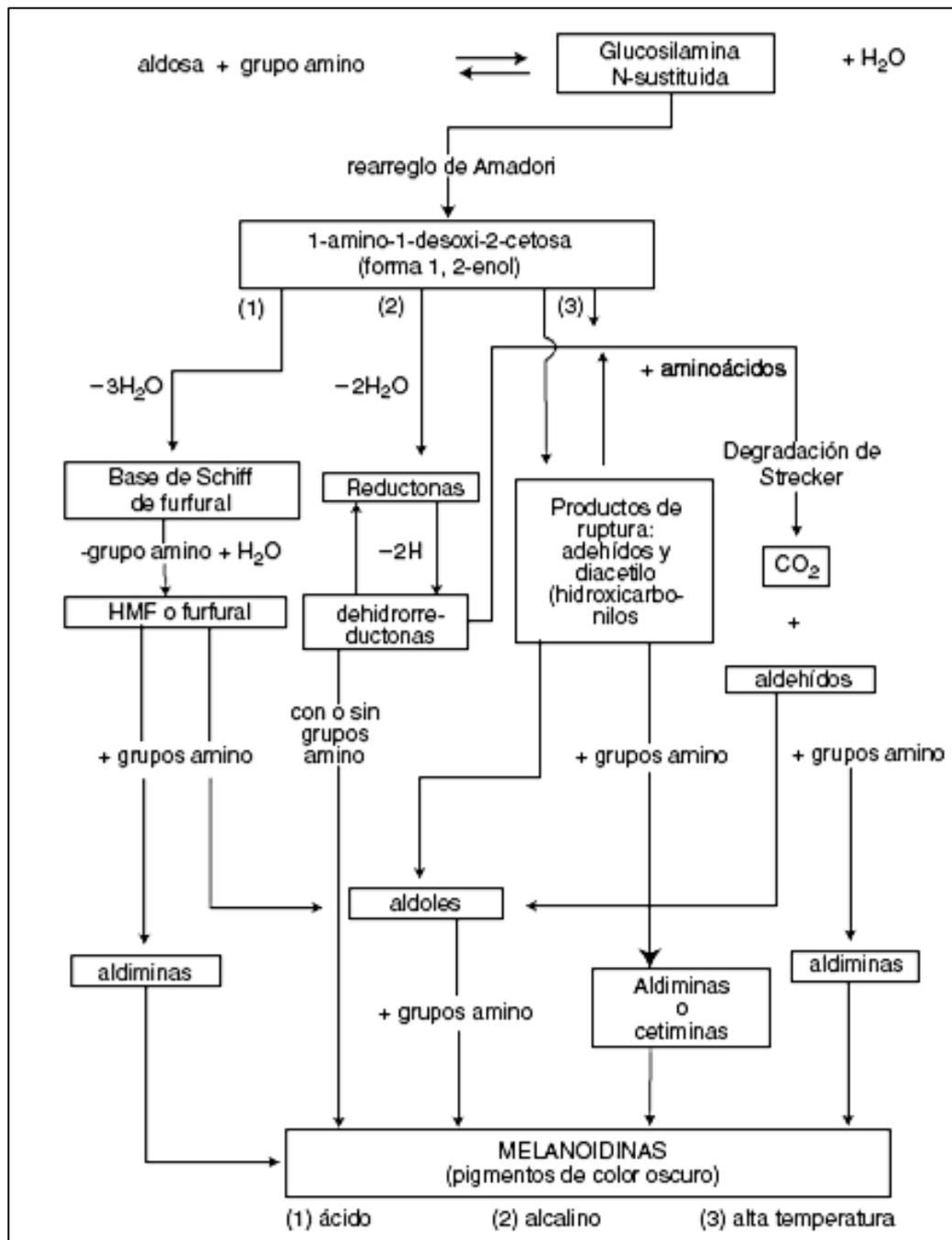


Figura 1. Representación general del mecanismo de reacción de la "Reacción de Maillard". Fuente: Badui Dergal, Salvador. 2006. Química de los Alimentos. 4ta ed. México. Pearson Educación. 736 p.

Mecanismo de Reacción

La reacción de Maillard se lleva a cabo de manera muy compleja mediante un gran número de mecanismos que incluyen la posible producción de radicales libres.

De acuerdo con los primeros trabajos de Hodge (1953), en donde se resumen las posibles rutas que siguen los reactantes. Con base en esto, la reacción se ha dividido en cuatro etapas principales

- Condensación del azúcar reductor con el grupo amino.
- Transposición de los productos de condensación.
- Reacción de los productos de la transposición.
- Polimerización y formación de sustancias coloreadas.

Condensación del Azúcar Reductor con el Grupo Amino.

Esta primera etapa consiste en que el carbonilo libre de un azúcar reductor se condensa con el grupo amino libre de un aminoácido o de una proteína produciéndose una imina o base de Schiff y agua.

El azúcar debe tener una estructura abierta para que el carbonilo sea atacado nucleofílicamente por el par de electrones libres del nitrógeno del grupo amino, y formar así la base de Schiff. A su vez, la base de Schiff se cicla y genera una glucosilamina que puede ser aldosamina si interviene una aldosa, o cetosamina, si lo hace una cetosa. En esta etapa no hay todavía producción de sustancias coloreadas ni de compuestos insaturados que absorban radiaciones, por lo cual resulta imposible medir espectroscópicamente la intensidad de la reacción (Melton y col., 2006).

Transposición de los Productos de Condensación

Tanto las aldosaminas como las cetosaminas que se han producido hasta ahora, son inestables y están sujetas a diversos cambios químicos; las primeras se isomerizan a cetosas por el mecanismo de Amadori, mientras que las segundas se transforman en aldosas por la transposición de Heyns. Por ejemplo, la glucosilamina cambia a una

fructosamina o 1-amino-1-desoxifruktosa, mientras que las cetosilaminas lo hacen a 2-amino-2-desoxialdosa. Las dos isomerizaciones son reversibles, y aún no se sintetizan sustancias coloreadas. La transposición de Amadori ha sido aceptada como mecanismo de isomerización desde que Hodge la propuso en 1953 (Belitz y col., 2009). Figura 2.

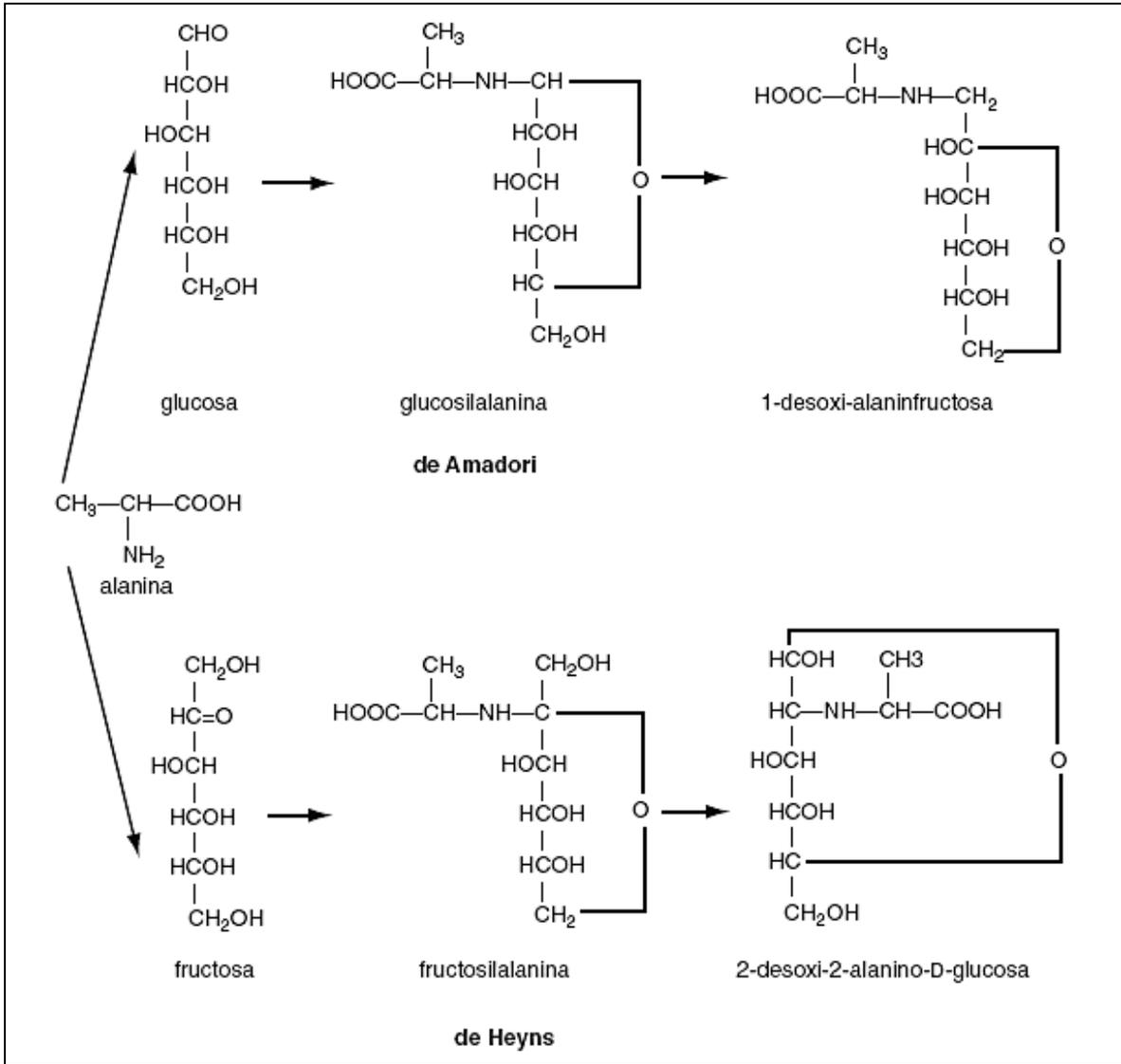


Figura 2. Transposición de los Productos de Condensación. Fuente: Badui Dergal, Salvador. 2006. Química de los Alimentos. 4ta ed. México. Pearson Educación. 736 p.

Reacción de los Productos de la Transposición

Según las condiciones prevalecientes de pH, actividad del agua y temperatura, los compuestos formados pueden sufrir modificaciones muy profundas. En esta fase aparecen algunos olores, se incrementa el poder reductor, se observan ligeras tonalidades amarillas, y aumenta la absorción de las radiaciones ultravioleta. La principal reacción es la deshidratación de los azúcares por isomerización enólica, con lo cual se sintetiza furfural y sus derivados, así como reductonas y deshidrorreductonas, ambas con un alto poder reductor; también se producen compuestos como el maltol, el etilmaltol y el acetil-furano, que son los que producen el aroma del pan. (Badui, 2006)

Además de la deshidratación, se presentan también mecanismos de fragmentación de los azúcares enólicos, con lo cual se favorece la síntesis de un gran número de compuestos de peso molecular bajo, como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes de dos a cuatro átomos de carbono. Entre éstos se encuentra el gliceraldehído, el piruvaldehído, el acetol, la acetoína y el diacetilo, todos con un olor característico.

Casi todas las sustancias resultantes son insaturadas y muy reactivas, por lo que siguen, a su vez, diversas rutas químicas según las condiciones imperantes de acidez, temperatura, etc., (Borreli y col., 2002).

Polimerización y Formación de Sustancias Coloreadas

La fase final de esta reacción es la polimerización de un gran número de compuestos insaturados, que trae consigo la síntesis de las sustancias coloreadas llamadas melanoidinas, compuestos con un peso molecular de 5 a 10 kD cuya composición no ha sido definida con claridad; dichos compuestos se encuentran relacionados con la retención del sabor del café y, a pesar de que su concentración es baja, ejercen un efecto muy marcado en la apariencia del alimento. El color se debe a una amplia absorción del espectro visible por parte de diversos cromóforos. En la síntesis del polímero influyen decididamente algunas moléculas como el furfural, el hidroximetil-furfural, las desoxiosulosas, los aldehídos, las pirazinas, los imidazoles, las cetonas y las reductonas; como muchos de estos compuestos contienen grupos carbonilos, se favorece la condensación aldólica:

A su vez, estos dímeros pueden seguir polimerizándose con otros aldehídos libres o con grupos amino (Wang y col., 2011).

Alimentos Funcionales

En la actualidad, el concepto de nutrición ha evolucionado notablemente gracias a la investigación constante y al crecimiento de la información disponible. La prevención de enfermedades crónicas no transmisibles se ha convertido en el foco de interés tanto desde la Salud Pública como desde la investigación y la tecnología. En este marco nacen los Alimentos Funcionales, diseñados especialmente con componentes que pueden afectar funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional. Dicho efecto puede ser contribuir a la mantención de la salud y bienestar, a la disminución del riesgo de enfermar, o ambas cosas (Olagnero y col., 2007).

El concepto de Alimentos Funcionales surge como un instrumento para mejorar la salud de la población y reducir el riesgo de ciertas enfermedades, a partir de la mayor esperanza de vida y del crecimiento de las enfermedades crónicas y sus consecuencias sobre la salud pública. Es importante resaltar que un alimento funcional debe seguir siendo un alimento y ejercer sus acciones benéficas en las cantidades habitualmente consumidas en la dieta.

La evidencia científica rigurosa que demuestra acciones funcionales se encuentra concentrada en alimentos con probióticos y simbióticos, en productos con elevado aporte de fibras y/o prebióticos y en alimentos ricos en ácidos grasos omega 3, monoinsaturados y/o adicionados con fitoesteroles.

Prebióticos

Algunos componentes presentes de la fibra son denominados prebióticos, definidos como ingredientes alimenticios no digeribles de los alimentos que afectan de manera positiva al huésped, estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad metabólica de un número limitado de cepas de bacterias colónicas. Estos compuestos se caracterizan por ser moléculas de gran tamaño que no pueden ser digeridas por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto, alcanzando el intestino grueso donde son degradados por la microflora

bacteriana, principalmente por las bifidobacterias y lactobacilos, generando de esta forma una biomasa bacteriana saludable y un pH óptimo (Ashwell, 2005).

Para que un ingrediente alimenticio sea considerado prebiótico debe cumplir con los siguientes criterios:

- No debe ser hidrolizado o absorbido en la parte alta del tracto digestivo;
- Debe ser fermentado selectivamente por una o un número limitado de bacterias potencialmente benéficas del colon, por ejemplo bifidobacterias y lactobacilos.
- Debe ser capaz de alterar la microflora colónica tornándola saludable, por ejemplo reduciendo el número de organismos putrefactivos e incrementado las especies sacarolíticas. (Kolda y col., 2002)

Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando son administrados en una cantidad adecuada, producen efectos benéficos al hospedero. Las especies de los géneros lactobacillus y bifidobacterium son las que se usan actualmente como probióticos en alimentos destinados al consumo humano. Generalmente, los probióticos se incluyen en leches fermentadas, yogures y queso, aunque también pueden suministrarse como suplementos clínicos y dietarios, en forma de cultivos liofilizados (Granato y col., 2010).

Los alimentos que contienen probióticos se consideran alimentos funcionales y constituyen el mayor segmento de mercado en Europa, Australia, Japón y Estados Unidos de Norteamérica. (Ross y col., 2005).

Los probióticos deben de consumirse en cantidad suficiente para que lleguen vivos en concentración adecuada, al colon. Allí tendrían que adherirse el intestino para establecer una comunicación celular con el hospedero y poder ejercer sus efectos benéficos. El mantenimiento de la viabilidad es un reto tecnológico ya que los probióticos deben tolerar, tanto los estreses del procesamiento del alimento que los contendrán, como el ambiente gastrointestinal que el microorganismo tiene que atravesar al ser ingerido (Ross y col., 2005). Una forma de mantener un probiótico vivo es encapsularlo y para ello se usan matrices de diferentes biomoléculas. En este sentido, las proteínas de la leche resultan una opción económica y segura.

Generalidades de *Staphylococcus aureus*

La designación *Staphylococcus* se refiere a que las células de esta bacteria se desarrollan en un patrón que asemeja a un racimo de uvas, sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas.

Staphylococcus aureus tiene un diámetro de entre 0,5 y 1 μm , son anaerobios facultativos inmóviles capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal y a temperaturas desde 18 hasta 40 °C, no forma esporas. Las colonias de *S. aureus* son doradas debido a los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, de ahí el nombre de la especie. Igualmente, representa la única especie colonizadora del ser humano que produce la enzima coagulasa. Cuando se suspende una colonia de *S. aureus* en un tubo con plasma, la coagulasa se une a un factor sérico y el complejo convierte el fibrinógeno en fibrina, lo que da lugar a un coágulo (Molina y col., 2010).

Estas bacterias están presentes en la piel y las mucosas del ser humano. También forma parte de un grupo de patógenos importantes en el ser humano y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden poner en peligro la vida, tales como

Infecciones de la piel

- Carbuncos
- Foliculitis
- Forúnculos
- Impétigo
- Infección de heridas

Mediadas por toxinas

- Intoxicación alimentaria
- Síndrome de la piel escaldada
- Síndrome del *shock* tóxico

Infecciones oportunistas

- Artritis séptica
- Bacteriemia
- Empiema
- Endocarditis
- Osteomielitis

Cápsula y Capa de Polisacárido Extracelular

La capa más externa de la pared celular estafilocócica se puede recubrir de una cápsula de polisacárido. La cápsula protege a las bacterias al inhibir la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares (PMN). La mayor parte de los estafilococos producen una biopelícula hidrosoluble laxa (capa de polisacárido extracelular). Véase *Figura 3*. Formada por monosacáridos, proteínas y pequeños péptidos en una cantidad que depende de factores genéticos y de las condiciones de crecimiento. Esta sustancia extracelular une a las bacterias a tejidos y cuerpos extraños, como catéteres, injertos, prótesis valvulares y derivaciones. Esta propiedad es particularmente importante en el papel que juegan como causantes de enfermedades nosocomiales (Castañon, 2012).

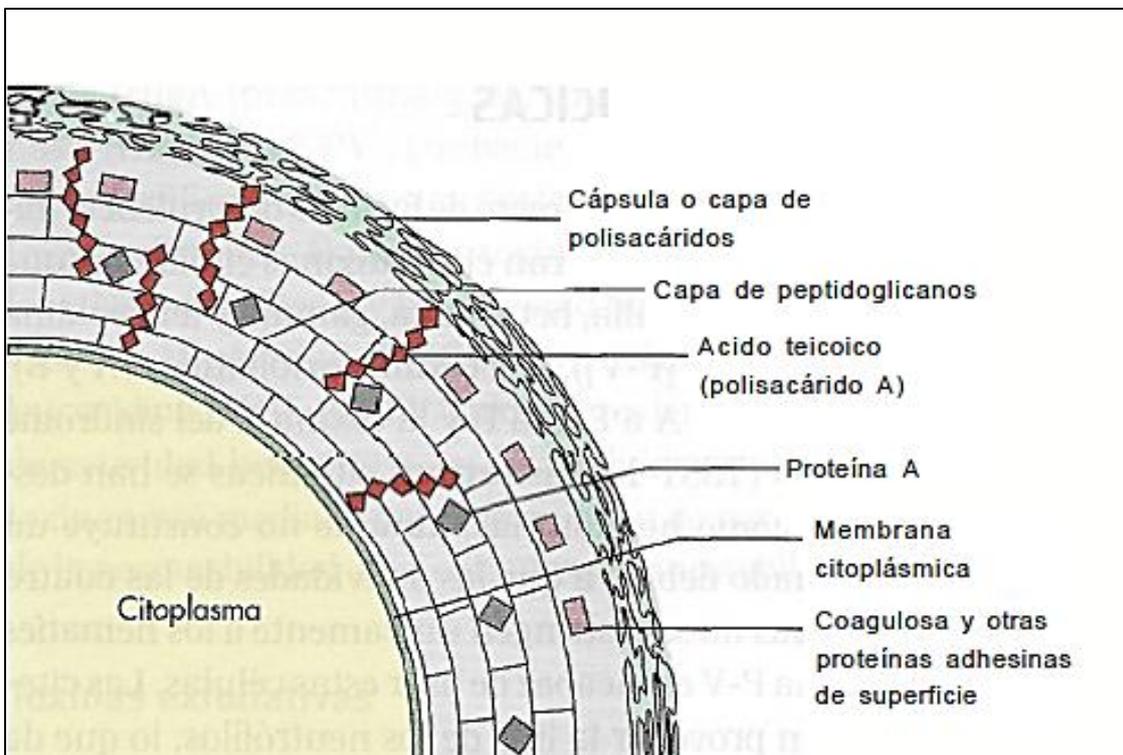


Figura 3. Representación de la pared celular de *S. aureus*. Fuente: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaüer MA. 2008. Microbiología Médica. 5ta ed. Madrid, España. ELSEIVER. 962 p.

Peptidoglucano

El peptidoglucano está formado por capas de cadenas de glucanos construidas con 10 o 12 subunidades alternantes de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Las cadenas laterales de oligopéptidos están unidas a las subunidades de ácido N-acetilmurámico y se entrecruzan por medio de puentes peptídicos. Por ejemplo, las cadenas de glucanos de *S. aureus* se entrecruzan mediante puentes de pentaglicina unidos a la L-lisina en una cadena oligopeptídica y a la D-alanina en la cadena adyacente. A diferencia de lo que sucede en las bacterias gram negativas, la capa de peptidoglucano en los microorganismos gram positivos se compone de numerosas capas entrecruzadas, lo que confiere una mayor rigidez a la pared celular.

El peptidoglucano posee una actividad de tipo endotoxina, ya que estimula la producción de pirógenos endógenos, la activación del complemento, la formación de interleucina-1 por parte de los monocitos y la agregación de los leucocitos PMN, un proceso que origina la formación de abscesos (Murray, 2008).

Ácidos Teicoicos

Los ácidos Teicoicos constituyen otro destacado componente de la pared celular. Son glicerofosfatos de polirribitol específicos de especie que se unen de manera covalente a residuos de ácido N-acetilmurámico de la capa de peptidoglucano o a través de una unión lipofílica a la membrana citoplásmica (ácidos lipoteicoicos). El ácido teicoico de ribitol con residuos de N-acetilglucosamina («polisacárido A») se encuentra presente en *S. aureus*. Intervienen en la activación del complemento y en la adherencia a las superficies de mucosa conforme se unen a la fibronectina (Spicer, 2009).

Proteína A

La superficie de las cepas de *S. aureus* está recubierta de la proteína A. Esta proteína se une a la capa de peptidoglucano o a la membrana citoplásmica y tiene afinidad de unión especial el receptor Fc de las inmunoglobulinas IgG1; IgG2 e IgG4, lo que previene de forma eficaz la eliminación inmunitaria del microorganismo mediada por anticuerpos. La proteína A

extracelular se puede unir también a los anticuerpos, formando inmunocomplejos con el consiguiente consumo de complemento. (Murray y col., 2008)

Membrana Citoplásmica

La membrana citoplásmica se compone de un complejo de proteínas, lípidos y una pequeña cantidad de hidratos de carbono. Actúa de barrera osmótica para la célula y proporciona una sujeción para la biosíntesis celular y las enzimas respiratorias.

Patogenia

La patología de las infecciones estafilocócicas depende de la producción de proteínas de superficie que intervienen en la adhesión de las bacterias a los tejidos del organismo anfitrión y la fabricación de proteínas extracelulares, como toxinas específicas y enzimas hidrolíticas. La expresión de los genes que codifican exoproteínas se encuentra controlada fundamentalmente por un regulador global, *agr*, el cual está controlado, a su vez, por factores ambientales, la densidad celular y la disponibilidad de energía.

Produce y segrega toxinas y enzimas virulentas. La leucocidina (PVL) media la destrucción de los fagocitos. El factor de afinidad por el fibrinógeno, la coagulasa y la hialuronidasa aumentan la invasión y la supervivencia en los tejidos. (Forbes, 2009)

Factores de Patogenicidad

Adhesina: es una sustancia proteica que favorece el anclaje de las bacterias a la membrana citoplasmática de las células y los tejidos.

- Coagulasa: esta enzima se correlaciona con el 97% de las cepas de *S. aureus* y se considera la prueba tipo para identificar a esta especie. Actúa transformando el fibrinógeno en fibrina, formando una capa sobre la bacteria que la protege de la fagocitosis

- Lipasas: son varias enzimas que actúan sobre diferentes sustratos que le permiten colonizar áreas de la piel donde se encuentran en altas concentraciones.
- Hialuronidasa: esta enzima actúa sobre el ácido hialurónico, presente en el pegamento de las células de los tejidos, favoreciendo así la difusión de la célula a los tejidos.
- Estafiloquinasa: es una fibrinolisisina que activa el plasminógeno, lo transforma en plasmina y este actúa sobre la fibrina, rompiendo enlaces peptídicos que lisan la fibrina.
- Nucleasa: es una enzima que tiene propiedades endonucleolíticas y exonucleolíticas, puede actuar sobre el ADN y el ARN, produciendo licuación del material; es un factor de difusión.
- Toxina alfa o hemolisina alfa: es una toxina con acción hemolítica sobre los eritrocitos de diferentes especies, lesiona las plaquetas y es dermonecrótica.
- Toxina beta: actúa sobre la esfingomielina de la membrana de los eritrocitos, produciendo hemólisis en frío y calor.
- Toxina delta: es hemolisis, lesiona linfocitos, plaquetas y neutrófilos.
- Toxina gamma: produce lisos de eritrocitos de diferentes especies.
- Leucocidina: causa lisos de polimorfonucleares y de macrófagos, pero no de otras poblaciones de leucocitos ni eritrocitos.
- Enterotoxinas: se han identificado 7 diferentes toxinas que se denominan A, B, C1, C2, D, E y F. Provocan intoxicación o envenenamiento por la ingestión de alimentos contaminados por *S. aureus*. El cuadro clínico aparece a las cuatro u ocho horas de la ingestión, y se caracteriza por náuseas, vómitos, diarrea y cólicos.
- Exfoliatina: es una toxina que actúa específicamente a nivel de la piel, lo cual produce la separación de estrato granuloso de la epidermis, desprendiéndose de la piel en colgajos.
- Exotoxinas pirógenas: se han identificado tres diferentes sustancias pirógenas que se denominan A, B y C; las tres producen fiebre de diferente intensidad.
- ADNasa: se encarga del rompimiento del ADN celular.
- B- lactamasa: rompe el anillo B- lactámico de los antimicrobianos. (Romero, 2007)

Tratamiento

El tratamiento de primera elección es aquel que sea resistente a las beta-lactamasas, ya que cerca del 50% de las cepas actualmente son productoras de estas enzimas. La codificación genética para la producción de esta enzima se encuentra en un plásmido que puede ser transportado a otra bacteria por transducción por bacteriófagos, y no se ha observado la conjugación en *S. aureus*. También se han encontrado plásmidos que contienen los genes para la resistencia a otros antibióticos. La meticilina se ha convertido en un indicador de resistencia, ya que las cepas meticilina-resistentes son poco vulnerables a varios antimicrobianos. Los antibióticos que se utilizan son: (Tay, 2012).

- Dicloxacilina
- Cefalosporinas de primera generación
- Fosfomicina
- Eritromicina y otros macrólidos
- Vancomicina
- Teicoplanina
- Quinolonas

SARM

Staphylococcus aureus meticilina-resistente (SAMR) ha emergido en las últimas décadas como patógeno nosocomial y, recientemente, a nivel comunitario. El mecanismo más importante de resistencia a la meticilina es la expresión de una proteína ligadora de penicilina (PLP) denominada (PLP2a), la cual es codificada por el gen *mecA* y se caracteriza por presentar muy baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos. SAMR posee resistencia cruzada a oxacilina (OXA), y diversas investigaciones demostraron que este antimicrobiano podía ser utilizado en las pruebas de sensibilidad por ser más estable.

Un estudio llevado a cabo en 1996 utilizando cepas prototipo aisladas en diferentes continentes, aportó las primeras evidencias de la existencia de tres tipos de casetes cromosomales estafilocócicos (*SCCmec*-III). Recientemente, se describió un cuarto tipo (*SCCmec*IV). Estudios recientes indican que los tipos II y IV se encuentran circulando en cepas del SAMR en México. (Velázquez, 2005)

El *National Nosocomial Infectious Surveillance System* (NNISS) en EUA identificó en hospitales de 3er nivel un incremento de SAMR del 4% en 1980 a 55% en 2001. En algunos hospitales se ha reportado una frecuencia de resistencia de hasta 80%.

En México existe un número limitado de estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana en SARM. En 1993, en el hospital general de León Gto, se identificó una resistencia global a meticilina de 24.1%, así mismo en el hospital civil de Guadalajara se obtuvieron resultados que indicaron un incremento en la resistencia a oxacilina en *S. aureus* del 7%, en 1989, a 20% en 1998. Filloy et al., encontraron 4% de resistencia a oxacilina en 687 aislados en el HIM en 1976; Muñoz et al., reportaron 0% en 1979 y 20% en 1985 en el HPCMN, IMSS; Giraud et al. Un 16% en el INNSZ en 1983-1984 y Alpuche-Aranda et al., encontraron 5% en la comunidad y 20% en hospital (589 aislados) en 1986-1989 en el HIM.

Un estudio llevado a cabo entre 1998 y 1999 en un hospital de tercer nivel en México registró una frecuencia de resistencia a SAMR de 14.2%. Por otra parte, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán” reporta para SAMR en bacteriemias en 1990 < 10%, 1991-1995 - 15%, 1996-2000- 26% y 2001-2005 del 26%. En un estudio realizado en 12 centros mexicanos de junio de 2004 a febrero 2005 se obtuvo una prevalencia inesperadamente alta en SAMR en comunidad de un 29%, 9/12 centros participantes tuvieron brotes por *S. aureus*. Los brotes fueron más frecuentes en infecciones nosocomiales y en aislados resistentes a meticilina. Dada la importancia de este microorganismo y los pocos estudios existentes en México es muy importante dar seguimiento a los brotes de resistencia en hospitales de *S. aureus* en los diferentes hospitales en todo el país (Melchor, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Método de Difusión en Agar

Preparación del Sistema Modelo Glucosa- Lisina

En la figura 4 se observan las soluciones de 50 mL de glucosa al 0.2 M y 50 mL de Lisina 0.2 M. Se mezclaron en relación 1:1 para obtener un concentración final de Glucosa-Lisina al 0.1 M.

Se hizo reaccionar la mezcla Glucosa-Lisina a dos temperaturas distintas y a dos tiempos: 100 °C por 30 min y 130 °C por 30 min. Este procedimiento se hizo por triplicado.

Preparación del Estándar de McFarland

Se preparó una solución de BaCl₂ al 0.048 M y una solución de H₂SO₄ al 0.18 M. Se mezclaron 0.5 mL de BaCl₂ con 95 mL de H₂SO₄ para obtener la turbidez que corresponde al 0.5 en la escala de McFarland (1-2 X 10⁸UFC/mL).

Se verifico la correcta turbidez en un espectrofotómetro, ajustando la absorbancia a 625 nm y dando como resultado 0.082 (Debe oscilar entre 0.08-0.13).

Preparación del Inóculo Bacteriano

Se sembró la cepa certificada ATCC 9144 de *Staphylococcus aureus* en un agar no selectivo y se incubo por 24 horas. De una colonia aislada se preparó el inóculo en un caldo nutritivo. La turbidez se ajustó a 0.5 en la escala de McFarland que equivale a 1-2x10⁸ UFC/mL.

Procedimiento para la Prueba de Difusión en agar

Después de haberse ajustado el inóculo a la escala de McFarland se humedeció un bastoncillo de algodón estéril en la suspensión. Después se giró y presiono el hisopo varias veces sobre las paredes interiores del tubo, esto para eliminar el exceso de líquido. Después del ajuste del inóculo se procedió a inocular las placas de agar Mueller-Hinton, se repitió este paso dos veces más girando 60° para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Se dejó entre abierta la caja alrededor de cuatro minutos para eliminar cualquier rastro de humedad antes de aplicar los discos impregnados.

Aplicación de los Discos en las Placas Inoculadas

Cada disco se colocó individualmente, cinco por cada caja y con un mínimo de distancia de 2.4 cm entre centro y centro de cada disco. Se presionó hacia abajo para asegurar el contacto completo con la superficie del agar. Se invirtieron las placas y se incubaron a 37 °C por 24 horas. En los primeros ensayos solo se colocaron dos discos por caja. Figura5.

Lectura de las Placas de Agar e Interpretación de Resultados

Se midió la zona completa de inhibición incluyendo el disco por la parte posterior de la placa. Se sujetó la caja unos centímetros por encima de un fondo negro. El margen de la zona de inhibición se considera aquel que no muestre un crecimiento obvio y que se pueda detectar a simple vista.

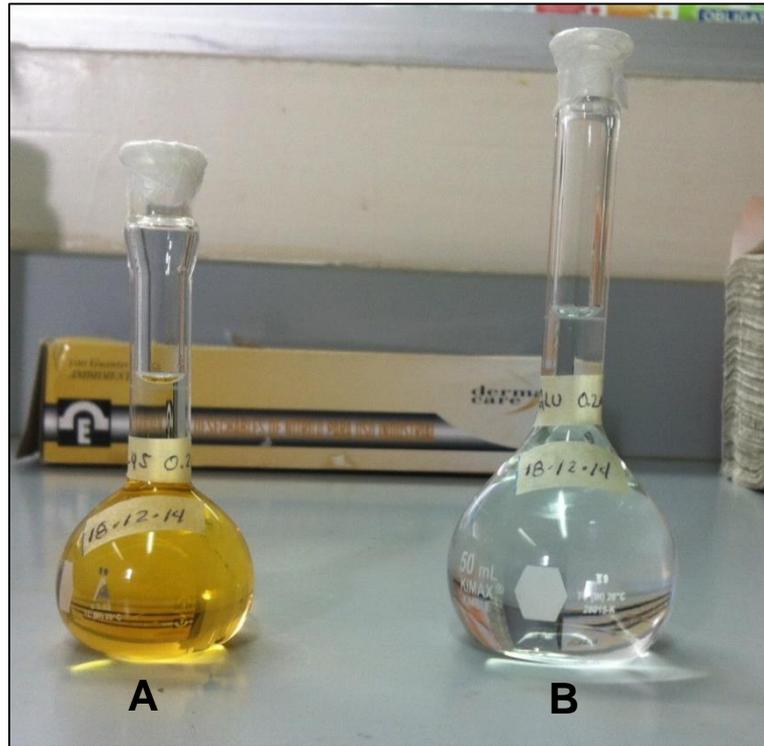


Figura 4. Preparación del carbohidrato y el aminoácido. Lisina (A), Glucosa (B).

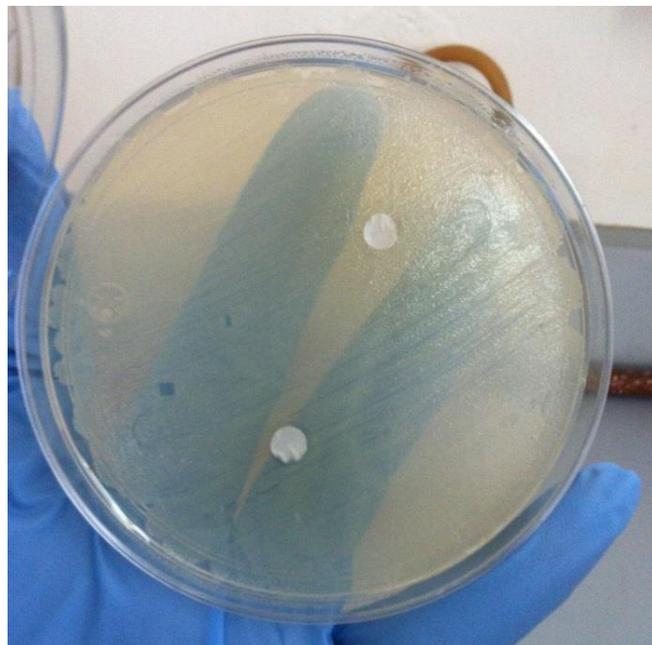


Figura 5. Aplicación de los discos en las cajas inoculadas.

Método de Microdilución en Placa

Preparación del Sistema Modelo Glucosa- Lisina

Se prepararon 50 mL de glucosa a tres diferentes concentraciones: 0.4 M, 0.8 M y 1.2 M y 50 mL de lisina con a tres diferentes concentraciones: 0.4 M, 0.8 M y 1.2 M. ambas se mezclaron respectivamente en relación 1:1 para obtener mezclas de Glucosa-Lisina de 0.2 M, 0.4 M y 0.6 M., estas concentraciones se diluyeron a la mitad (0.1, 0.2, y 0.3 M) en la microplaca por el volumen añadido de caldo estéril para realizar el experimento, por lo tanto las concentraciones finales que se evaluaron fueron 0.1, 0.2, y 0.3 M.

Las mezclas se hicieron reaccionar en un horno a 2 diferentes temperaturas y un tiempo: 100° C por 30 minutos y 130° C por 30 minutos.

Preparación del Inóculo Bacteriano

Se sembró la cepa certificada ATCC 9144 de *Staphylococcus aureus* en un agar no selectivo y se incubo por 24 horas. De una colonia aislada se preparó el inóculo en un caldo nutritivo. La turbidez se ajustó a 0.5 en la escala de McFarland. Cuando se tomó un volumen de 5 μL el estándar no necesito diluirse pero cuando se tomaron 10 μL se diluyo 1/10 para bajar la concentración de UFC en 1×10^7 .

Procedimiento para la Prueba de Microdilución en Placa

Después de ajustar el inóculo a la escala de McFarland se procedió a llenar los pocillos de la microplaca. Se hicieron varias lecturas en el espectrofotómetro con diferentes volúmenes.

Primera lectura. En los primeros 4 pocillos (vertical) se colocaron 50 μL de caldo estéril tripticasa soya más 5 μL de inóculo bacteriano (control positivo). En los siguientes 4 pocillos (vertical) se colocaron 50 μL de caldo estéril tripticasa soya sin inocular (control

negativo). En los siguientes 4 pocillos (vertical) se colocaron 50 μL de caldo estéril, 5 μL de inóculo bacteriano y 55 μL del sistema modelo glucosa lisina 0.2 M (100°C/30 min). En los siguientes 4 pocillos (vertical) se colocaron 50 μL de caldo estéril, 5 μL de inóculo bacteriano y 55 μL del sistema modelo glucosa lisina 0.4 M (100°C/30 min) y por último en los siguientes 4 pocillos (vertical) se colocaron 50 μL de caldo estéril, 5 μL de inóculo bacteriano y 55 μL del sistema modelo glucosa lisina 0.6 M (100°C/30 min).

Se realizaron hasta cinco lecturas bajo las mismas condiciones por cuadruplicado, añadiendo además un ensayo extra donde se variaron los volúmenes para comprobar que la tendencia de las curvas fuera la misma. Figura 6.

Para la obtención de los porcentajes de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{Abs_0 - \Delta Abs}{Abs_0} \times 100$$

Donde

Abs_{ct} = Absorbancia cero o primera lectura

ΔAbs = Absorbancia de la muestra menos la absorbancia cero.

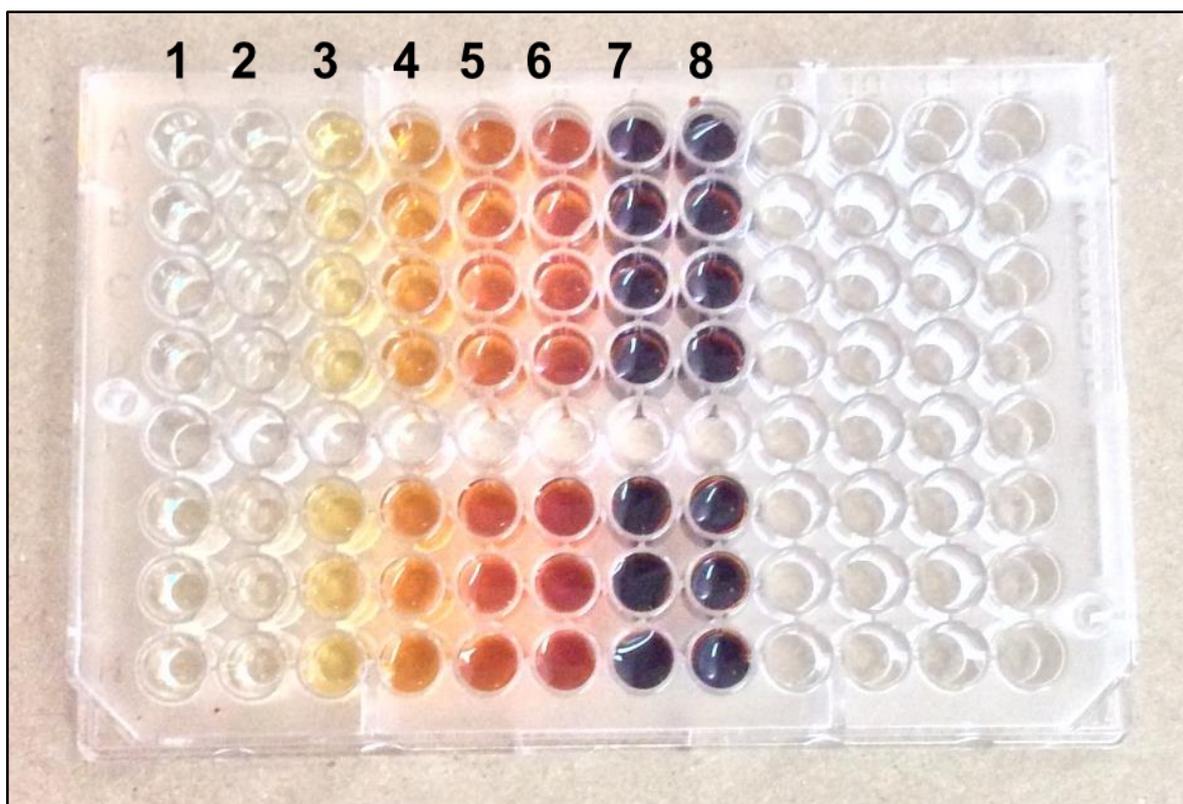


Figura 6. Microplaca, ensayo y experimento. 1) control +, 2) control -, 3) 100°C/30 min 0.1 M, 4) 100°C/30 min 0.2 M, 5) 100°C/30 min 0.3 M, 6) 130°C/30 min 0.1 M, 7) 130°C/30 min 0.2 M, 8) 130°C/30 min 0.3 M.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cepa de *Staphylococcus aureus*

Se comprobó la viabilidad de la cepa certificada sembrándola en un medio no selectivo (Mueller-Hinton) Figura 7, y en un agar selectivo (Sal y manitol), solo para confirmar que se trataba de la especie *aureus*. Figura 8. Por último se elaboró una curva de crecimiento para observar los tiempos de crecimiento (exponencial, fase estacionaria, muerte) de la bacteria.

Método de Difusión en Agar

En la metodología de difusión en agar se aplicaron los discos en las cajas inoculadas, también se hicieron pocillos en el agar para inocularlos con los productos de la reacción de Maillard (PRM). Al revisar las placas después de 24 horas de incubación no se observó halo de inhibición para el caso de las placas con discos, tampoco se observó inhibición para las placas con pocillos, esto probablemente es debido a que el sistema modelo tenía una consistencia un poco viscosa y no alcanzaba a difundir en el agar, lo cual pudo haber influido en el resultado. Figura 9.

En una de las placas se colocó la concentración más alta del sistema modelo Glucosa-Lisina (25 μ l de la reacción a 0.6 M) y se alcanzó a observar una inhibición en la parte central donde se habían colocado los productos de la reacción de Maillard, también se apreció que la reacción no difundió, ya que se quedó justamente en el lugar donde se inoculó. Figura 9., con lo cual pudimos comprobar lo dicho anteriormente, la consistencia de la reacción impidió que esta difundiera en el agar y pudiera ejercer cualquier tipo de inhibición. Se aumentó la concentración para poder ver el comportamiento de los PRM en la placa inoculada, y se observó que la inhibición está relacionada con la concentración para esta metodología (difusión en agar), como lo reportan Wu y col., (2012), donde una solución de oligómeros inhibió débilmente a *Staphylococcus aureus*. La concentración 0.6 M del sistema modelo que inhibió a *S. aureus* es importante y por ello se presenta en esta investigación, pero la concentración en estudio es 0.1 M.



Figura 7. *Staphylococcus aureus* en agar no selectivo Mueller-Hinton después de 24 horas de incubación a 37 °C.



Figura 8. *Staphylococcus aureus* en Agar Sal y Manitol. Se observa la acción de la manitolasa con el cambio de color del medio rojo a dorado, característico de esta especie.

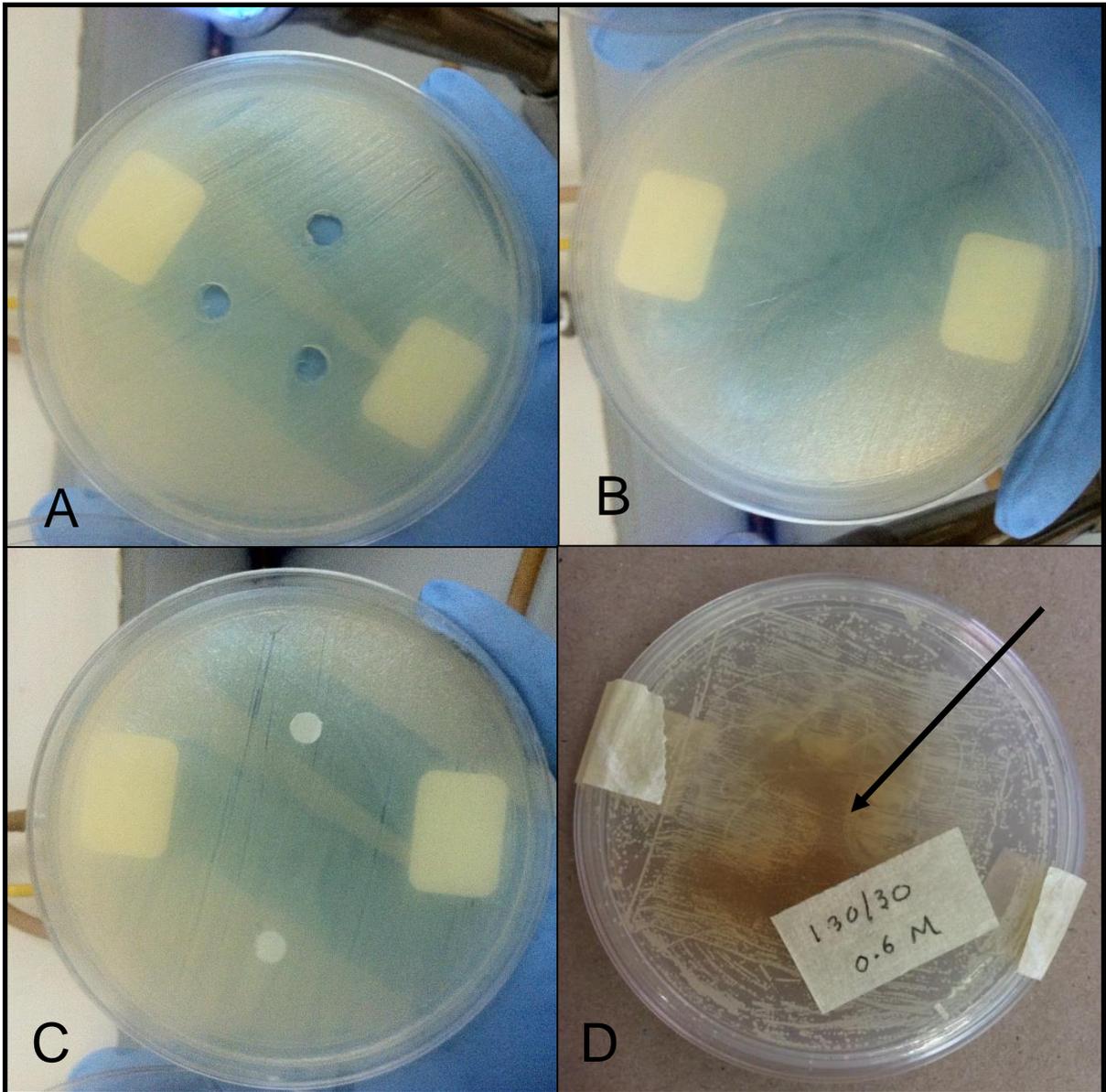


Figura 9. Metodología de difusión en agar y pocillos. A) Pocillos en agar (sin inhibición), B) PRM colocados de manera masiva (sin inhibición), C) Discos en el agar (sin inhibición), D) PRM colocados de manera masiva con concentración más alta 0.6 M (se observa inhibición)

Método de Microdilución en Placa

Debido a los resultados obtenidos en la primera prueba (difusión en agar) se decidió emplear un método más sensible donde la bacteria pudiera estar en contacto directo con la los productos de la reacción de Maillard. El método seleccionado fue el de microdilución en placa. Las figuras 12, 13, 14 y 15 muestran el porcentaje de inhibición de *S. aureus* en las diferentes etapas de crecimiento, dichas figuras fueron construidas a partir de la absorbancia contra el paso del tiempo en las diferentes fases. (Ver anexo 1)

En la figura 10 se observan los sistemas modelo con sus respectivos tratamientos. Los resultados obtenidos muestran como la reacción de Maillard es capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus*. En el control (+) se observa que la bacteria crece exponencialmente y alcanza su punto máximo a las 9 horas de incubación y al paso del tiempo comienza a decaer; en cambio, el control (-) se mantiene sin crecimiento desde el inicio hasta el final de la incubación, lo cual nos permite asegurar que el experimento fue llevado a cabo con total esterilidad. En los pocillos que contenían la reacción de Maillard el crecimiento normal de *S. aureus* se vio interrumpido, ya que comparado con el control (+) se observó un porcentaje de inhibición alto. Figura 11.

En la misma figura podemos apreciar que las últimas dos curvas, es decir, las de los tratamiento de 130°C/30 min 0.2 M y 130°C/30 min 0.3 M sobrepasan a la curva que corresponde al control +, esto se debe a la coloración que el sistema modelo tomo después de los tratamientos, esta coloración al ser muy oscura transmite menos luz, por lo que la absorbancia aumenta, sin embargo, se puede observar que de igual manera el crecimiento de *S. aureus* se ve interrumpido, aunque para estas últimas dos curvas se calculó el porcentaje de inhibición, los puntos de corte fueron diferentes a las demás curvas por lo descrito anteriormente.

Los porcentajes de inhibición para el sistema modelo glucosa-lisina 100°C/30 min. 0.1 M., se calcularon con la formula descrita anteriormente en materiales y métodos. Tabla 1. También se muestran los resultados obtenidos tomando como punto de partida la absorbancia del control (+) en 3 puntos: 3, 6 y 9 horas. Suponiendo que en cada punto la absorbancia en ese momento representaba el 100% se obtuvieron los siguientes resultados: 92.6%, 92.8%, 93.2%. Tabla 2.

Esto nos indica que durante las 18 horas de incubación el sistema modelo no permitió que *S. aureus* se multiplicara de manera normal y exponencial y en la figura 12 se muestran los porcentajes de inhibición alcanzados.

Los porcentajes de inhibición para el sistema modelo Glucosa-Lisina 100°C/30 min. 0.2 M., fueron a las 3 horas de 95% y alcanzó su punto máximo de inhibición a las 5 horas con un 99.9 %. Se observa incluso como es que la curva inicia en un punto y decae por debajo de este. Figura 13.

El sistema modelo Glucosa-Lisina 100°C/30 min. 0.3 M., alcanzó su máxima inhibición a las seis horas, una hora después que el sistema modelo anterior. Figura 14.

El sistema modelo Glucosa-Lisina 130°C/30 min. 0.1 M., alcanzó su punto máximo de inhibición a las dos horas con 30 minutos, con lo cual podemos poner de manifiesto que este sistema modelo fue el más óptimo. Figura 15.

Uno de los sistemas modelo más estudiado es la interacción del quitosano con el xilano, donde estudios previos han demostrado que a mayor calentamiento la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* aumenta (Li y col., 2011), como fue el caso de los sistemas modelo utilizados en este trabajo de investigación, donde el sistema modelo que se sometió a 130°C a una concentración de 0.1 M inhibió por completo a *S. aureus*.

En el 2013 Zhu y col., demostraron la capacidad antimicrobiana de los conjugados del sistema modelo quitosano-xilosa en varias cepas patógenas entre ellas *S. aureus* y calcularon la CMI, poniéndose de manifiesto que en las primeras 6 horas del crecimiento bacteriano la CMI que se necesitaba para inhibirla era mayor. Este estudio coincidía con el que presentaron Huang y Chen en 2007.

En la tabla 1 se observan los porcentajes de inhibición alcanzados por cada sistema modelo durante las 18 horas de incubación. Se aprecia como el sistema modelo glucosa-lisina 130°C/30 min 0.1 M es el que llega al punto máximo de inhibición en menor tiempo. Estos porcentajes fueron obtenidos aplicando la fórmula descrita anteriormente y ajustando la absorbancia con el inóculo bacteriano inicial, ya que los porcentajes están basados en el crecimiento que tuvo *S. aureus* durante la incubación.

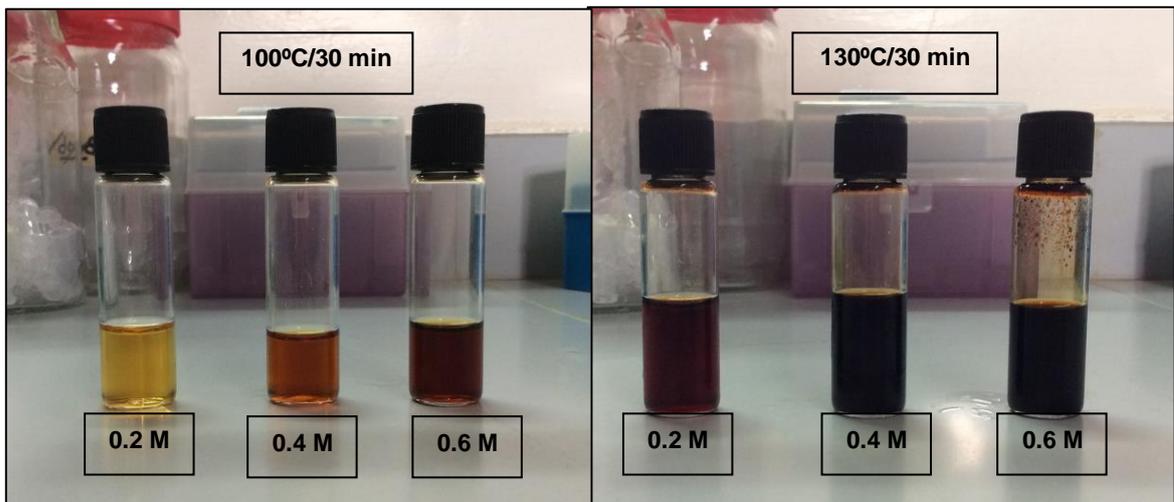


Figura 10. Sistemas modelo Glucosa-Lisina después del tratamiento a diferentes concentraciones

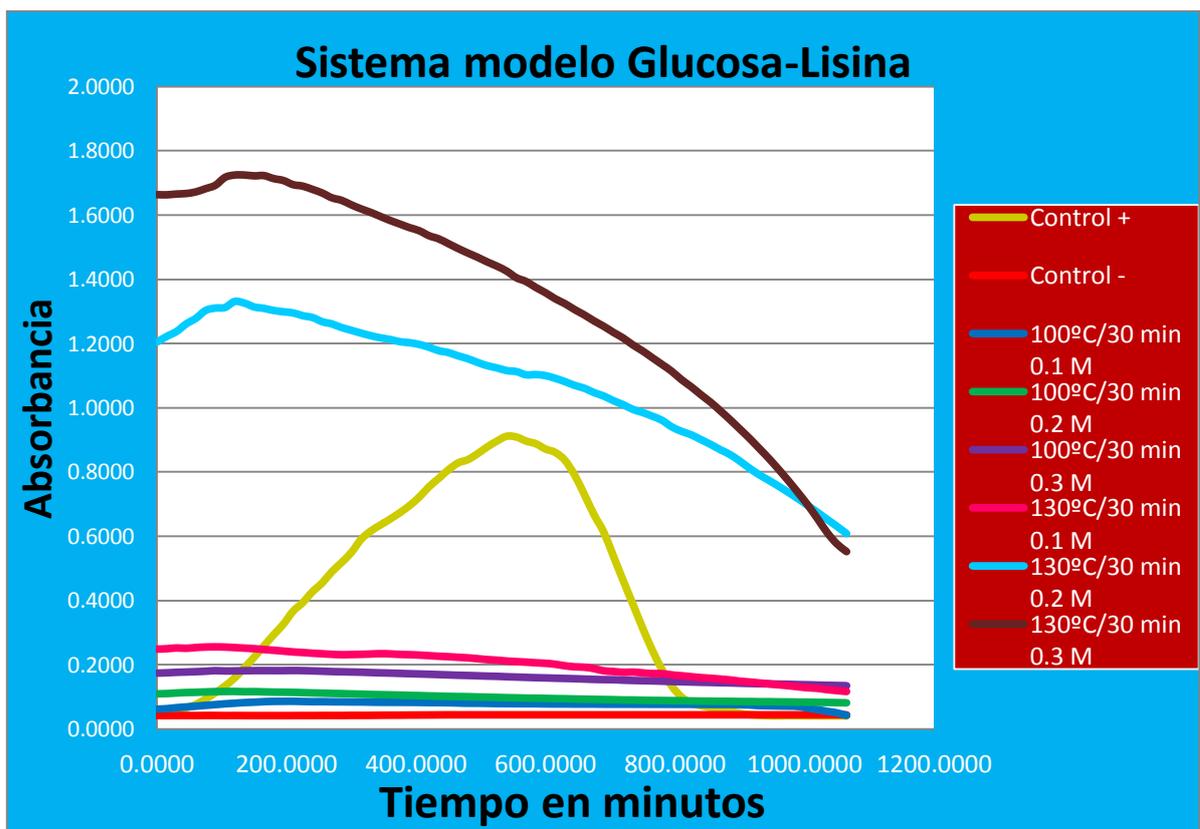


Figura 11. Resultados obtenidos después de 18 horas de incubación. Se muestra el comportamiento de cada uno de los sistemas modelo con respecto al control (+)

Tabla 1. Porcentajes de inhibición de los sistemas modelo evaluados. Se muestran los rangos de inhibición.

Sistema modelo	100°C/30 min 0,1 M	100°C/30 min 0,2 M	100°C/30 min 0,3 M	130°C/30 min 0,1 M	130°C/30 min 0,2 M	130°C/30 min 0,3 M
Tiempo	% de Crecimiento Inhibición n					
1 hrs	2.60162 97.398	0.63985 99.3601	0.57537 99.424	0.44247 99.5575	1.44410 98.5558	-0.0300 100.030
	7.64227 92.3577	2.28519 97.714	1.43843 98.561	1.44810 98.5518	2.70561 97.2943	0.12321 99.8767
	11.3821 88.6178	3.56489 96.4351	1.95627 98.0437	1.00563 98.9943	4.67258 95.3274	0.21337 99.7866
	15.1219 84.8780	4.2047 95.7952	2.58918 97.410	1.97103 98.0289	6.11669 93.8833	0.52293 99.4770
	19.3495 80.6504	5.30164 94.6983	3.33716 96.6628	2.57441 97.4255	8.15005 91.8499	1.12700 98.8729
	23.0894 76.9105	6.12431 93.8756	4.43037 95.5696	2.77554 97.224	8.7642 91.2357	1.75512 98.2448
	27.1544 72.8455	6.48994 93.5100	3.79746 96.2025	2.53419 97.4658	8.92190 91.0780	3.23375 96.7662
2 hrs	30.2439 69.7560	6.76416 93.2358	4.02761 95.972	1.89058 98.1094	10.4738 89.5261	3.67554 96.3244
	33.495 66.504	5.94149 94.0585	4.25776 95.7422	1.24698 98.7530	10.0423 89.9576	3.67854 96.3214
	35.2845 64.7154	6.12431 93.8756	4.48791 95.5120	0.48270 99.5172	9.05469 90.9453	3.51926 96.4807
	38.0487 61.9512	5.48446 94.5155	4.54545 95.4545		8.69781 91.3021	3.57035 96.4296
3 hrs	39.5121 60.4878	4.75319 95.2468	4.48791 95.5120		8.15005 91.8499	3.01136 96.9886
	39.8373 60.1626	4.47897 95.5210	4.48791 95.5120		7.80977 92.1902	2.65372 97.3462
	40 60	4.02193 95.9780	4.66052 95.3394		7.52759 92.4724	1.87233 98.1276
	39.0243 60.9756	3.29067 96.7093	4.48791 95.5120		6.79724 93.2027	1.5958 98.4041
4 hrs	37.8861 62.1138	2.46800 97.5319	3.97008 96.0299		6.33247 93.6675	0.98274 99.0172
	38.2113 61.7886	1.82815 98.1718	3.39470 96.6052		5.24524 94.7547	0.31255 99.6874
	37.2357 62.7642	1.00548 98.9945	2.76179 97.2382		4.66428 95.3357	
	37.0731 62.9268	0.45703 99.5429	2.35903 97.6409		3.73474 96.2652	

5 hrs	36.5853659	63.4146341	2.01380898	97.986191	3.02099759	96.9790024
	36.4227642	63.5772358	1.61104718	98.3889528	2.29894597	97.701054
	35.4471545	64.5528455	0.97813579	99.0218642	1.63499046	98.3650095
	34.9593496	65.0406504	0.46029919	99.5397008	1.07892771	98.9210723
6 hrs	34.796748	65.203252	0.0575374	99.9424626	0.65565607	99.3443439
	34.6341463	65.3658537			0.074695	99.925305
	34.4715447	65.5284553				
	34.1463415	65.8536585				
7 hrs	33.3333333	66.6666667				
	33.1707317	66.8292683				
	32.5203252	67.4796748				
	31.2195122	68.7804878				
8 hrs	30.0813008	69.9186992				
	30.0813008	69.9186992				
	29.2682927	70.7317073				
	28.2926829	71.7073171				
9 hrs	28.1300813	71.8699187				
	27.6422764	72.3577236				
	27.4796748	72.5203252				
	27.3170732	72.6829268				
10 hrs	26.6666667	73.3333333				
	26.3414634	73.6585366				
	26.3414634	73.6585366				
	25.8536585	74.1463415				
11 hrs	25.8536585	74.1463415				
	25.8536585	74.1463415				
	25.203252	74.796748				
	25.203252	74.796748				
12 hrs	25.203252	74.796748				
	25.0406504	74.9593496				
	25.0406504	74.9593496				
	24.8780488	75.1219512				
13 hrs	24.8780488	75.1219512				

	24.7154472	75.2845528
	24.7154472	75.2845528
	24.7154472	75.2845528
14 hrs	24.3902439	75.6097561
	24.0650407	75.9349593
	24.0650407	75.9349593
	23.902439	76.097561
15 hrs	22.2764228	77.7235772
	21.1382114	78.8617886
	18.0487805	81.9512195
	17.0731707	82.9268293
16 hrs	16.097561	83.902439
	15.4471545	84.5528455
	13.8211382	86.1788618
	5.69105691	94.3089431

Rangos de	60 - 94 %	93 - 99 %	95 - 99 %	97-99 %	89 - 99 %	96 - 99 %
-----------	-----------	-----------	-----------	---------	-----------	-----------

Tabla 2. Rangos de los porcentajes de inhibición comparados con el crecimiento máximo del control (+). Se muestran a partir los 15 minutos hasta las 9 horas.

Sistema Modelo	Glu-Lis 100/30 min 0.1 M	Glu-Lis 100/30 min 0.2 M	Glu-Lis 100/30 min 0.3 M	Glu-Lis 130/30 min 0.1 M	Glu-Lis 130/30 min 0.2 M	Glu-Lis 130/30 min 0.3 M
15	95.2	95.3	95.26	95.25	93.44	95.43
30	94.84	95.08	95.08	94.96	91.74	95.13
45	94.57	94.92	94.97	95.07	89.1	94.96
60	94.34	94.86	94.87	94.83	87.18	94.41
75	94.02	94.7	94.7	94.63	84.43	93.26
90	93.76	94.6	94.48	94.57	83.61	92.1
105	93.52	94.58	94.64	94.67	83.43	89.4
120	93.3	94.54	94.58	94.84	81.34	88.57
135	93.08	94.65	94.55	95.03	81.93	88.57
150	92.97	94.64	94.52	95.25	83.26	88.88
165	92.78	94.72	94.51	95.53	83.74	88.78
180	92.68	94.81	94.52	95.8	84.47	89.82
195	92.66	94.844	94.52	96.07	84.93	90.48
210	92.644	94.88	94.47	96.36	85.3	91.91
225	92.7	94.96	94.5	96.55	86.26	92.41
240	92.77	95.06	94.6	96.78	86.88	93.55
255	92.73	95.12	94.68	96.96	88.32	94.76
270	92.8	95.22	94.81	97.15	89.1	96.43
285	92.81	95.28	94.88	97.28	90.34	97.31
300	92.811	95.35	94.92	97.2	91.26	98.82
315	92.82	95.44	95	97.13	92.23	99.91
330	92.87	95.53	95.11	97	93.11	
345	92.877	95.56	95.17	96.85	93.82	
360	92.86	95.62	95.23	96.91	94.36	
375	92.86	95.68	95.33	97.07	95.13	
390	92.84	95.75	95.4	97.13	95.44	
405	92.85	95.81	95.48	97.25	96.04	
420	92.88	95.88	95.56	97.43	96.96	
435	92.87	95.95	95.65	97.62	98.16	
450	92.9	96.01	95.74	97.75	98.77	
465	92.98	96.08	95.86	97.95	99.92	
480	93.06	96.12	95.94	98.15		
495	93.06	96.22	96.04	98.44		
510	93.12	96.28	96.16	98.744		
525	93.18	96.36	96.23	98.96		
540	93.2	96.46	96.377	99.25		
Rangos de Inhibición	92-95 %	94-96 %	94-96 %	94-99 %	81-99	88-99 %

Como se observa en la figura 11 el modelo que inhibió por completo a *Staphylococcus aureus* fue el que se sometió a 130° C por 30 minutos con una concentración de 0.1 M. Esto nos indica que la capacidad antimicrobiana de los productos de la reacción de Maillard depende más de la temperatura a la cual son sometidos, que de la concentración o el tiempo de calentamiento, ya que el sistema modelo que posee la misma concentración y fue calentado igual por 30 minutos pero a una temperatura menor, presentó menor porcentaje de inhibición. Figura 12.

Asimismo todos los tratamientos a los cuales fueron sometidas las diferentes concentraciones de los PRM presentaron capacidad antimicrobiana, algunos en menor medida que otros. Figura 11. En la mayoría de los casos primero se observa como *S. aureus* comienza a crecer ligeramente, para después empezar a decaer al poco tiempo.

En la figura 15 se observa la curva de crecimiento para el sistema modelo glucosilisina 130° C/30 minutos 0.1 M y el efecto de la incubación no permite que la bacteria crezca o se desarrolle, lo cual nos permite afirmar que a esa concentración y a ese tratamiento *S. aureus* no crecerá.

En la tabla 2 se muestran los porcentajes de inhibición de la fase logarítmica del crecimiento bacteriano y se observa que los sistemas modelo más concentrados alcanzan el 99-100% más rápido. Por ejemplo si comparamos los últimos tres sistemas modelo que fueron sometidos a 130°C/30 minutos a diferentes concentraciones se aprecia que el de 0.1 M alcanza su punto máximo de inhibición a las nueve horas, en cambio el de 0.2 M a las siete horas con 45 minutos y por último el de 0.3 M a las cinco horas.

Una vez que estos sistemas modelo alcanzaron su punto máximo de inhibición los porcentajes comienzan a subir por arriba de 100% específicamente para los últimos dos que tienen concentración de 0.2 M y 0.3 M, esto se debe a la misma naturaleza de la fórmula con la que se obtuvieron los porcentajes y del comportamiento de la fase de muerte de *S. aureus*, ya que estos dos sistemas modelo alcanzaron su punto máximo de inhibición antes de la fase de muerte del control + con el que fueron comparados todos los sistemas modelo, por lo tanto al calcular el porcentaje de inhibición la Abs_m caía por debajo de la Abs inicial dando como resultado que la división en la fórmula diera mayor a 1 y con ello el resultado fuera mayor a 100. Todo esto se ve reflejado en la tabla 1 en los últimos dos sistemas modelo.

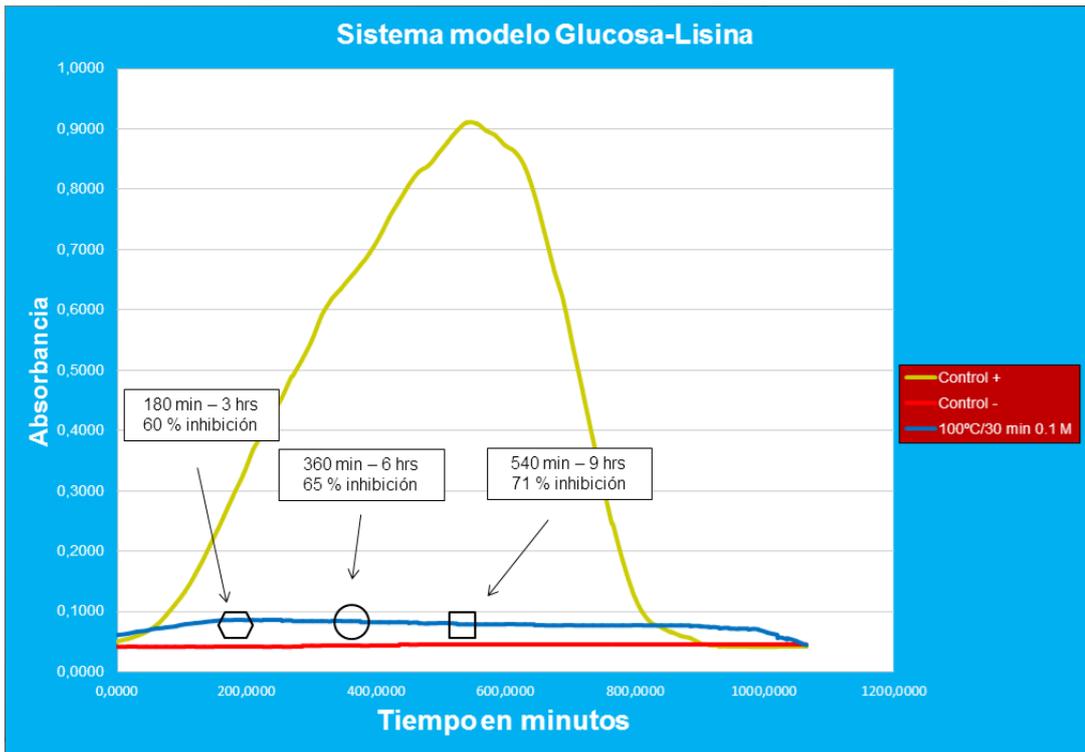


Figura 12. Porcentaje de inhibición del sistema modelo Glucosa-Lisina 0.1 M a 100°C/30 min

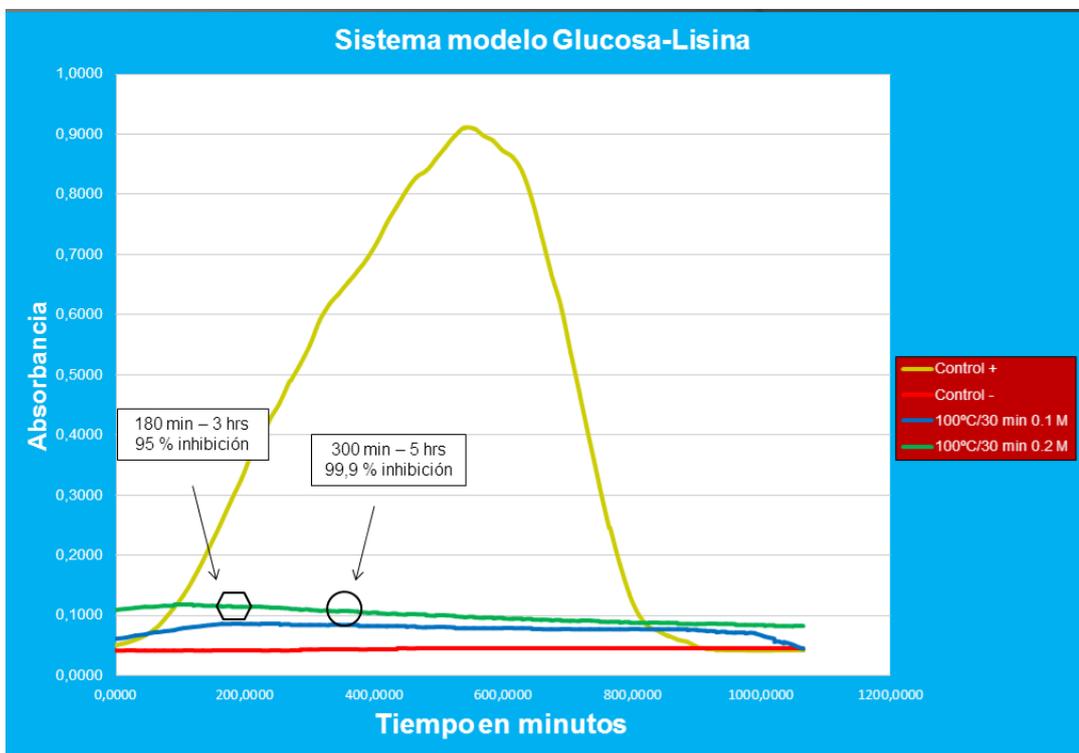


Figura 13. Porcentaje de inhibición del sistema modelo Glucosa-Lisina 0.2 M 100°C/30min

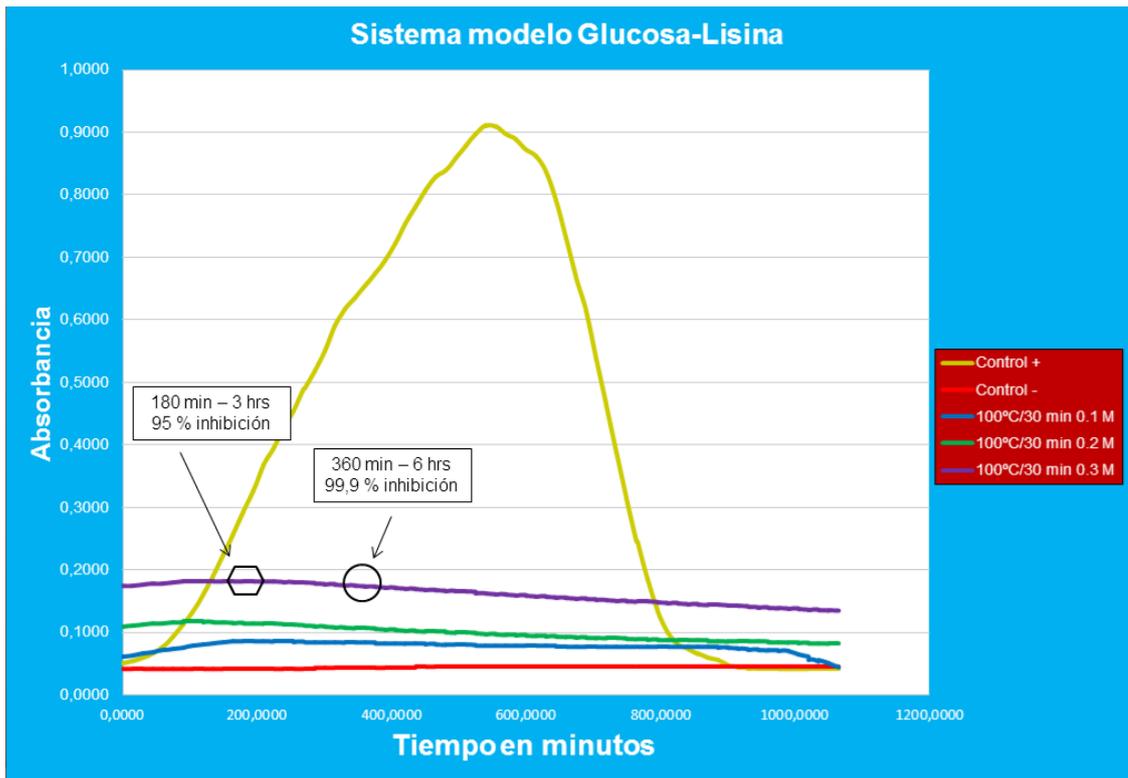


Figura 14. Porcentaje de inhibición del sistema modelo Glucosa-Lisina 0.3 M 100°C/30 m

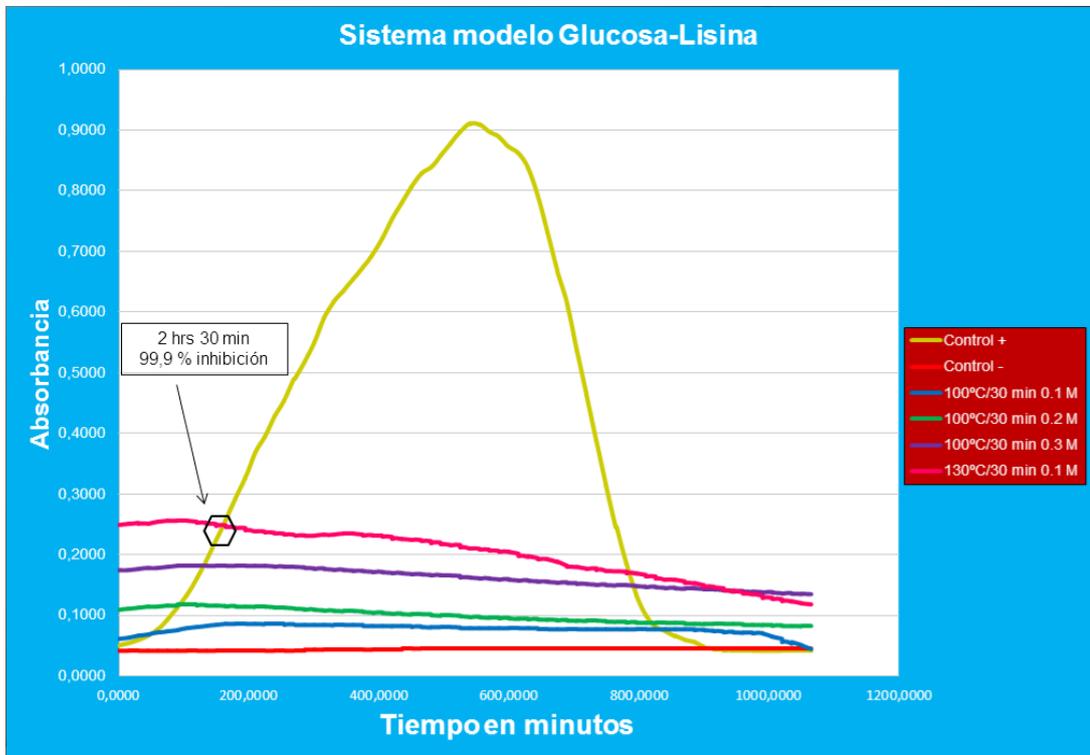


Figura 15. Porcentaje de inhibición del sistema modelo Glucosa-Lisina 0.1 M 130°C/30min

Las melanoidinas son compuestos de alto peso molecular que se forman en la etapa final de la reacción de Maillard y están ampliamente distribuidas en la comida. Presentan diferentes propiedades funcionales *in vitro* tales como antioxidante, antihipertensiva, quelación de metales y efecto antimicrobiano. (Rufian-Henares y Morales, 2006)

Aunque en este estudio no se caracterizaron dichas melanoidinas, se consideran como productos de la reacción de Maillard y por el color obtenido en nuestros sistemas modelo podríamos decir que están presentes. El mecanismo exacto de la actividad antimicrobiana de los PRM aún no es claro y continúan las investigaciones para tratar de dilucidarlo como se menciona a continuación.

Einarsson y col., en 2005 propusieron que la fracción molecular pesada del sistema modelo azúcar-aminoácido podría desarrollar la acción antimicrobiana por uniones con metales esenciales tales como fierro. Sin embargo, Einarsson refiere en otro artículo que la actividad antimicrobiana interfiere con la captación de serina, glucosa y oxígeno, inhibiendo el catabolismo enzimático de azúcares de los microorganismos o su potencial actividad antioxidante, lo cual evita que la bacteria se reproduzca ya que a falta de producción de energía, todo el mecanismo de división celular se detiene.

Recientemente un mecanismo de daño a la membrana ha sido propuesto como explicación para la actividad bactericida de las melanoidinas aisladas de café (Rufian-Henares y Morales, 2008).

Los resultados en la literatura parecen indicar que la actividad antimicrobiana de las melanoidinas podría estar relacionada con su carga aniónica y su habilidad para quelar algunos metales tales como Fe, Zn y Cu, los cuales son esenciales para el crecimiento y la supervivencia de una bacteria patógena (Wen y col., 2005).

Se han observado 3 diferentes mecanismos como posible explicación a la capacidad antimicrobiana de la reacción de Maillard, 2 de ellos podrían aplicarse en el método que se utilizó para llevar a cabo esta investigación. Recordemos que las melanoidinas (producto final de la reacción de Maillard) poseen capacidad quelante, dichas melanoidinas pueden formar complejos con iones Fe^{3+} y también pueden captar iones Mg^{2+} de la membrana celular bacteriana provocando la desorganización de la misma, sin embargo la acción letal que provoca la muerte celular está mediada por otros mecanismos diferentes que aún no se conocen. (Rufian-Henares y De la Cueva, 2009). Figura 16.

Staphylococcus aureus es un bacteria Gram (+) lo cual la hace más sensible a los antimicrobianos debido a la baja permeabilidad de su membrana, ya que esta se encuentra rodeada por una capa gruesa de peptidoglucano, la cual puede ser fácilmente reorganizada por las melanoidinas. (Morales y col., 2005)

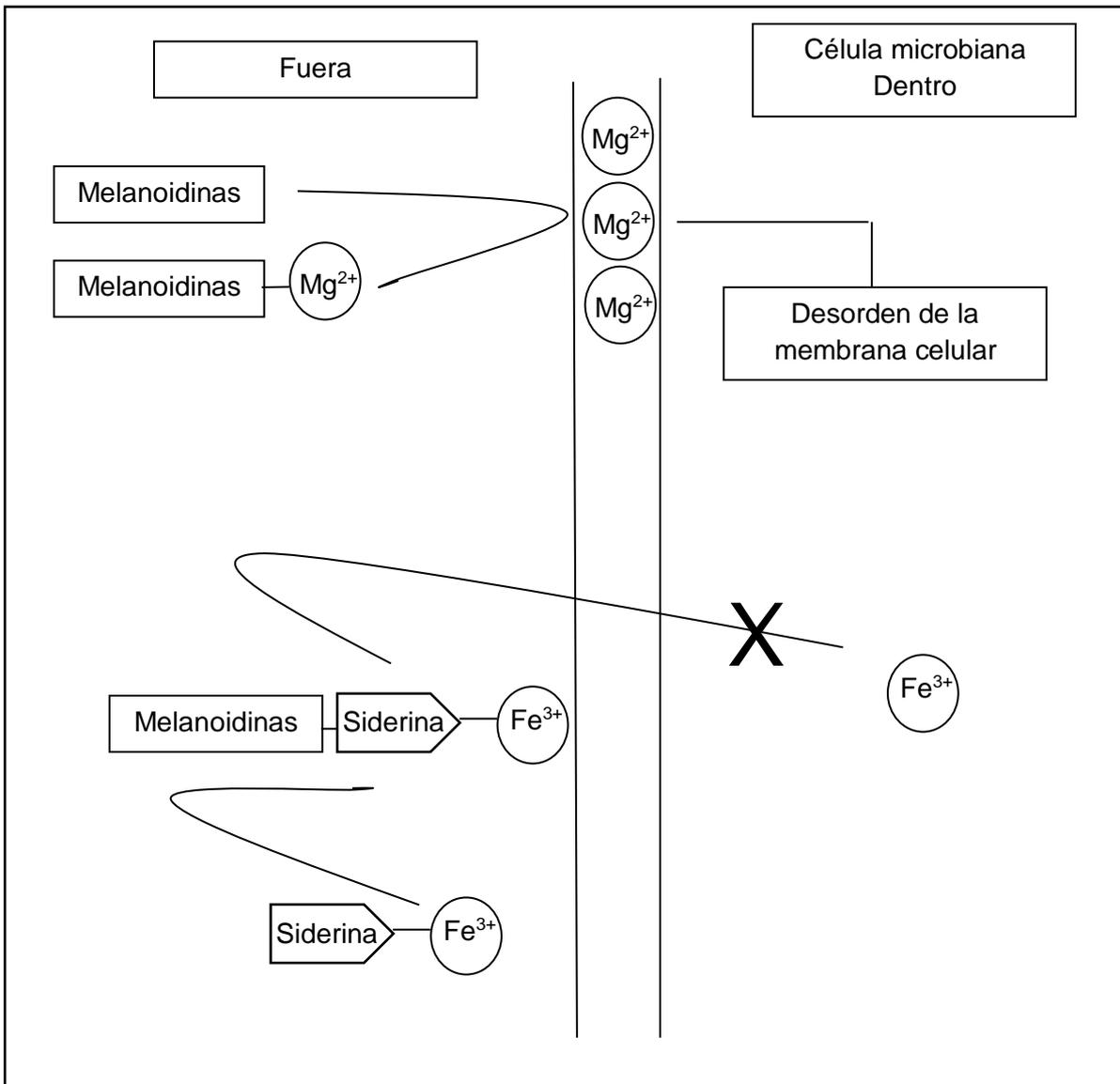


Figura 16. Mecanismo propuesto para la capacidad antimicrobiana de las melanoidinas. Fuente: Rufian-Henares JA, De la Cueva SP. 2009. Antimicrobial activity of Coffe Melanoidins a Study of Their Metal-Chelating Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 572 (2009) 432-438.

La estructura química de las melanoidinas aún no ha sido completamente dilucidada pero son parte importante de la reacción de Maillard al igual que los productos que se generan en ella. Como se observa en la figura 16 las melanoidinas pueden formar complejos con distintos metales, lo cual en el caso de las bacterias provoca su inhibición. A pesar de que no se caracterizaron los compuestos evaluados en este trabajo, la bibliografía refiere que los productos finales o coloridos son las melanoidinas.

Aún faltan muchos estudios para poder entender completamente la reacción de Maillard y todas las propiedades que presenta y que aún se investigan, pero es importante resaltar que investigaciones como esta nos acercan un poco más a conocer los diferentes mecanismos que emplean estos compuestos para ejercer las diferentes propiedades que presentan.

Estos resultados refuerzan la idea que los productos de Maillard (aun no caracterizados) solubles en agua pueden ser buenos candidatos para formar agentes naturales con capacidad antimicrobiana en los procesos térmicos los alimentos.

CONCLUSIONES

- ❖ Se comprobó mediante el método de microdilución en placa que los productos de la reacción de Maillard poseen capacidad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.
- ❖ Se observó la tendencia de inhibición entre 60 y 99% que todos los sistemas modelo bajo las concentraciones estudiadas en este trabajo ejercen sobre *Staphylococcus aureus*.
- ❖ Se comprobó que la capacidad antimicrobiana de los productos de la reacción de Maillard es observable en placas de agar a partir de concentraciones de 0.4 M.
- ❖ Se observó que a mayor concentración la inhibición era más evidente y alcanzaba su punto máximo en menor tiempo.
- ❖ Los productos de la reacción de Maillard debido a la variedad de propiedades que presentan, y con base en los resultados obtenidos en este trabajo de investigación cobran vital importancia para su empleo en alimentos funcionales o inocuidad de los alimentos.
- ❖ Los resultados obtenidos en esta investigación refuerzan la idea que los productos de Maillard (aun no caracterizados) solubles en agua pueden ser buenos candidatos para formar agentes naturales con capacidad antimicrobiana en los procesos térmicos los alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera M, Reynoso R, Gomez CA, Uresti RM, Ramírez JA. 2014. Los alimentos en México y su relación con la salud. México, D.F. Taller de Edición de Plaza y Valdés. 656 p
2. Ashwell M. Conceptos sobre Alimentos Funcionales. ILSI Europe Concise Monograph Series, ILSI Press 2005.
3. Badui, S. 2006. Química de los Alimentos. 4ª ed. México. Pearson Educación. 736 p.
4. Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. Food Chemistry. 4ª ed. Springer. 1070 p.
5. Borrelli R., Fogliano V., Monti S., Ames J. Characterization of melanoidins from a glucose-glycine model system. Food Science and Technology Research. 215 (4) 210-215.
6. Castañón CA, 2012. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. Evidencia Médica e investigación en salud.
7. Einarsson H, Snigg BG, Eriksson C. 2005. Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 31 (1) 1043-1047.
8. Koneman EW. 2008. Koneman Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed. Buenos Aires. Medica Panamericana. 1696 p.
9. Forbes, B. 2009. Bailey & Scott; diagnóstico microbiológico. 12ª ed. Buenos Aires. Medica Panamericana. 1160 p.
10. Gustafson J, Muthaiyan A, Dupre J, Ricke S. 2014. *Staphylococcus aureus and understanding the factors that impact enterotoxin production in food: a review. Food Control xxx (201) 1-14.*

11. Hauser C, Müller U, Sauer T, Augner K, Pischetsrieder M. 2013. Maillard reaction products as antimicrobial components for packaging films. *Food Chemistry* 145 (2) 608-613.
12. Kolida S, Tuohy K, Gibson G. Prebiotic effects of Inulin and Oligofructosa. *Br J Nutr.* 2002 87, Suppl. 2, S193-S197.
13. Li X, Shi X, Wang MA, Du YM. 2011. Xylan chitosan conjugate a potential food preservative. *Food Chemistry.* 126 (2) 20-525
14. Manzocco L., Calligaris D., Mastrocola M., Lerici C. 2000. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Food Science and Technology Research.* 115 (4) 340-346.
15. Martins S., Jongen W., Boekel M. Unravelling the Maillard reaction network by multiresponse kinetic modelling. *Food Science and Technology Research.* 117 (3) 364-373.
16. Melchor C, 2005. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, situación actual en México. *Salud Pública de México* 47 (4) 391-386
17. Molina J, Manjarrez ME, Tay J. 2010. *Microbiología: Bacteriología y virología.* 1ª ed. México, D.F. Méndez Editores. 912 p.
18. Mupalla SR, Sonavale R, Chawla SP, Sharma A. 2012. Functional properties of nisin-carbohydrate conjugates formed by radiation induced Maillard reaction. *Radiation Physics and Chemistry* 81 (6) 1917-1922.
19. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaüer MA. 2008. *Microbiología Medica.* 5ta ed. Madrid, España. ELSEIVIER. 962 p
20. Romero Cabello, Raúl. 2007. *Microbiología y Parasitología Humana.* 3ª ed. México. Médica Panamericana. 1789 p.
21. Rufian-Henares JA, De la Cueva SP. 2009. Antimicrobial activity of Coffee Melanoidins A Study of Their Metal-Chelating Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 572 (2) 432-438.

22. Rufian-Henares JA, Morales FJ. 2006. A new application of a comercial microtiter plate-based assay for assessing the antimicrobial activity of Maillard reaction products. *Food Research International*. 39, 33-39.
23. Rufian-Henares JA, Morales FJ. 2008. Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (8) 2357-2362.
24. Spicer J, 2009. *Microbiología Clínica y enfermedades infecciosas*. 2ª Ed. Barcelona, España. ELSEVIER. 251 p.
25. Tay J. 2012. *Microbiología y parasitología medica de Tay*. 4ª ed. México, D.F. Méndez Editores. 984 p.
26. Velázquez ME, 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente. *Salud Pública de México* 47 (25) 381-387
27. Vhangani L, Wyk J. 2012. Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose-lysine and ribose-lysine model systems. *Food Chemistry* 137 (21) 92-98.
28. Wang H, Qian H, Yao W. 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry* 128 (11) 573-584
29. Wen X, Enokizo A, Hattori H, Kobayashi S, Murata M. 2005. Effect of roasting on properties of the Zinc-Chelating substance in coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (5) 2684-2689
30. Wu S, Hu J, Wei L, Du Y, Shi X, Zhang L. 2013. Antioxidant and antimicrobial activity of Maillard reaction products from xylan with chitosan/chito oligomer/glucosamine hydrochloride/taurine models system. *Food Chemistry* 148 (14) 198-203.
31. Wu S, Du Y, Hu Y, Shi X, Zhang L. 2012. Antioxidant and antimicrobial activity of xylan-chito oligomer-zinc complex. *Food Chemistry* 138 (3) 1312-1319.

32. Zhu KX, Li J, Li, M, Guo XN, Peng W, Zhou HM. 2012. Functional properties of chitosan-xylose Maillard reaction products and their to semi-dried noodle. *Carbohydrate Polymers* 92 (3) 1972-1977.

ANEXOS

Lectura	tiempo medio [min]	control +	control -	100°C/ 30 min 0.1 M	100°C/ 30 min 0.2 M	100°C/ 30 min 0.3 M	130°C/ 30 min 0.1 M	130°C/ 30 min 0.2 M	130°C/ 30 min 0.3 M
1	0,0000 0	0,0508	0,0417	0,0615	0,1094	0,1738	0,2486	1,2049	1,6637
2	15,000 0	0,0536	0,0416	0,0631	0,1101	0,1748	0,2497	1,2223	1,6632
3	30,000 0	0,0584	0,0417	0,0662	0,1119	0,1763	0,2522	1,2375	1,6657 5
4	45,000 0	0,0658	0,0418	0,0685	0,1133	0,1772	0,2511	1,2612	1,6672 5
5	60,000 0	0,0765	0,0416	0,0708	0,1140	0,1783	0,2535	1,2786	1,6724
6	75,000 0	0,0933	0,0419	0,0734	0,1152	0,1796	0,2550	1,3031	1,6824 5
7	90,000 0	0,1124	0,0419	0,0757	0,1161	0,1815	0,2555	1,3105	1,6929
8	105,00 00	0,1338	0,0416	0,0782	0,1165	0,1804	0,2549	1,3124	1,7175
9	120,00 00	0,1591	0,0417	0,0801	0,1168	0,1808	0,2533	1,3311	1,7248 5
10	135,00 00	0,1903	0,0416	0,0821	0,1159	0,1812	0,2517	1,3259	1,7249
11	150,00 00	0,2236	0,0415	0,0832	0,1161	0,1816	0,2498	1,3140	1,7222 5
12	165,00 00	0,2582	0,0415	0,0849	0,1154	0,1817	0,2473	1,3097	1,7231
13	180,00 00	0,2931	0,0415	0,0858	0,1146	0,1816	0,2449	1,3031	1,7138
14	195,00 00	0,3259	0,0415	0,0860	0,1143	0,1816	0,2424	1,2990	1,7078 5
15	210,00 00	0,3664	0,0416	0,0861	0,1138	0,1819	0,2397	1,2956	1,6948 5
16	225,00 00	0,3934	0,0417	0,0855	0,1130	0,1816	0,2379	1,2868	1,6902 5
17	240,00 00	0,4274	0,0417	0,0848	0,1121	0,1807	0,2358	1,2812	1,6800 5
18	255,00 00	0,4546	0,0419	0,0850	0,1114	0,1797	0,2340	1,2681	1,6689
19	270,00 00	0,4895	0,0419	0,0844	0,1105	0,1786	0,2323	1,2611	1,6539
20	285,00 00	0,5181	0,0419	0,0843	0,1099	0,1779	0,2311	1,2499	1,6459 5
21	300,00 00	0,5493	0,0422	0,0840	0,1090	0,1773	0,2316	1,2413	1,6320 5
22	315,00 00	0,5899	0,0422	0,0839	0,1082	0,1766	0,2322	1,2326	1,6195
23	330,00 00	0,6161	0,0423	0,0833	0,1073	0,1755	0,2333	1,2246	1,6084 5
24	345,00 00	0,6350	0,0426	0,0830	0,1067	0,1746	0,2343	1,2179	1,5957 5
25	360,00 00	0,6535	0,0428	0,0829	0,1060	0,1739	0,2336	1,2128	1,5833

26	375,00 00	0,6733	0,0429	0,0828	0,1053	0,1729	0,2320	1,2058	1,5723
27	390,00 00	0,6955	0,0432	0,0827	0,1044	0,1720	0,2312	1,2027	1,5610 5
28	405,00 00	0,7220	0,0433	0,0825	0,1038	0,1711	0,2300	1,1972	1,5513 5
29	420,00 00	0,7539	0,0435	0,0820	0,1029	0,1702	0,2282	1,1887	1,5359 5
30	435,00 00	0,7801	0,0437	0,0819	0,1021	0,1692	0,2263	1,1777	1,5260 5
31	450,00 00	0,8069	0,0439	0,0815	0,1014	0,1682	0,2249	1,1720	1,5111 5
32	465,00 00	0,8283	0,0439	0,0807	0,1007	0,1671	0,2231	1,1617	1,496
33	480,00 00	0,8384	0,0439	0,0800	0,1004	0,1664	0,2213	1,1528	1,482
34	495,00 00	0,8570	0,0439	0,0800	0,0995	0,1655	0,2187	1,1413	1,4687 5
35	510,00 00	0,8781	0,0439	0,0795	0,0989	0,1644	0,2160	1,1311	1,4542 5
36	525,00 00	0,8964	0,0439	0,0789	0,0982	0,1638	0,2140	1,1242	1,441
37	540,00 00	0,9113	0,0439	0,0788	0,0973	0,1625	0,2114	1,1158	1,4256
38	555,00 00	0,9089	0,0439	0,0785	0,0968	0,1615	0,2096	1,1127	1,4049 5
39	570,00 00	0,8964	0,0439	0,0784	0,0960	0,1605	0,2080	1,1027	1,3931 5
40	585,00 00	0,8881	0,0439	0,0783	0,0957	0,1595	0,2059	1,1034	1,3747
41	600,00 00	0,8717	0,0439	0,0779	0,0951	0,1589	0,2044	1,1001	1,3583
42	615,00 00	0,8610	0,0439	0,0777	0,0943	0,1579	0,2014	1,0917	1,3394 5
43	630,00 00	0,8365	0,0439	0,0777	0,0940	0,1571	0,1966	1,0814	1,3242
44	645,00 00	0,7903	0,0439	0,0774	0,0932	0,1564	0,1934	1,0697	1,3058
45	660,00 00	0,7298	0,0439	0,0774	0,0927	0,1553	0,1922	1,0608	1,2891 5
46	675,00 00	0,6670	0,0439	0,0774	0,0921	0,1542	0,1878	1,0473	1,2704 5
47	690,00 00	0,6127	0,0439	0,0770	0,0915	0,1536	0,1810	1,0365	1,2537
48	705,00 00	0,5375	0,0439	0,0770	0,0910	0,1532	0,1788	1,0219	1,2347
49	720,00 00	0,4620	0,0439	0,0770	0,0903	0,1518	0,1761	1,0097	1,2171 5
50	735,00 00	0,3884	0,0439	0,0769	0,0900	0,1509	0,1769	0,9949	1,1956 5
51	750,00 00	0,3144	0,0439	0,0769	0,0893	0,1501	0,1745	0,9854	1,177
52	765,00 00	0,2450	0,0439	0,0768	0,0888	0,1495	0,1723	0,9739	1,1558 5
53	780,00 00	0,1842	0,0439	0,0768	0,0885	0,1486	0,1721	0,9609	1,1349 5
54	795,00 00	0,1337	0,0439	0,0767	0,0880	0,1476	0,1682	0,9406	1,1136
55	810,00	0,0996	0,0439	0,0767	0,0876	0,1469	0,1656	0,9267	1,0876

	00								
56	825,00 00	0,0801	0,0439	0,0767	0,0871	0,1461	0,1626	0,9158	1,0654 5
57	840,00 00	0,0724	0,0439	0,0765	0,0866	0,1453	0,1598	0,9010	1,0407 5
58	855,00 00	0,0662	0,0439	0,0763	0,0864	0,1447	0,1577	0,8859	1,0172 5
59	870,00 00	0,0595	0,0439	0,0763	0,0860	0,1439	0,1552	0,8695	0,9906 5
60	885,00 00	0,0546	0,0439	0,0762	0,0859	0,1433	0,1525	0,8543	0,9630 5
61	900,00 00	0,0487	0,0439	0,0752	0,0853	0,1423	0,1487	0,8341	0,9341 5
62	915,00 00	0,0446	0,0439	0,0745	0,0852	0,1415	0,1461	0,8120	0,905
63	930,00 00	0,0425	0,0439	0,0726	0,0847	0,1408	0,1431	0,7916	0,8737 5
64	945,00 00	0,0410	0,0439	0,0720	0,0847	0,1403	0,1402	0,7740	0,8422
65	960,00 00	0,0404	0,0439	0,0714	0,0842	0,1395	0,1374	0,7559	0,8083
66	975,00 00	0,0413	0,0439	0,0710	0,0840	0,1389	0,1346	0,7367	0,7731
67	990,00 00	0,0410	0,0439	0,0700	0,0835	0,1381	0,1314	0,7170	0,7360 5
68	1005,0 000	0,0408	0,0439	0,0650	0,0833	0,1375	0,1282	0,6961	0,6975
69	1020,0 000	0,0407	0,0439	0,0600	0,0827	0,1366	0,1264	0,6745	0,6552 5
70	1035,0 000	0,0405	0,0439	0,0548	0,0824	0,1358	0,1224	0,6527	0,6116
71	1050,0 000	0,0405	0,0439	0,0500	0,0819	0,1353	0,1194	0,6311	0,5764 5
72	1065,0 000	0,0405	0,0439	0,0421	0,0813	0,1346	0,1165	0,6084	0,5522