

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS



**APLICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia
berlandieri* Schauer) COMO ANTIMICROBIANO CONTRA
PATOGENOS ANAEROBIOS ALIMENTARIOS**

POR:

SARAHÍ DEL CARMEN RANGEL ORTEGA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Mayo de 2007

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS

**Aplicación del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*
Schauer) como antimicrobiano contra patógenos anaerobios
alimentarios**

TESIS

Presentada por:

SARAHÍ DEL CARMEN RANGEL ORTEGA

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial
para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

APROBADA

M.C. María Hernández González
Presidente

M.C. Ramón Silva Vázquez
Co asesor

Dr. Ramiro López Trujillo
Vocal

M.C. Xochitl Ruelas Chacón
Vocal suplente

Ing. José Rodolfo Peña Oranday
Coordinador de la División de Ciencia Animal

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. MÉXICO. MAYO DE 2007

DEDICATORIAS

A *Dios Padre* por darme la maravillosa oportunidad de vivir y poder culminar una etapa más de mi vida y por ser mi principal refugio y fortaleza.

A mi padre, *José Rangel Vázquez* quien siempre ha manifestado su apoyo y amor incondicional. Te quiero papi.

A mi madre, *María del Carmen Ortega Carrillo* por ser mi principal inspiración, por estar en todo momento pendiente de mí y demostrarme su gran amor en cada consejo. Te amo, eres la mejor de las madres “Este logro también es tuyo”.

A mis hermanos

José Orlando, quien es mi más grande ejemplo de fuerza de voluntad y *Yanira Monteserrat* por ser la alegría de mi vida, gracias por cada una de tus locuras y ocurrencias. Los quiero mucho hermanitos.

A mi abuelita *María Isabel Carrillo Laborico*, por darme el ejemplo de la fortaleza, y por ser la persona que siempre tiene tiempo para escuchar mis aventuras. Te quiero abuelita.

A mi gran amiga *Ana Aurelia Martínez Estrella †*, por todo lo bueno que dejaste en mi, por ser esa persona alegre llena de detalles inolvidables, gracias por tantos maravillosos momentos que vivimos. Amiga hasta pronto.

A todos mis *tíos y primos* que forman parte de mi familia, gracias por todo su apoyo y amistad.

A *Breznev de la Rosa Osorio*, por ser esa persona que siempre manifestó apoyo, comprensión y amor incondicional en cualquier circunstancia. Gracias por enseñarme a creer en la “Belleza de mis sueños”.

AGRADECIMIENTOS

A mi *ALMA MATER* por brindarme un hogar, la oportunidad de obtener una formación profesional así como inolvidables momentos vividos.

A mis Amigos y hermanos con quienes viví momentos inolvidables, gracias por su apoyo y amistad incondicional ustedes fueron mi familia en esta etapa de mi vida: *Rosy, Liz, Betsy, Manolo, Brez, Oscar, Pancho, Mario, Enoc, Alejandrino, Beto “Chucha”, Analy, Vale y Toñito.*

A mis amigos de siempre que a pesar de la distancia siempre estuvieron cuando mas los necesite; *Lupita, Luís Fernando, Claudia, Elizelda, Norma, Irma, Raquel.* Los quiero.

A mis amigos y compañeros de generación: *Gris, Gladis, Conrra, José Luís, Polo, Gama, Nubia, Nuyen, Roberto, Luís Alberto, Rene, Mimi, Gaby, Belén, Fidel y Chacha.*

A las familias *Fraile, Escude Sánchez y Olmos Miranda* por su hospitalidad y sincera amistad.

A todos mis maestros que contribuyeron en mi formación profesional: *Dr. Ramón García Castillo, Lic. Laura O. Fuentes, M. Ed. Ma. De Lourdes Morales, Ing. Gabino Herrera, QFB. Carmen Julia García, MC. Heliodoro de la Garza Toledo, MC. Oscar N. Reboloso Padilla, MC. Patricia Dorantes* especialmente a la *Mc.Xochilt Ruelas Chacón* por brindarme su apoyo y amistad en todo momento , a l *Mc. Ramón Silva Vázquez* por su valiosa colaboración en la realización de este proyecto, al *Dr. Ramiro López Trujillo* por su gran ayuda para la realización de esta investigación , así como su amistad manifestada y a la *MC. Maria Hernández Gonzáles* por dirigir esta investigación objetivamente, por la gran amistad y apoyo que me brindo a lo largo de la carrera, pero sobre todo por darme la oportunidad de trabajar en una de mis más grandes pasiones “la Microbiología”.

A *Carlitos, Cristy, Diana, Laura y Mildred,* por el apoyo brindado en la marcha de este trabajo y, por su amistad manifestada.

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE GENERAL	v
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
I INTRODUCCION	1
1.1 JUSIFICACION	4
1.2 OBJETIVOS	5
1.2.1 Objetivo general.....	5
1.2.2 Objetivos específicos.....	5
1.3 HIPÓTESIS	5
II REVISION DE LITERATURA	6
2.1 Antimicrobianos	6
2.1.1 Antimicrobianos sintéticos.....	7
2.1.1.1 Ácido benzóico y benzoatos.....	8
2.1.1.2 Ácido sórbico y sorbatos.....	8
2.1.1.3 Sulfitos.....	8
2.1.1.4 Nitritos y nitratos.....	9
2.1.1.5 Conservadores para uso en la industria alimentaría autorizados por la Unión Europea.....	10
2.1.2 Antimicrobianos naturales.....	12
2.2 Orégano	14
2.2.1 Generalidades.....	14
2.2.2 Clasificación taxonómica.....	15
2.2.3 Características ecológicas.....	16
2.2.4 Clima y suelo.....	17
2.2.5 Usos y composición química.....	18
2.2.6 Método de extracción.....	20
2.2.7 Importancia económica.....	21

2.3	Conservación de alimentos	23
2.3.1	Alimentos envasados al alto vacío.....	24
2.3.2	Alimentos enlatados.....	25
2.4	Microorganismos en alimentos de acidez baja y media	27
2.4.1	Anaerobios esporulados.....	27
2.4.2	<i>Clostridium Botulinum</i>	31
2.4.3	<i>Clostridium perfringes</i>	32
2.4.4	<i>Bacillus cereus</i>	33
III	MATERIALES Y METODOS	35
3.1	ETAPA1. Viabilización e identificación de cepas anaerobias	35
3.2	ETAPA 2. Valoración cualitativa del efecto antimicrobiano	36
3.2.1	Extracción, fraccionamiento y caracterización del aceite esencial de orégano.....	36
3.2.2	Preparación de medio de cultivo y conteo de crecimiento bacteriano.....	37
3.3	ETAPA 3. Valoración cuantitativa del efecto antimicrobiano	38
3.3.1	Preparación de inóculo de acuerdo a la escala de Mc Farland modificada.....	38
3.3.2	Valoración de la actividad antimicrobiana.....	39
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1	ETAPA1. Viabilización e identificación de cepas anaerobias	41
4.2	ETAPA 2. Valoración cualitativa del efecto antimicrobiano	42
4.2.1	Valoración cualitativa del efecto antimicrobiano sobre <i>Cl. perfringes</i>	42
4.2.2	Valoración cualitativa del efecto antimicrobiano sobre <i>B. cereus</i>	48
4.3	ETAPA 3. Valoración cuantitativa del efecto antimicrobiano	55
4.3.1	Valoración cuantitativa del efecto antimicrobiano sobre <i>Cl. perfringes</i>	55
4.3.2	Valoración cuantitativa del efecto antimicrobiano sobre <i>B. cereus</i> ...	60
V	CONCLUSIONES	64
VI	LITERATURA CITADA	65
VII	ANEXOS	71

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Título	Pág.
1	Lista de conservadores aprobados por la Unión Europea.....	10
2	Ventajas y desventajas de conservadores químicos y naturales.....	11
3	Sustancias con actividad antimicrobiana provenientes de plantas.....	13
4	Componentes químicos del orégano que determinan su calidad comercial. Análisis comparativo con dos especies extranjeras.....	15
5	Taxonomía del orégano de Chihuahua.....	16
6	Composición química del orégano.....	18
7	Clasificación de los alimentos según su acidez y grupos de microorganismos causantes de alteraciones en alimentos enlatados.....	26
8	Antagonistas de bacterias patógenas de importancia en los alimentos....	29
9	Asignación del crecimiento microbiano.....	38
10	Absorbancia respecto a escala Mc Farland.....	39
11	Asignación del crecimiento para <i>Cl. perfringes</i>	42
12	Asignación del crecimiento para <i>B. cereus</i>	48
13	Medias de crecimiento de <i>Cl. perfringes</i> en función a turbidez unidades de absorbancia a 450 nm.....	56
14	Medias de crecimiento de <i>B. cereus</i> en función a turbidez en unidades de absorbancia a 450 nm.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Pág.
1	<i>Lippia berlandieri</i> Schauer.....	17
2	Estructura química de los principales componentes en el orégano.....	19
3	Estructura química de los principales flavonoides en el orégano.....	20
4	Tinción de Gram de <i>Cl. perfringes</i>	41
5	Tinción de Gram de <i>B. cereus</i>	41
6	Distribución del crecimiento de <i>Cl. perfringes</i> (%) por concentración.....	43
7	Distribución del crecimiento de <i>Cl. perfringes</i> (%) por fracción incluyendo el testigo (0.00%).....	44
8	Distribución del crecimiento de <i>Cl. perfringes</i> (%) por fracción excluyendo el testigo (0.00%).....	45
9	Distribución del crecimiento de <i>Cl. perfringes</i> (%) por tiempo (hr) incluyendo el testigo (0.00%).....	46
10	Distribución del crecimiento de <i>Cl. perfringes</i> (%) por tiempo (hr) excluyendo el testigo (0.00%).....	47
11	Distribución del crecimiento microbiano de <i>B. cereus</i> (%) por concentración.....	49
12	Distribución del crecimiento de <i>B. cereus</i> (%) en cada fracción incluyendo el testigo (0.00%).	50
13	Distribución del crecimiento de <i>B. cereus</i> (%) en cada fracción excluyendo el testigo (0.00%).....	51
14	Distribución del crecimiento de <i>B. cereus</i> (%) por tiempo (hr) incluyendo el testigo (0.00%).....	52

15	Distribución del crecimiento de <i>B. cereus</i> (%) por tiempo (hr) excluyendo el testigo (0.00%).....	53
16	Distribución de datos del crecimiento cualitativo por microorganismo.....	54
17	Crecimiento de <i>Cl. Perfringes</i> en función de la fracción y la concentración (%).....	57
18	Crecimiento de <i>Cl. perfringes</i> a diferente concentración (%) en función del tiempo.....	58
19	Crecimiento de <i>Cl. perfringes</i> a diferente concentración (%) en función del tiempo (hr) excluyendo el testigo (0.00%).....	59
20	Crecimiento de <i>B. cereus</i> en función de la fracción y concentración (%).....	61
21	Crecimiento de <i>B. cereus</i> a diferente concentración (%) en función del tiempo (hr).....	62
22	Crecimiento de <i>B.cereus</i> a diferente concentración (%) en función del tiempo (hr) excluyendo el testigo (0.00%)... ..	63

RESUMEN

La conservación de alimentos es en la actualidad una práctica necesaria para eliminar microorganismos patógenos de los alimentos que alteran la salud de los consumidores. El propósito del presente trabajo fue determinar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano contra dos patógenos anaerobios de importancia alimentaria: *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*. La evaluación se realizó con tres fracciones de aceite de orégano a diferentes concentraciones de timol y carvacrol (fracción 1 carvacrol 38.25%, fracción 2 timol 77.40% y fracción 3 27.67% timol y 11.31% carvacrol) mediante dos estudios: un cualitativo donde al crecimiento microbiano le fueron asignadas diferentes escalas de crecimiento, las observaciones se realizaron por triplicado en placas con agar Schaedler a diferentes concentraciones de las 3 fracciones del aceite (0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.5 %) con monitoreos a las 0, 12, 24, 36, 48 y 60 hr. Y un estudio cuantitativo donde el crecimiento se midió por triplicado, mediante espectrofotometría en unidades de absorbancia a 450 nm utilizando tubos con caldo TSB a las mismas concentraciones y monitoreos antes mencionados.

En el estudio cualitativo se observó que a *B. cereus* fue el microorganismo que presentó mayor sensibilidad al aceite esencial de orégano, mientras que en el estudio cuantitativo el mejor efecto inhibitorio fue con la fracción de alto timol a las concentraciones de 0.10, 0.15, 0.20, 0.50% para los dos microorganismos.

I INTRODUCCION

Todos los alimentos son productos perecederos, se descomponen poco después de la cosecha, la vendimia o la matanza. Alguna descomposición se da por microorganismos y se acompaña de una producción de sustancias venenosas, otras descomposiciones producen pérdida en el valor nutrimental de los alimentos. El hombre ha controlado algunas de estas destrucciones naturales y retiene los frutos de la naturaleza como su suministro de alimento. La humanidad ha aprovechado la tecnología con este fin.

La descomposición es un fenómeno natural de los alimentos, los tejidos vivos tienen resistencia al ataque microbiano. Los tejidos vegetales o animales muertos son destruidos de diversas formas por fuerzas biológicas. Existe competencia entre el hombre, los animales y los microorganismos por el consumo de nutrientes; el prevenir la descomposición de los tejidos vegetales y animales implica un doble esfuerzo, por una parte conservar el alimento para su uso y por otra excluir las diversas formas de contaminación del alimento para su consumo en una condición máxima de nutrientes para contribuir a una buena salud (Desrosier, 1987).

Los alimentos se descomponen principalmente debido a los microorganismos, a la acción de las enzimas propias del alimento, y a la degradación química y desecación. La descomposición de un alimento depende de la composición, estructura, tipo de microorganismo involucrado y condiciones de almacenamiento del mismo.

Los microorganismos al infestar los alimentos causan su descomposición, en algunos casos puede ser deseable (ejemplo el yogurt); pero los que causan daño a la salud humana son los llamados “patógenos”.

Las infecciones alimentarias son consecuencia de la presencia en alimentos de microorganismos patógenos, que mediante la ingestión son capaces de causar enfermedad por la invasión del huésped o por liberación de sustancias tóxicas, resultantes del crecimiento en el tracto intestinal. Las intoxicaciones alimentarias son consecuencia de la absorción intestinal de toxinas ya presentes en los alimentos antes de su ingestión, (Desrosier, 1987) como consecuencia del crecimiento y metabolismo en dichos sustratos de ciertos microorganismos, por todo lo anterior, este tipo de microorganismos tienen un gran impacto en lo que respecta a la salud pública.

En los Estados Unidos las infecciones e intoxicaciones alimentarias afectan a casi 80 millones de personas, causando 9, 000 muertes y pérdidas a la industria estimadas en 5, 000 millones de dólares. En África y América Latina, se ha estimado que se presentan anualmente más de 1,000 millones de casos por intoxicación, provocando más de 5 millones de muertes; la mayoría de los casos son niños menores de 5 años (Silva, 2003).

Las infecciones o intoxicaciones originadas por el consumo de alimentos se atribuye a la presencia de ciertos microorganismos tales como *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, géneros de *Salmonella* y *Staphilococos*, *Bacillus cereus* y *Vibrio parahaemolyticus*, así como *E. coli* (Anónimo, 2007).

El contenido de humedad, temperatura, concentración de oxígeno, los nutrientes disponibles, grado de contaminación con los microorganismos y la

presencia de inhibidores de crecimiento son factores que controlan la descomposición microbiana en un alimento (Desrosier, 1987).

Con la finalidad de estabilizar el alimento en ocasiones se les agregan sustancias para impedir el desarrollo microbiano, tales sustancias son llamadas conservadores y pueden ser de origen natural o sintéticos, sin embargo el consumo de estos últimos ha generado polémica por el dilema de complicaciones cancerígenas y de toxicidad que se les atribuyen, de ahí que su aplicación en la conservación de alimentos no es bien aceptada por los consumidores. Para la industria alimentaria es una necesidad la búsqueda de nuevas alternativas de conservación que aseguren alimentos minimamente procesados, sanos y seguros.

En investigaciones actuales de la industria farmacéutica y alimentaria, se han encontrado sustancias con actividad antimicrobiana de forma natural en muchos alimentos, entre las plantas que destacan por sus propiedades antimicrobianas son: el clavo, cebolla, mostaza, ajo, cilantro, vainilla y orégano (Campomanes, 2003).

Estas plantas contienen compuestos fenólicos inhibidores de bacterias, virus y parásitos, y se encuentran en la parte oleaginosa de la planta por lo que es necesaria la extracción de su aceite esencial. Esta investigación se fundamenta en dichos compuestos contenidos en el aceite esencial de orégano en forma abundante, y por su probada capacidad de inhibición contra ciertos microorganismos corruptores de alimentos como una expectativa de inhibición de patógenos anaerobios alimentarios, a partir de sustancias de origen natural demandadas por los consumidores actuales.

1.1 JUSTIFICACIÓN

La presencia de microorganismos patógenos en alimentos ha propiciado importantes alteraciones en la salud de los consumidores, ocasionando infecciones o intoxicaciones que obligan a la industria alimentaria a buscar nuevas alternativas que eviten la presencia de dichos microorganismos, asociado a que en la actualidad existe la tendencia de una alimentación de calidad mediante el consumo de productos agradables, nutritivos, inocuos, frescos y de fácil preparación. En consecuencia aumenta la demanda de conservadores naturales debido a la incertidumbre de los efectos que sufre el organismo con el consumo de conservadores elaborados mediante síntesis química (Hernández, 2003).

Una de las fuentes naturales de compuestos antimicrobianos son las especias, cuyas propiedades como conservadores son conocidas desde hace siglos. Existen alrededor de 1,300 tipos de plantas como fuentes potenciales de antimicrobianos, cuyos derivados pueden incluir sustancias como fitoalexinas, isotiocianatos, alicinas, pigmentos y compuestos fenólicos entre otros (Silva, 2003).

En México el uso del orégano es exclusivo como condimento alimenticio, y en poca medida medicinal; estudios realizados por la Universidad Autónoma de Chihuahua, México, han descrito las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de orégano como fungistático y antibacterial atacando a la mayoría de bacterias patógenas (Silva, 2003).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Demostrar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) sobre microorganismos anaerobios corruptores de alimentos (*Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*).

1.2.2 Objetivos específicos

- Obtener, cultivar y caracterizar, microscópicamente a cada especie de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*.
- Determinar cualitativamente la actividad antimicrobiana de cada fracción del aceite esencial de orégano sobre microorganismos anaerobios de importancia alimentaria (géneros *Clostridium* y *Bacillus*).
- Determinar cuantitativamente la actividad antimicrobiana de cada fracción de aceite esencial de orégano para las especies de los géneros en cuestión.

1.3 HIPOTESIS

El aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) es capaz de inhibir el desarrollo de microorganismos anaerobios (*Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*) de importancia en la industria alimentaria.

II REVISION DE LITERATURA

2.1 ANTIMICROBIANOS

La mayoría de los consumidores actuales están convencidos de que los mejores y más sanos alimentos son, después de los frescos, los mínimamente procesados que no tienen conservadores, colorantes u otras sustancias dañinas a la salud. Por esto, la industria alimentaría se da a la labor de orientar esfuerzos para cubrir estas demandas investigando nuevas formas de conservación, y estudiando el efecto de diversos factores y formas tradicionales de conservación de alimentos para que sean estables y duraderos (Morales, 2005).

Los antimicrobianos son compuestos que retardan o inhiben el crecimiento de microorganismos donde se encuentran presentes. Pueden añadirse o estar presentes en los alimentos, prolongando su vida en anaquel (Silva, 2003). Son moléculas que poseen un poder bacteriostático o bactericida. Existe una gama de estas tanto por composición química como por mecanismos de acción. Pueden ser añadidas intencionalmente por el hombre, son artificiales o sintetizadas químicamente, también se encuentran en forma natural en tejidos animales o vegetales vivos o muertos como respuesta protectora ante el medio ambiente y se les denominan aditivos (Bourgeois y col., 1995).

Algunos alimentos contienen de forma natural sustancias antimicrobianas (que inhiben o destruyen los procesos o estructuras microbianas), antimicóticos (que inhiben o destruyen a los hongos) (Prescott y col., 2004); como los aceites

esenciales de especias que además tienen un amplio espectro; es decir, que pueden inhibir a muchos tipos de microorganismos. Otras sustancias manifiestan actividad inhibitoria frente a un número limitado de tipos microbianos, estas son denominadas de “bajo espectro” (Bourgeois y col., 1995).

Los antimicrobianos son un grupo de compuestos añadidos al alimento con la finalidad de lograr una estabilidad microbiológica, también son conocidos como conservadores, y para lograr su buena eficacia es de importancia la disponibilidad de nutrientes y el nivel inicial de contaminación de los alimentos (Badui, 1999).

Los mecanismos implicados en la actividad de los agentes antimicrobianos son muy variados. Incluyen: la inhibición de la biosíntesis del ácido nucleico, de la proteína o de los componentes de la pared celular; el daño a la integridad de las membranas citoplasmáticas y externa de la célula y la obstaculización de una gran variedad de reacciones metabólicas esenciales (Mossel y col., 2003)

2.1.1 Antimicrobianos sintéticos

Son compuestos que no se encuentran presentes en la naturaleza y que son sintetizados en laboratorio, la aplicación de estos agentes químicos es una actividad muy practicada en la industria de los alimentos para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables (Morales, 2005). De los compuestos antimicrobianos obtenidos por síntesis química usados comercialmente como aditivos alimentarios destacan:

2.1.1.1 Ácido benzoico y benzoatos

La sal sódica es usada ampliamente en un gran número de alimentos, es uno de los conservadores más comunes en la industria. La forma no disociada del ácido es la que presenta actividad antimicrobiana, el pH óptimo de efectividad es de 2.5 a 4.0. Es decir, en productos ácidos como jugos de frutas, bebidas carbonatadas, postres, alimentos fermentados y otros, controla el crecimiento de levaduras y bacterias y el de hongos en menor grado. Las concentraciones permitidas que se usan en los alimentos son de 0.05 al 0.1% en peso.

2.1.1.2 Ácido sórbico y sorbatos

Son usados en concentración menor a 0.3% en peso para inhibir crecimiento de hongos y levaduras en alimentos con pH hasta de 6.5, su efectividad es mejor al reducir el pH. Empleados principalmente en quesos, encurtidos, jugos de frutas, pan, vino y mermeladas.

Este ácido tiene la propiedad de unirse a la superficie de las células microbianas, modificando la permeabilidad y el metabolismo.

2.2.1.3 Sulfitos

Con este nombre se agrupan diversos compuestos que en solución acuosa liberan H_2SO_4 . Por su importancia destacan los sulfitos de sodio (Na_2SO_3) y de potasio (K_2SO_3), los bisulfitos de sodio y de potasio ($NaHSO_3$ y $KHSO_3$) y los metabisulfitos de sodio y potasio ($Na_2S_2O_5$ y $K_2S_2O_5$), son polvos y cristales con

una alta solubilidad en agua por lo que se aplican en un gran número de alimentos sin ningún problema.

Los sulfitos tienen múltiples funciones, que los hacen comunes en el procesamiento de alimentos dado que: a) inhiben la reacción de oscurecimiento no enzimático de Maillard bloqueando los grupos carbonilos libres de azúcares impidiendo que estos interactúen con los aminoácidos; ejercen también una acción decolorante sobre los pigmentos melanoidinas productos finales de estas transformaciones b) evitan las reacciones de oscurecimiento enzimático pues su poder reductor inhibe la síntesis de quinonas además de que pueden inhibir a la propia enzima y c) realizan acción antimicrobiana definida sobre hongos, levaduras y bacterias, el mecanismo de acción no se conoce totalmente. La industria vitivinícola tiene una gran demanda de estos aditivos, puesto que ejercen diferentes acciones en el vino: a) son blanqueadores y eliminan los colores indeseables b) actúan como antioxidantes reaccionando con el peróxido de hidrógeno y con fenoles y aldehídos oxidados, y c) muestran función antimicrobiana contra levaduras y bacterias indeseables.

En las concentraciones generalmente usadas (500 ppm) no producen olores indeseables ni presentan toxicidad para la mayoría de la población. Sin embargo investigaciones manifiestan que hay individuos con sensibilidad a los sulfitos (Badui, 1999).

2.1.1.4 Nitritos y nitratos

Son empleados en la elaboración de diversos productos cárnicos embutidos llamadas sales de curación, tienen doble función desarrollan un color

característico al formar la nitrosilhemocromo, pigmento típico de las carnes curadas, y actúan como inhibidores específicos del crecimiento de *Clostridium botulinum*. La dosis generalmente empleada para productos cárnicos es de 200 ppm de nitritos y 500 ppm de nitratos. Además gracias a sus propiedades antioxidantes intervienen estabilizando el aroma y gusto de estos productos (Badui, 1999).

2.1.1.5 Conservadores para uso en la industria alimentaria autorizados por la Unión Europea

La Unión Europea (U.E) codificó y clasificó los aditivos alimentarios (Cuadro 1) empleados en la industria alimentaria, tales aditivos no alteran la salud de los consumidores en la dosis máxima permitida.

Cuadro 1. Lista de conservadores aprobados por la Unión Europea

E 200 Ácido sórbico	E 222 Sulfito ácido de sodio	E 252 Nitrato potásico
E 201 Sorbato sódico	E 223 Metabisulfito sódico	E 260 Ácido acético
E 202 Sorbato potásico	E 224 Metabisulfito potásico	E 261 Acetato potásico
E 203 Sorbato cálcico	E 226 Sulfito cálcico	E 262 i Acetato sódico
E 210 Ácido benzoico	E 227 Sulfito ácido de calcio	E 262 ii Diacetato sódico
E 211 Benzoato sódico	E 228 Sulfito ácido de potasio	E 263 Acetato cálcico
E 212 Benzoato potásico	E 230 Bifenilo	E 270 Ácido láctico
E 213 Benzoato cálcico	E 231 Ortofenilfenol	E 280 Ácido propiónico
E 214 Etil parahidroxibenzoato	E 232 Ortofenilfenato sódico	E 281 Propionato sódico
E 215 Etil parahidroxibenzoato sódico	E 233 Tiabenzol	E 282 Propionato cálcico
E 216 Propil parahidroxibenzoato	E 234 Nisina	E 283 Propionato potásico
E 217 Propil parahidroxibenzoato sódico	E 235 Natamicina	E 284 Ácido bórico
E 218 Metil parahidroxibenzoato	E 239 Hexametilen tetamina	E 285 Tetraborato sódico
E 219 Metil parahidroxibenzoato sódico	E 240 Formaldehido	E 290 Anhídrido carbónico
E 220 Anhídrido sulfuroso	E 242 Dimetil dicarbonato	E 296 Ácido málico
E 221 Sulfito sódico	E 249 Nitrito potásico	E 297 Ácido fumárico
	E 250 Nitrito sódico	E-249 Nitrito potásico
	E 251 Nitrato sódico	E-250 Nitrito sódico
		E-251 Nitrato sódico
		E-252 Nitrato potásico

(Madrid y col., 1994)

Dentro de los aditivos alimentarios sintetizados químicamente, solo unos cuantos han pasado con éxito su evaluación toxicológica. Últimamente ante el rechazo de los conservantes químicos o sintéticos por parte de los consumidores, ha cobrado un gran impulso la búsqueda de conservadores naturales, en particular los provenientes de productos vegetales de los que se obtienen aceites esenciales, oleoresinas y extractos naturales (Mossel, 2003).

El uso de conservadores en los alimentos es importante para mantener su calidad microbiológica, sin embargo existen ventajas y desventajas tanto de conservadores químicos como de conservadores naturales citadas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Ventajas y desventajas de los conservadores químicos y naturales

Conservadores	Ventajas	Desventajas
Químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo de producción • Fácil producción y paliación a nivel industrial • Mayor tiempo de conservación de los alimentos 	<ul style="list-style-type: none"> • Se les atribuye poseer propiedades cancerígenas y toxicológicas • Dificil eliminación del organismo.
Naturales	<ul style="list-style-type: none"> • Ampliamente distribuidos en la naturaleza • No tóxicos ni nocivos para la salud en las dosis aplicadas • Ampliamente aceptados por la población 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo rendimiento • Alto costo de producción • Requieren análisis minuciosos para su aceptación comercial

(González, 2005)

2.1.2 Antimicrobianos naturales

De igual forma que los antimicrobianos de origen sintéticos, existen los de origen natural que cumplen con las mismas funciones, es un gran número de compuestos de origen vegetal y animal a los que se les ha estudiado tanto sus propiedades antimicrobianas como toxicológicas en respuesta de los consumidores que prefieren productos frescos y mínimamente procesados (González, 2005).

Muchos de estos compuestos se encuentran en investigación para su posible uso en conservación de alimentos sobre todo contra microorganismos patógenos (Hernández, 2003). Hasta el momento el reto es aislar, purificar, estabilizar e incorporar estos antimicrobianos a los alimentos sin afectar sus características sensoriales. La actividad antimicrobiana depende de la variedad de especie o hierba, el tipo de microorganismo y el alimento al que va a ser añadido (Alatríste, 2004).

Los compuestos antimicrobianos de las especias, hierbas y plantas o sus extractos se encuentran generalmente en sus aceites esenciales (Cuadro 3) obtenidos de sus hojas, flores, bulbos y frutos.

Cuadro 3. Sustancias con actividad antimicrobiana provenientes de plantas

Nombre común	Otros nombres	Planta o especia
Haldeado dinámico	3-fenilpropenal	Canela
Alil isotiocianato	Alillisulfacianato	Mostaza
Acetol	p-propenilanniso	Hinojo
Carvacrol	2-hidroxi-p.cimeno, isotimol p-alilfenol	Tomillo, Albahaca, estragón y orégano
P-cimeno	Isopropil-tolueno	Tomillo
Cíñelo	Eucaliptol	Laurel y romero
Citral	3,7 dimetil-2-6octadienal	Limón
Cominal	Culminaldehido p-isopropilbenzaldehido	Comino
Eugenol	4-alil-2-metoxifenol	Clavo
Geranoil	3,7-dimetil-3-hidroxil, 1,6-octaideno	Limón y albahaca
Linatol	3,7-dimetil-3-hidroxil, 1,6-octadieno	Albahaca y cilantro
Mentol	Hexahidrotimol	Menta
Pineno	2,6,6-trimetil biciclo (3.1.1.)-2hepteno	Orégano y perejil
Terpineol	x-terpineol	Mejorana
Timol	5-metil-4-hidroxibenzaldehido	Vainilla y orégano

(Santiesteban, 2002)

Los compuestos fenólicos de los aceites esenciales presentan una gran actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas y gram negativas, presentando mayor sensibilidad las gram positivas, en estas bacterias la acción de los compuestos fenólicos origina la salida de los iones potasio de la célula, decrece el pH intracelular, se colapsa el potencial de membrana, inhibiéndose la síntesis de ATP, generando la muerte celular (Silva, 2003).

En estudios anteriores se ha descrito el efecto antimicrobiano del orégano de Chihuahua contra bacterias que se relacionan con la seguridad de los alimentos reportándose un efecto menor en contra de microorganismos gram negativos (Silva, 2003). Así también se ha demostrado que en su aceite esencial se encuentra presente el timol entre 0.7-40.2 % y el carvacrol entre 15.2-41.2 %.

La aplicación de los aceites esenciales es extensa ya que por su composición química tienen actividades: farmacológicas (antisépticos, antiinfecciosas, antiinflamatorios, anticoagulantes, antialérgicos, neurotonicos, endocrinorreguladores e inmunoestimulantes, etc.) y antimicrobianas (antibacteriales, antivirales, antimicóticos y antiparasitarios) (Silva, 2003).

2.2 ORÉGANO

2.2.1 Generalidades

Orégano proviene de la palabra griega “Origanum” que deriva de “oros” montaña y “ganos” alegría, en alusión a la apariencia que esta planta le da a las montañas donde crece (Silva, 2003).

En la republica mexicana se conoce con el nombre de orégano a aproximadamente 40 especies de plantas herbáceas pertenecientes a cuatro familias. Se caracterizan por su extraordinario poder saborizante, fácil de percibir cuando se añaden sus hojas frescas o secas, o sus extractos y concentrados acuosos, a un sinnúmero de productos alimenticios frescos, procesados y envasados. El aroma y sabor que los diversos tipos de orégano proporcionan a los alimentos los hacen agradables al olfato y al paladar.

La mayoría de las especies de orégano tienen notables propiedades medicinales, que se manifiestan por su compleja composición química. En la práctica terapéutica (herbolaria) las especies de orégano europeas (*Origanum* spp) y las mexicanas (*Lippia* spp) se administran para las mismas dolencias.

Sin embargo, un estudio comparativo entre el orégano proveniente de Grecia y de Turquía con el orégano mexicano (referido a las especies *Lippia graveolens* H.B.K = *Lippia berlandieri* Schauer), se comprobó la primacía en la calidad del orégano mexicano respecto a la composición química de sus aceites esenciales (Cuadro 4) (Huerta, 2005).

Cuadro 4. Componentes químicos del orégano que determinan su calidad comercial. Análisis comparativo con dos especies extranjeras

Componentes	Orégano mexicano <i>Lippia berlandieri</i>	Orégano griego <i>Origanum vulgare, subsp. Hirtum</i>	Orégano turco <i>Origanum vulgare Subsp. Gracite</i>
Aceite esencial	6.4%	1.5%	1.5%
Timol	10.4%	23.9%	15.1%
Carvacrol	43.7%	12.2%	9.9%
p-cimeno	6.4%	15.9%	8.1%

(Huerta, 2005)

2.2.2 Clasificación taxonómica

De acuerdo a las características morfológicas, al orégano establecido en el sur de Chihuahua le corresponde la siguiente clasificación según el Cuadro 5.

Cuadro 5. Taxonomía del orégano de Chihuahua

REINO	Vegetal
CATEGORIA	Metaphyta
DIVISION	Tracheophyta
SUBDIVISION	Pteropsida
SUPERCLASE	Spermathopyta
CLASE	Angiospermas
SUBCLASE	Dicotiledoneae
SERIE	Gamopetalas
ORDEN	Lamiales
FAMILIA	Verbenaceae
GENERO	Lippia
ESPECIE	berlandieri

(Silva, 2003)

2.2.3 Características ecológicas

Las plantas de las diferentes familias de orégano mexicano se encuentran en estado silvestre, en regiones áridas y semiáridas de al menos 24 estados de la república. Sus principales hábitat están en suelos generalmente pedregosos de cerros, laderas y cañadas entre los 400 y 2000 msnm, aunque se le halla en mayor abundancia entre los 1400 y 1800 msnm.

La mayor producción de orégano para fines comerciales es la del género Lippia, cuya especie más abundante en México es *Lippia berlandieri* Schauer (Figura1) = *Lippia graveolens* H.B.K (Silva, 2003). Esta producción se concentra en los estados de Chihuahua, Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luís Potosí y Zacatecas. Estos oréganos comerciales son arbustos que alcanzan hasta 2.5 m de alto y desarrollan en promedio 1.20 m de follaje. La planta tiene sus tallos ramificados con gran cantidad de hojas, que constituyen la parte aprovechable. Esas hojas, de 1 a 3 cm de largo y 0.5 a 1.5 cm. de ancho son opuestas, alternas y de forma ovalada con bordes dentados y tienen una textura

rugosa y con ligeras vellosidades. Las flores son pequeñas, de color blanco y forman inflorescencias en racimos; los frutos son pequeñas cápsulas que contienen las semillas de color café, no mayores de 0.25 mm (Huerta, 2005).



Figura 1. *Lippia berlandieri* Schauer

2.2.4 Clima y suelo

El cultivo del orégano tiene éxito en todos los terrenos ricos en materia orgánica, sueltos, silíceos arcillosos, francos, humíferos, calcáreos, arcilloso-arenosos e incluso en lugares áridos. Los mejores resultados cualitativos y cuantitativos, se obtienen en las zonas cálidas del sur. Los mayores rendimientos en aceite esencial, tanto cuantitativamente como cualitativamente, se obtienen en zonas soleadas y cuya altitud no sea excesiva de 1400 a 1600 msnm, es donde se encuentra la mayor parte del orégano, en suelos pedregosos con pH de 7.3 a 7.6; con clima seco semicálido y precipitaciones no mayores a los 300 mm de promedio anual en el verano; con heladas que ocurre con frecuencia entre mediados de octubre a marzo (Silva, 2003).

2.2.5 Usos y composición química

Al orégano se le da usos culinarios, cosméticos y terapéuticos. Es utilizado en forma fresca y seca en la cocina mediterránea y de América Latina (Pascual y col., 2001). En México el uso del orégano es principalmente como condimento alimenticio utilizando la materia seca. La importancia fundamental de las especias radica en sus propiedades organolépticas, derivadas de sus atributos como saborizantes o sazónadores de los alimentos. El Cuadro 6, muestra la composición química de la materia seca útil del orégano.

Cuadro 6. Composición química del orégano

Proteína	1.7%
grasa	6.4%
Fibra cruda	11%
Carbohidratos	53.9%
Cenizas totales	9%
Insolubles en ácido	1%
Calcio	1.7%
Vitamina A	1010 ul/100 g
Vitamina B1	0.31
Vitamina B2	0.41
Niacina	6.2%
Vitamina C	12 mg/100g
Valor calórico	360 Kcal/100
Aceites volátiles	0.15-0.40%
Taninos	0.8%

(Silva, 2003)

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano (Justasen y col., 2001). Los

aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, β -cariofileno, p-cimeno, canfor, linalol, α -pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo. En extractos metanólicos de hojas de *Lippia graveolens* se han encontrado siete iridoides minoritarios conocidos como loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptosido; y tres iridoides mayoritarios como el ácido carioptosídico y sus derivados 6'-O-p-coumaroil y 6'-O-cafeoil. También contiene flavonoides como naringenina y pinocembrina, lapachenol e icterogenina. Las Figuras 2 y 3 presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano (Rastrelli, 1998).

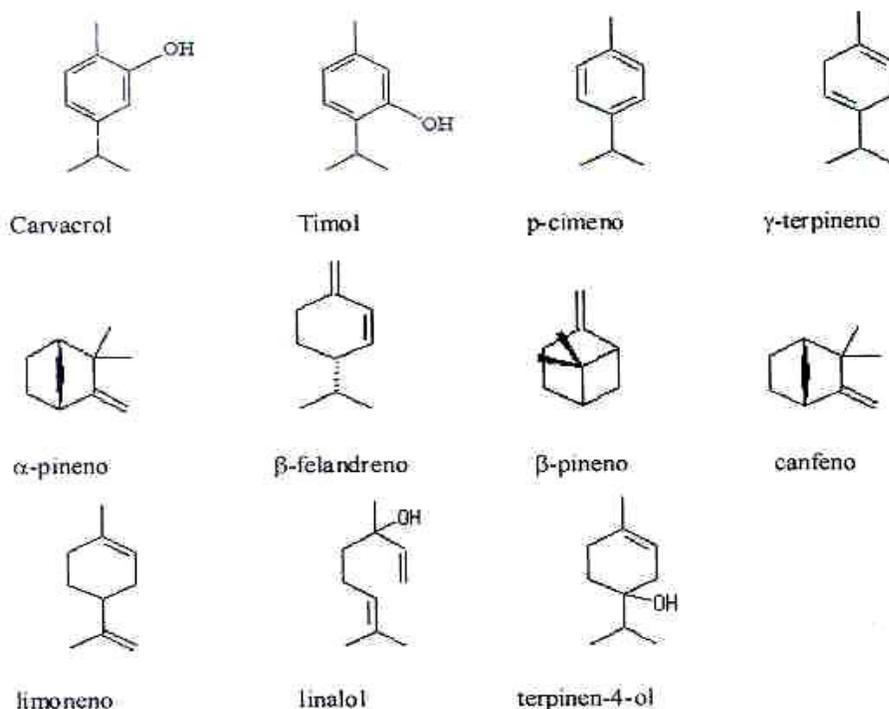


Figura 2. Estructura química de los principales componentes en el orégano

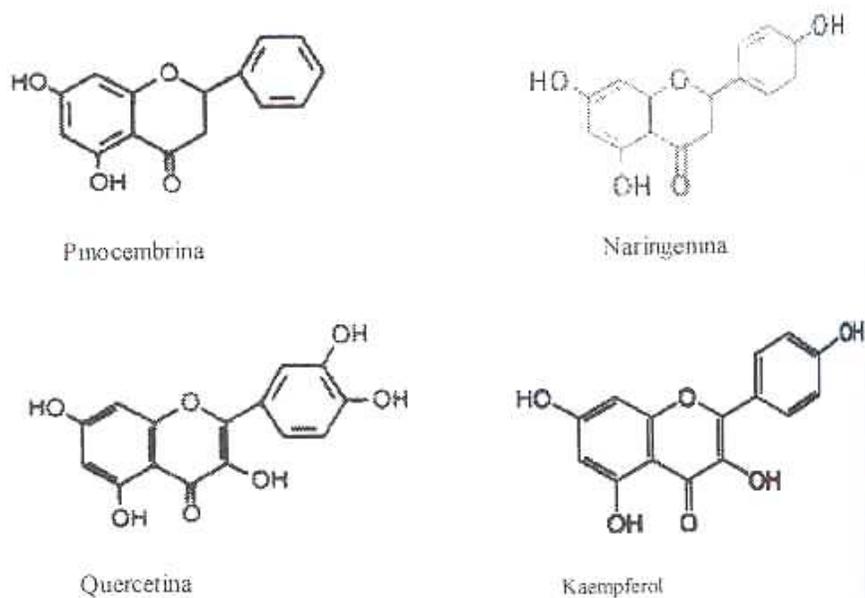


Figura 3. Estructura química de los principales flavonoides en el orégano

2.2.6 Método de extracción

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas por lo que un metabolismo más activo puede asociarse con una mayor producción de aceites (Wilkins, 1998). En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes se derivan del ácido mevalónico y se les clasifica en monoterpenoides y sesquiterpenoides (Wagner, 2003). En este aspecto existe aún controversia, algunos autores señalan que la gran variabilidad en la composición química de los aceites esenciales es debida, sobre todo, al origen del material más que a la influencia del medio ambiente. Otros autores otorgan un

papel más preponderante al medio ambiente, sobre todo en lo referente a densidad de planta sembrada, estación del año en el corte y a la cantidad de agua usada en el riego, o incluso a la cantidad de luz artificial o natural usada en el cultivo de la planta en invernadero (Putievsky, 1996).

Los métodos convencionales utilizados para la extracción de aceites esenciales son la destilación por arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos. En los últimos años ha crecido el interés por la extracción supercrítica y subcrítica con dióxido de carbono como solvente. Este gas es ideal ya que no es tóxico ni explosivo y es fácil de remover de los productos extraídos. Los rendimientos de extracción generalmente van desde el 1.8% hasta el 5.6% (McGimpsey, 1993). En cuanto a su composición se han logrado identificar hasta 56 compuestos, y se han encontrado diferencias cuantitativamente significativas en sólo dos fenoles isoméricos, carvacrol (0.1-56.6%) o fenol no-cristalizable y timol (7.9-53.6%) o fenol cristalizable; incluyéndose sus precursores biosintéticos el γ -terpineno y el p-cimeno. Algunos autores señalan que el aceite con mayor cantidad de carvacrol es el preferido. Se han encontrado 45 compuestos que constituyen el 92-93% del aceite esencial de *Lippia graveolens* HBK. Los componentes principales fueron carvacrol (71%) y timol (5%) (Arcila, 2004).

2.2.7 Importancia económica

Las perspectivas económicas de este recurso, a través de su proceso agroindustrial, son muy promisorias, siempre y cuando se pueda garantizar una producción uniforme del orégano, tanto en calidad como en volumen. Dado que el orégano es un recurso silvestre de zonas con alto grado de marginación, es

necesario que se realice un manejo adecuado de este recurso, para garantizar un desarrollo sustentable en las regiones donde se produce. Así como asegurar que se eleve el nivel socioeconómico de importantes núcleos de población cuyos ingresos actuales son escasos e irregulares (Huerta, 2005).

El fomento de un recurso forestal renovable tan importante como el orégano debe estar apoyado en normas o recomendaciones como, por ejemplo, aplicar oportunamente las normas técnicas que permitan el óptimo aprovechamiento y conservación del recurso; prevenir la incidencia de incendios y sobre pastoreo en sus hábitat, ya que en las áreas donde se desarrolla el orégano, la cubierta vegetal es escasa y por lo tanto puede ser fácilmente destruida por la erosión, cuando queda al descubierto la delgada capa de suelo. Asimismo, es necesario organizar a recolectores y acopiadores para la recolección de semillas para el establecimiento de viveros y promover la reforestación o regeneración de áreas que, actualmente, tengan en producción o se encuentren sobreexplotadas. También resulta importante capacitar permanentemente a los productores en el manejo de técnicas de aprovechamiento (recolección, beneficio), así como en la identificación de los canales de comercialización que les reporten mayores beneficios. Además, es imprescindible impulsar la investigación de métodos o técnicas de propagación de estas plantas (Huerta, 2005).

De las casi 4,000 toneladas de orégano que se recolectan anualmente, la mitad son reguladas por dependencias oficiales y comercializadas a Estados Unidos principalmente. El 50% restante se extrae en forma clandestina y se exporta a diferentes países, bajo aranceles falsos, de los que no se tienen datos

precisos del precio obtenido. Perjudicando al productor, al que se le paga el producto a precios ínfimos.

El orégano es una especie de alta adaptabilidad a gran variedad de suelos y climas, lográndose cosechas de buena rentabilidad, tanto en deshidratados como en aceites esenciales. Llegando a alcanzar el aceite esencial un precio de \$440 a \$1,800 por litro (CONAFOR, 2006), por lo anterior la comercialización de éste se convierte en un negocio rentable, siendo los principales compradores Estados Unidos, Francia, Italia y España, además de ser utilizado como antimicrobiano en la industria alimenticia, también se utiliza en la industria química y farmacéutica, etc. (Silva, 2003).

2.3 CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

El éxito de incorporar antimicrobianos a un alimento para inhibir o retardar el crecimiento microbiano requiere de la combinación de otros factores de estrés en el alimento, lo que lleva a la denominada tecnología de obstáculos, en la cual no se aplica un solo factor en forma severa (como en los métodos tradicionales), sino que se utiliza cada factor en dosis leves, para obtener mejores resultados o afectar lo menos posible en la calidad del alimento.

La inteligente combinación de estos factores (obstáculos) sin que sean aplicados en forma excesiva, asegura la estabilidad microbiológica, sensorial, nutritiva, y toxicológica del alimento. Estos obstáculos controlan el desarrollo microbiano previniéndolo, retardándolo y/o incluso inactivando a los microorganismos. Esto se debe principalmente a que el cambio en la actividad de agua, pH, temperatura y la presencia de aditivos en el medio, provoca un

desequilibrio celular, provocando una disminución en su velocidad de reproducción o incluso la muerte (Alatríste, 2004).

2.3.1 Alimentos envasados al alto vacío

El envasado a vacío es una de las tecnologías de conservación de alimentos más importantes del momento actual. Consiste en la eliminación total del aire del interior del envase sin que sea remplazado por otro gas, careándose una diferencia de presión entre el exterior y el interior del envase. El volumen de distribución de estos alimentos supera al de los alimentos en bandejas o en bolsas tratadas con calor y envasadas asépticamente. Los controles de procesado y distribución que se requieren para asegurar la salubridad y buena calidad de los productos al vacío son mas severos que los que necesitan los anteriormente mencionados, en los que la perdida de calidad es mayor.

En un inicio esta tecnología de envasado solo se usaba en la distribución a grandes volúmenes y aun continúa su uso, pero las tendencias actuales se dirigen a los últimos tramos de la distribución de alimentos es decir en el comercio minorista, hoteles, restaurantes y comedores colectivos o envases en porciones para consumo directo.

El sector de hoteles, restaurantes y comedores colectivos representa en Estados Unidos más del 25% del total de alimentos y el 35% de las comidas, con un valor que excede al 40% del gasto total en alimentos. Los supermercados han establecido sus propias operaciones de preparación de alimentos desde la década de los 80, las ventas de alimentos preparados aumentaron

considerablemente en los supermercados, especialmente los listos para consumir como ensaladas, guarniciones, carnes, panes, etc.

Los principales agentes alterantes de estos alimentos son los microorganismos, dado que constituyen la principal causa de alteración del tejido muscular y de los alimentos precocinados, es aceptable la aplicación de cualquier mecanismo que reduzca el crecimiento de dichos microorganismos.

El cambio en el entorno de los alimentos puede conducir a efectos benéficos, sin embargo su aplicación inadecuada o incorrecta conlleva desde un gasto inútil hasta provocar riesgos en la salud pública.

La aplicación de vacío puede retardar eficazmente la multiplicación de microorganismos. Mientras mayor sea la concentración de dióxido de carbono menor será la respiración de los microorganismos y su velocidad de multiplicación. A concentraciones de dióxido de carbono superiores al 25% se ejerce al máximo efecto inhibitor sobre el crecimiento microbiano. Sin embargo cuando la concentración de oxígeno disminuye hasta cero se crean condiciones adecuadas para el crecimiento de microorganismos anaerobios, como, por ejemplo, el patógeno *Clostridium botulinum* (Brody, 1996).

2.3.2 Alimentos enlatados

La industria enlatadora ha tenido un progreso constante, produciendo algunas fabricas un millón o más de latas al día. Los alimentos enlatados son calentados en recipientes sellados en condiciones estériles, sin embargo los alimentos tienen asociadas microfloras o microorganismos con grupos particulares de alimentos de acuerdo con el Cuadro 7, estos microorganismos

entran al alimento durante la operación del enlatado ya sea del suelo, de los ingredientes o del equipo (Desrosier, 1987).

Éstos pueden sobrevivir al tratamiento térmico del enlatado o bien contaminar el alimento después del tratamiento debido a suturas o fugas del envase. Cuando la contaminación es anterior al tratamiento, es posible predecir el microorganismo responsable si se conoce bien la naturaleza del alimento y las condiciones a las que se ha sometido. Sin embargo, los microorganismos que se introducen por fugas pueden ser muy variados (INFOAGRO, 2005).

Cuadro 7. Clasificación de los alimentos según su acidez y grupos de microorganismos causantes de alteraciones en alimentos enlatados

Grupos según grado de acidez	Rango de pH	Grupos de alimento	Microorganismos
Grupo 1: poco ácidos	≥ 5	Productos cárnicos Productos marinos Leche Hortalizas	Aerobios esporulados Anaerobios esporulados
Grupo 2: semiácidos	$4,5 \leq \text{pH} < 5,0$	Mezclas de carne y vegetales, sopas Salsas	Levaduras, mohos y bacterias no esporuladas
Grupo 3: ácidos	$3,7 \leq \text{pH} < 4,5$	Tomates, peras, higos, piña, otras frutas	Bacterias esporuladas Bacterias no esporuladas Levaduras, Mohos
Grupo 4: muy ácidos	$\text{PH} < 3,7$	Encurtidos, pomelo, zumos y cítricos	

(INFOAGRO, 2005)

Según los requerimientos de calor los microorganismos pueden ser, de menor a mayor exigencia: psicrófilos, mesófilos, termófilos y termodúricos, siendo los dos últimos los que más interesan desde el punto de vista del tratamiento térmico. Los termófilos son capaces de desarrollarse a elevadas temperaturas (55

°C y más), mientras que los termodúricos son capaces de resistir el efecto de las altas temperaturas.

Sin embargo, los organismos mesofílicos pueden ser termodúricos debido a sus esporas, al igual que pueden serlo las esporas de las bacterias termofílicas (Desrosier, 1987). A su vez, los organismos termófilos se clasifican en dos grupos: termófilos obligados (crecen a 55 °C, pero no a 37 °C) y termófilos facultativos (crecen a 55 °C y a 37 °C).

Según las necesidades de oxígeno los microorganismos pueden ser: aerobios (requieren la presencia de oxígeno), anaerobios (sólo se desarrollan en ausencia de oxígeno o con baja tensión de oxígeno) y anaerobios facultativos (pueden desarrollarse con o sin presencia de oxígeno) (INFOAGRO, 2005).

2.4 MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS DE ACIDEZ BAJA Y MEDIA

2.4.1 Anaerobios esporulados

Los anaerobios esporulados proceden principalmente del suelo, por lo que se encuentran ampliamente distribuidos en la leche, hortalizas y otros productos alimenticios. También es posible encontrarlos en la carne, ya que algunas especies también se desarrollan en los intestinos del hombre y animales.

El género más importante es el *Clostridium* perteneciente a la familia de las Bacillaceae, pudiendo encontrar organismos termófilos donde los sacarolíticos son los más importantes, produciendo gran cantidad de gas a partir de los carbohidratos, principalmente dióxido de carbono e hidrógeno, lo que da lugar al abombamiento de las latas. Estas alteraciones van acompañadas de un olor butírico. No producen ácido sulfhídrico. La temperatura óptima de desarrollo se

sitúa alrededor de los 55 °C., apareciendo sobre todo en países cálidos, donde las temperaturas de almacenaje pueden sobrepasar los 35 °C. También, los termófilos pueden ser causantes de una alteración sulfurosa, en este caso con producción de ácido sulfhídrico.

El botulismo generalmente no es causado por alimentos frescos o crudos, por que la asociación microbiana natural de los alimentos no tratados ejerce un efecto antagonista sobre *Cl. botulinum*. Los tipos de alimentos procesados responsables de los brotes de botulismo en su mayor parte son reflejo de los métodos usados para conservar alimentos, generalmente se ha sostenido que el pH 4.5 es el valor crítico por debajo del cual los alimentos están fuera del peligro del botulismo o incluso en algunos casos es necesario un pH mas bajo, por esta razón la mayoría de las frutas enlatadas o envasadas en frascos de vidrio no son sensibles o no suponen peligro de botulismo, siempre y cuando exista un pH por debajo de 4.5 en todas partes del alimento y que no existan otros microorganismos aparte de *Cl. botulinum* que metabolicen los ácidos y de este modo aumentar el pH tales conocidos como microorganismos antagonistas según el Cuadro 8 (Mossel, 2003).

La industria del enlatado admite de forma general que todos los productos no ácidos tratados deben cumplir los requerimientos básicos necesarios para destruir a *Cl. botulinum* (esterilización durante 2.8 minutos a 121.1 °C., en el punto mas frío del envase). En los alimentos correctamente procesados no se produce el desarrollo de esta bacteria, aunque existen alimentos con porciones sólidas en los que puede haber heterogeneidad de pH durante cierto tiempo, por lo que debe mantenerse un pH inferior a 4.5 como margen de seguridad. Este microorganismo merece especial mención debido a su significancia para la salud humana ya que

ocasiona botulismo que es la mas letal de todas las infecciones transmitidas por alimentos causado al ingerir un alimento con la toxina de *Cl. botulinum* (Desrosier, 1987). Se presenta tanto en forma vegetativa como de esporas, siendo esta última la forma más importante desde el punto de vista del enlatado de alimentos (INFOAGRO, 2005).

Cuadro 8. Antagonistas de bacterias patógenas de importancia en los alimentos

PATOGENOS	ANTAGONISTA
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Bacillus</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Enterococcus</i> <i>E.coli</i> <i>Lactobacillaceae</i> <i>Micrococcus</i> <i>Moraxella</i>
<i>Clostridium perfringes</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Enterococcus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Pediococcus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Lactococcus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Lactobacillaceae</i> <i>Pseudomonas</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pediococcus</i> <i>Streptococcus lactis</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Veilonella</i>

(Mossel, 2003)

Las grandes piezas de carne de mamífero y de aves que han sido cocinadas, luego dejadas a temperatura ambiente o mantenidas en condiciones de refrigeración deficientes, y finalmente consumidas frías o después de un recalentamiento suave; así como grandes volúmenes de carnes hervidas, asadas, estofadas, guisadas o cocinadas al vapor, platos a base de carne cocinados con antelación, empanadas, salsas, alimentos todos ellos enfriados muy lentamente, durante largos periodos de tiempo y no recalentados profundamente antes de su consumo son alimentos principales implicados en los brotes de infección alimentaria por *Cl. perfringes*. Algunas esporas sobreviven al tratamiento térmico culinario y como el calor determina la eliminación del oxígeno disuelto, se crean condiciones de anaerobiosis, aunque *Cl. perfringes* no es un anaerobio estricto. Las esporas sobrevivientes expuestas al shock térmico son activadas (a 70-80 °C) y germinan, y cuando la temperatura desciende por debajo de 50 °C, las células vegetativas originadas se multiplican rápidamente al alcanzar la temperatura óptima de crecimiento y que en estas condiciones el tiempo de generación es solo de 10-12 minutos. La multiplicación también puede tener lugar conservando los platillos preparados a temperatura ambiente después del recalentamiento mientras se mantienen calientes. Por debajo de los 15 °C el microorganismo se multiplica con dificultad. Después de la ingestión de un alimento con 10^6 - 10^8 bacterias/g, las células vegetativas que llegan al intestino se multiplican aun más y posteriormente esporulan en los segmentos intestinales inferiores.

Los alimentos implicados en brotes de infección alimentaria por *B. cereus* son: sopas de verduras y carne, carne cocinada, carne de ave, salsas, natillas y pudines. *B. cereus* a diferencia de *Cl. perfringes* es mucho más resistente a tratamientos térmicos y es más probable que sus esporas germinen y causen

enfermedad. *B. cereus* esta implicado en intoxicaciones alimentarias de un modo mas general que *Cl. perfringes*. Estos alimentos pueden ser cocinados o calentados y posteriormente protegidos de una recontaminación sin ser enfriados con rapidez ni conservarse a temperaturas de refrigeración, sino a temperaturas altas. En estas circunstancias, las esporas sobrevivientes al cocinado pueden germinar, y posteriormente las células vegetativas pueden multiplicarse con rapidez y producirse las enterotoxinas responsables. Los síntomas generalmente aparecen 8-16 horas después de la ingestión (Mossel, 2003).

2.4.2 *Clostridium botulinum*

Cl. botulinum pertenece al genero *Clostridium*, es un conjunto de especies mas que una especie, es bacilo Gram positivo esporulado, anaerobio estricto, su temperatura optima de crecimiento esta entre 30 y 37 °C., se desarrolla en pHs cercanos a la neutralidad, por debajo de pH 4.5 es imposible su desarrollo.

Cl. botulinum puede esporular en medios de cultivo, en la naturaleza y en los alimentos. Sus esporas son termoresistentes, por lo tanto sobreviven a un tratamiento térmico deficiente. La termoresistencia depende del medio de producción y la temperatura y se ve afectada por la Δ_w .

Por su toxicidad potencial debe ser eliminado obligatoriamente de los alimentos conservados por esterilización, por tal motivo los tratamientos de esterilizaron en la conservas alimentarias se calculan para obtener una reducción decimal de esporas de *Cl. botulinum* de 10^{12} , si esta norma es respetada, prácticamente es nulo el riesgo de contaminación de una conserva por este microorganismo.

Cl. botulinum produce toxinas originadas durante el crecimiento de la bacteria en medios complejos, estas son liberadas rápidamente y por tanto denominadas comúnmente exotoxinas. Poseen un efecto paralizante debido a que bloquean la liberación de acetilcolina a nivel presináptico de las uniones mio-neuronales (Bourgeois y col., 1994) generando visión doble, caída de párpado superior y dificultad en la deglución. Las náuseas, el vómito, los retortijones abdominales y la diarrea preceden con frecuencia a la aparición de los síntomas nerviosos, que muchas veces van acompañados de estreñimiento. Los síntomas se presentan en un plazo de hrs. hasta ocho días (18-36 hrs. Después del consumo de un alimento con toxina botulínica (Mossel, 2003).

2.4.3 *Clostridium perfringens*

Pertenece al género *Clostridium* es un bacilo Gram positivo bastante grueso recto con los extremos cuadrados en ángulo recto, de 0.6 a 2.4 μm de ancho y de 1.3 a 19 μm de largo, presentándose solos o en parejas. Las esporas son grandes, ovals, centrales o subterminales. No posee cilios por lo que es completamente inmóvil.

Es una bacteria anaeróbica, el CO_2 favorece su crecimiento, sin embargo tolera la presencia de una pequeña cantidad de oxígeno y es capaz de multiplicarse en presencia de alrededor de un 5% de O_2 en la atmósfera de incubación. El rango de temperaturas que permite el crecimiento de esta bacteria es amplio entre 15 y 50 °C. Esta bacteria tiene un metabolismo muy activo, un crecimiento rápido y reducen de forma intensa el medio de cultivo en el que se

encuentran, lo que favorece su resistencia al oxígeno del aire (Bourgeois y col., 1994).

Esta enfermedad se caracteriza por diarrea y espasmos o retortijones abdominales, que generalmente aparecen unas 10 hr. Después del consumo del alimento colonizados con 10^5 - 10^9 ufc de *Cl. perfringes* / gr. A veces se presentan náuseas y raramente vómitos. Estos síntomas son consecuencia de la liberación de una enterotoxina por las células en fase de esporulación en el tracto intestinal inferior (Mossel, 2003).

2.4.4 *Bacillus cereus*

Pertenece a la familia de las Bacillaceae, bacilos formadores de esporas termoresistentes, es Gram positivo, aero-anaerobio, la temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 37 °C. Sólo sobrevive a pHs entre 4.5 y 9.3 y a Δ_w superior o igual a 0.95.

Crece en la mayoría de los productos alimenticios especialmente en el arroz, sobretodo si lleva proteínas de origen animal. Es formador de dos exotoxinas, una toxina diarreica que se produce en presencia de glucosa y a un pH de 6.0 a 8.0 a una temperatura de entre 18 y 43 °C en la fase exponencial de crecimiento. Productora de síntomas como diarrea líquidas, dolores abdominales a partir de las 6 a 15 horas después de la ingestión de los alimentos contaminados, náuseas, rara vez vómitos, los síntomas desaparecen en menos de 24 horas. Presente en productos embutidos. Y una toxina emética estable a pH entre 2 y 11, ocasiona síntomas como vómitos al cabo de media a 6 horas de la

incubación, ocasionalmente acompañados de dolor abdominal y diarrea. Presente en alimentos como arroz y leche en polvo.

Sus esporas termorresistentes permiten su presencia en los alimentos, más esto no es suficiente por si sólo para causar daños, las bacterias deben multiplicarse de 10^4 - 10^5 microorganismos/gr de alimento para lograrlo (Bourgeois y col., 1994).

III MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de: Laboratorio de Reproducción del Departamento de Producción Animal, Laboratorios de Nutrición y Alimentos y de Tecnología de Alimentos del departamento de Nutrición y Alimentos en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Esta investigación se desarrollo en tres etapas las que a continuación se describen.

3.1 ETAPA 1. Viabilización e identificación de cepas anaerobias

Las cepas empleadas fueron cultivos puros de *Clostridium perfringes*, que pertenece al mismo género de *Clostridium botulinum*, es formador de una toxina menos toxigénica y su manejo es menos delicado pero de importancia alimentaría (Mossel, 2003); estas cepas fueron otorgadas por la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y cepas de *Bacillus cereus* proporcionadas por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Las cepas de *Bacillus cereus* y *Clostriduim perfringes* se viabilizaron por medio de preenriquecimiento en caldo TSB y siembra por estría en agar Schaedler según lineamientos de Cortés (2005), selectivo para microorganismos anaerobios e incubadas en condiciones de anaerobiosis a 37 °C por 24 horas

seguido de un estudio de la morfología microscópica mediante tinción de gram según Lynch y col. (1987).

3.2 ETAPA 2. Valoración cualitativa del efecto antimicrobiano

3.2.1 Extracción, fraccionamiento y caracterización del aceite esencial de orégano

Las actividades que se mencionan se realizaron en el laboratorio del Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA).

Extracción de aceite esencial de orégano.- Se realizó por hidrodestilación con un prototipo de laboratorio diseñado para este propósito. Donde el proceso consistió en la generación de vapor con un dispositivo que simula una caldera, dicho vapor pasa a través de un contenedor donde se encuentra depositado el orégano, luego el vapor arrastra el aceite esencial depositado en hojas y flores, después es condensado en un serpentín y posteriormente separado por densidad en un embudo de separación.

Fraccionamiento del aceite.- Este procedimiento se hizo con otro prototipo diseñado en el CIRENA, con el propósito de eliminar trazas de agua presente en el aceite, eliminar algunos solventes, y concentrar (fraccionar) algún componente en especial. El principio de este proceso es aprovechar los diferentes puntos de ebullición de los diferentes componentes.

Caracterización del aceite.- Se realizó en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer, donde utiliza helio como acarreador e hidrogeno y aire cero. El detector es FID, con una columna capilar AT-1 de 30 m x 0.25 mm I.D. x 25; las

condiciones de inyector a 265 °C, línea de transferencia 225 °C, y siguiendo un programa de temperaturas de 55 °C por minuto y llevándolo a 95 °C con una rampa de 3 °C por minuto y terminar a 220 °C con una rampa de 25 °C, manteniéndose por 10 minutos, con un tiempo total de 30 minutos.

De esta forma se obtuvieron tres fracciones de aceite a diferentes concentraciones de timol y carvacrol: fracción 1 alto carvacrol (38.25%), fracción 2 alto timol (77.40%) y fracción 3(27.67% timol y 11.31% carvacrol), las cuales fueron proporcionadas por el Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA) situado en Salaices, Chihuahua, México.

3.2.2 Preparación de medio de cultivo y conteo de crecimiento bacteriano

Para esta valoración se prepararon cajas petri por triplicado con agar Schaedler en mezcla con cada fracción de aceite esencial de orégano a las siguientes concentraciones: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.5 %, y un testigo ó concentración cero. El inóculo empleado fue caldo TSB con las cepas correspondientes incubado a 37 °C el tiempo necesario para obtener una absorbancia correspondiente al tubo No. 4 de la escala de Mc Farland citada en la etapa siguiente, posteriormente fue distribuido en las cajas petri 0.5 ml del inóculo y llevadas a incubación a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, el monitoreo tuvo lugar a las 0, 12, 24, 36, 48 y 60 hr. El crecimiento bacteriano se registro a través de símbolos (asignación) según el Cuadro 10. La valoración se realizó tanto para *Bacillus cereus* como para *Clostridium perfringes*.

Cuadro 9. Asignación del crecimiento microbiano

Nivel de Crecimiento microbiano	Asignación
Negativo	N
Leve	L
Moderado	M
Abundante	A

Los datos generados de esta evaluación se analizaron mediante un análisis categórico vía la distribución de X^2 ($P \leq 0.01$) para cada microorganismo en cuestión.

3.3 ETAPA 3. Valoración cuantitativa del efecto antimicrobiano

Con fines de corroborar los resultados de la etapa anterior se valoró cuantitativamente el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano.

3.3.1 Preparación de inóculo de acuerdo a la escala Mc Farland modificada

La elaboración del inóculo se fundamenta en la escala de Mc Farland (Klement, 1990) bajo modificaciones (Cuadro 9) ya que ésta es una técnica comparativa visualmente, y en el presente estudio se correlacionó con lecturas de absorbancia en espectrofotómetro, a una longitud de onda de 450 nm.

Cuadro 10. Absorbancia respecto a escala Mc Farland

Tubo	MI de BaCl ₂ al 1%	MI de H ₂ SO ₄ al 1%	Bacterias/ml	Absorbancia a 8450 nm
1	0.1	9.9	300,000,000	0.2115
2	0.2	9.8	600,000,000	0.3655
3	0.3	9.7	900,000,000	0.472
4	0.4	9.6	1,200,000,000	0.6815
5	0.5	9.5	1,500,000,000	0.8555
6	0.6	9.4	1,800,000,000	0.976
7	0.7	9.3	2,100,000,000	1.0615
8	0.8	9.2	2,400,000,000	1.1915
9	0.9	9.1	2,700,000,000	1.341
10	1.0	9.0	3,000,000,000	1.4611

El inóculo se realizó en caldo TSB a temperatura de 37 °C por el tiempo necesario para alcanzar una absorbancia cercana al tubo No. 4 del Cuadro anterior lográndose para *Bacillus cereus* una absorbancia de 0.652 equivalente a 1,104,000,000 bacterias/ml y para *Clostridium perfringes* una absorbancia de 0.598 equivalente a 996,000,000 bacterias/ml.

3.3.2 Valoración de la actividad antimicrobiana

En esta etapa se prepararon tubos por triplicado con 6 ml de caldo TSB en mezcla con cada fracción de aceite esencial de orégano en las concentraciones citadas en la etapa anterior así como también un testigo de caldo TSB (concentración cero). A los tubos se les agregó 0.6 ml de inóculo para posteriormente mantenerse en incubación por anaerobiosis a las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Con monitoreos continuos en los intervalos

de tiempo citados anteriormente, leídos por espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm. Todo esto para cada microorganismo en cuestión.

Los datos obtenidos fueron analizados con un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 3x7x6 para los factores fracción, concentración y tiempo. El nivel de significancia utilizado fue ($p \leq 0.0001$).

IV RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 ETAPA 1. Viabilización e identificación de cepas anaerobias

Los resultados de esta etapa son afines con la descripción morfológica de cada microorganismo, y a continuación son descritas:

Con la tinción de gram de *Clostridium perfringes* (Figura 4) se observaron bacilos gram positivos gruesos de extremos rectangulares, tal como lo describe Bourgeois y col., (1994).

Para *Bacillus cereus* (Figura 5) se observó en la tinción de gram bacilos positivos, según Bourgeois y col., (1994).

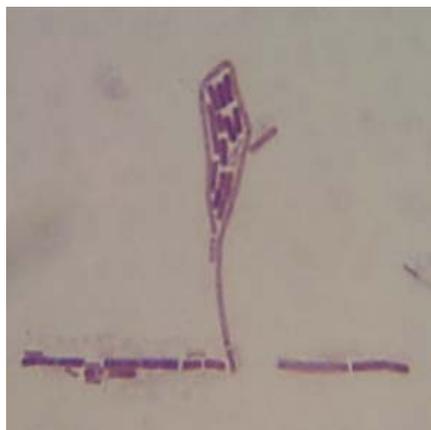


Figura 4.Tinción de gram de *Cl. perfringes*



Figura 5.Tinción de gram de *B. cereus*

4.2 ETAPA 2. Valoración cualitativa del efecto antimicrobiano

En esta etapa se presentan los resultados cualitativos del efecto antimicrobiano ejercido por las diferentes fracciones de aceite esencial de orégano aplicadas a los microorganismos en estudio.

4.2.1 Valoración cualitativa del efecto antimicrobiano sobre *Cl.*

perfringes

Los resultados de la evaluación cualitativa de *Cl. perfringes*, se presentan en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Asignación del crecimiento para *Cl. perfringes*

Frac.	[]%	Tiempo (hr) y asignación de crecimiento																	
		0			12			24			36			48			60		
1	0.00	N	N	N	M	M	M	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
1	0.05	N	N	N	M	M	M	M	M	A	A	M	A	A	A	A	A	A	
1	0.10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	L	M
1	0.15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	0.20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N
1	0.25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	0.50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.00	N	N	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	0.05	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	L	L	L	L	L	L	L	L
2	0.10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	0.00	N	N	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	0.05	N	N	N	L	L	L	M	M	M	M	M	M	A	A	A	A	A	A
3	0.10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	0.15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	0.20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	0.25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	0.50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

En la Figura 6 se presenta el análisis categórico vía la distribución de χ^2 ($P \leq 0.01$) del crecimiento microbiano en cada una de las concentraciones evaluadas.

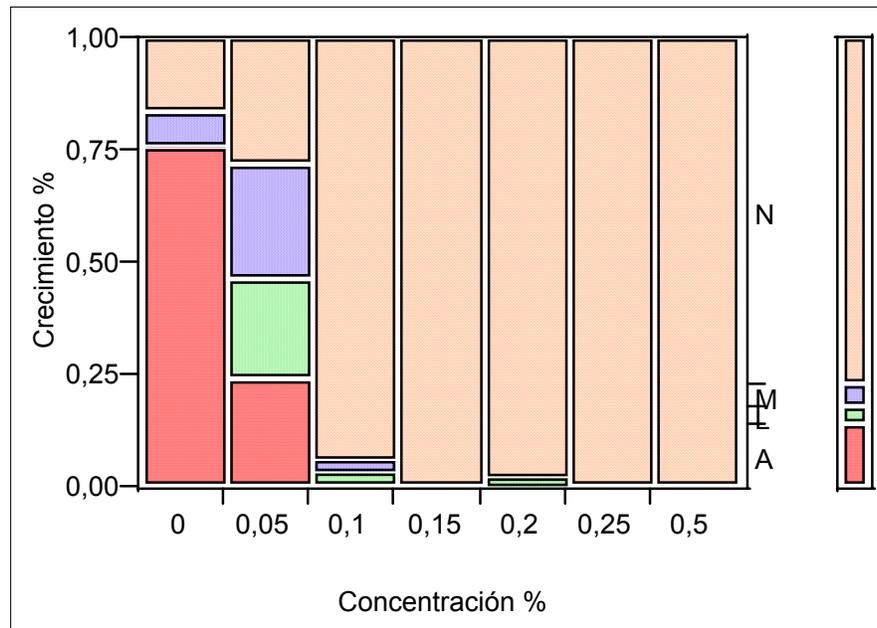


Figura 6. Distribución del crecimiento de *Cl. perfringens* (%) por concentración

De la Figura anterior es posible apreciar que el testigo (concentración 0.00%) presenta mayor nivel de crecimiento abundante, alcanzando un 75% (Anexo 4), el nivel negativo presente en esta concentración corresponde al tiempo 0 donde el efecto inhibitor aun no es observable, dejando ver que el microorganismo sin inhibidor prolifera rápidamente discrepando de las siguientes concentraciones en donde el crecimiento abundante disminuye acentuadamente a partir de la mínima concentración (0.05%), en la cual se presentan los cuatro niveles de crecimiento, sin embargo el negativo (27.7%) predomina sobre los demás niveles. En las siguientes concentraciones el nivel de crecimiento negativo es absoluto para 0.15 0.25 y 0.50%, y en un 94 y 98% para las concentraciones

0.10 y 0.20 % respectivamente mientras que el resto del crecimiento de estas concentraciones es para los niveles leve y moderado presentes solo en la fracción 1 (Cuadro 11). Dichos resultados concuerdan con De la Fuente, (2006), quien manifiesta que las mejores concentraciones del aceite esencial de orégano (*Limpia berlandieri* Schauer) contra patógenos aerobios alimentarios (*Salmonella*, *E.coli* y *Sthaphylococcus*) fueron 0.15 y 0.20%.

La Figura 7 muestra el porcentaje de crecimiento microbiano obtenido en función a la fracción estudiada, incluyendo el testigo correspondiente a la concentración de 0.00%.

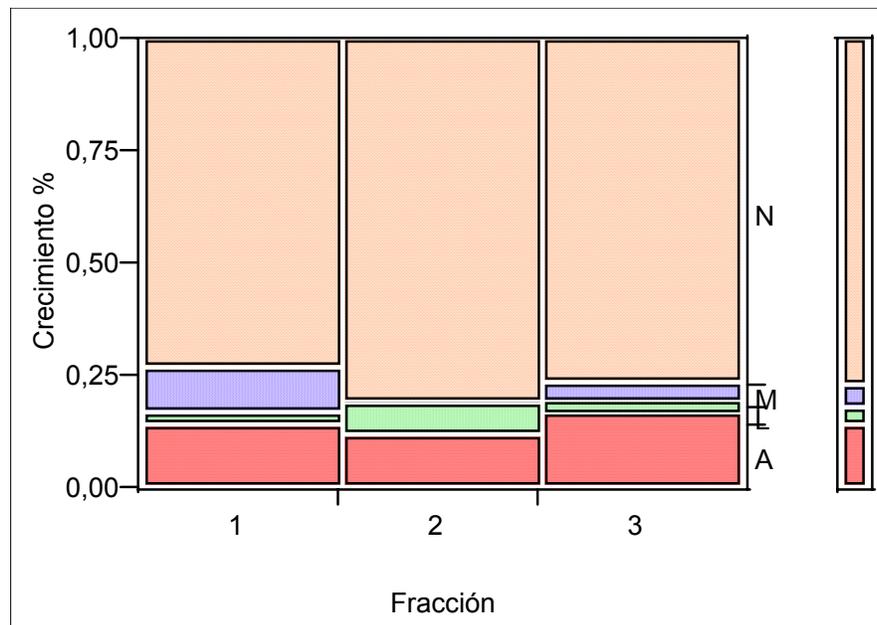


Figura 7. Distribución del crecimiento de *Cl. perfringes* (%) por fracción incluyendo el testigo (0.00%)

Se observa que el nivel negativo es mayoritario en las tres fracciones destacando aun más en la fracción 2 (80.95%), donde también se presenta el nivel de crecimiento leve (7.14%) en mayor proporción, mientras que el nivel

abundante (11.90%) es el menor en las tres fracciones. En las fracciones 1 y 3 se manifiestan los cuatro niveles de crecimiento, para la fracción 1 el crecimiento negativo es de 73.02%, el moderado de 10.32%, el leve de 2.38% y el abundante de 14.29%. En la fracción 3 el crecimiento negativo es de 76.19%, el moderado de 4.76%, el leve de 2.38% y el abundante 16.67%.

En cada una de las fracciones existe una cantidad de crecimiento abundante, tal que en su mayoría corresponde al testigo (concentración 0.00%), por tal motivo se muestra la Figura 8, eliminando el testigo.

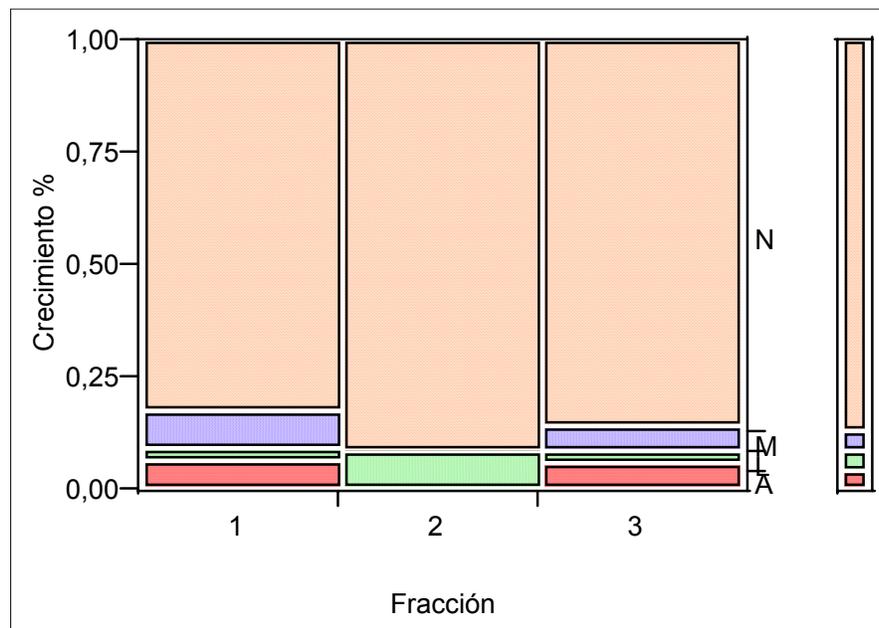


Figura 8. Distribución del crecimiento de *Cl. perfringes* (%) por fracción excluyendo el testigo (0.00%)

Una vez excluido el testigo (Figura 8) se logra observar de mejor manera el efecto inhibitorio; donde el nivel de crecimiento abundante se reduce considerablemente en las fracciones 1 y 3 (6.48 y 5.56% respectivamente) que corresponde solo a la concentración de 0.05% según al Figura 6, el nivel negativo para estas fracciones es de 82.41 y 86.11%, el moderado de 8.33 y 5.56% y el

leve de 2.78% para cada una; mientras que en la fracción 2 solo se encuentran los niveles negativo (91.67%) y leve (8.33%) presentándose como la mejor fracción por su alto contenido de timol (77.40%). Estos resultados discrepan con los obtenidos por Morales Ángeles (2005) quien menciona que las mejores fracciones de aceite esencial de orégano son las que se componen por porcentajes semejantes de sus componentes.

En la Figura 9 se presenta el factor tiempo a través del cual se observa el crecimiento microbiano.

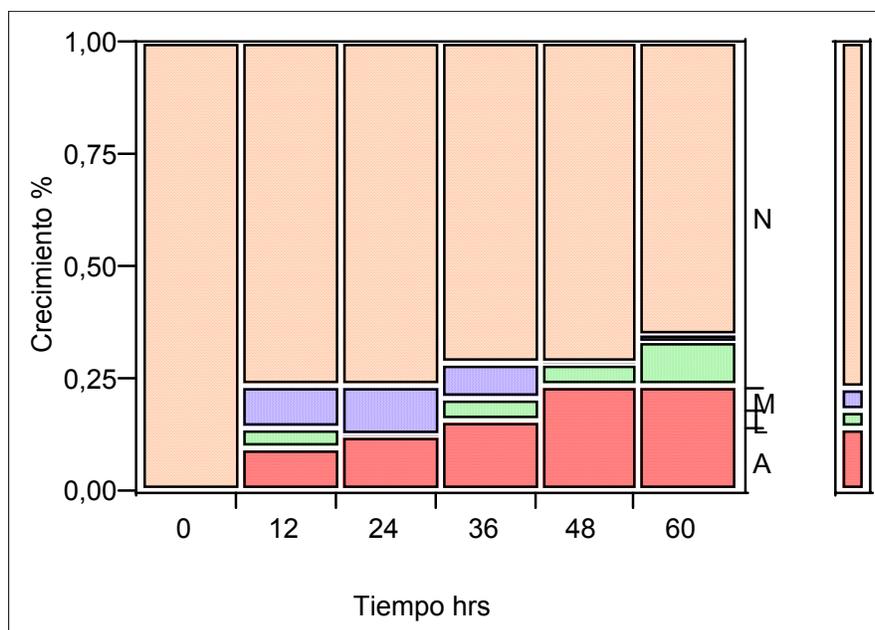


Figura 9. Distribución del crecimiento de *Cl. perfringens* (%) por tiempo (hr) incluyendo el testigo (0.00%)

En la presente Figura 9 claramente se observa que la mayor proporción de crecimiento es la asignada como nula, para todos los tiempos, disminuyendo a través de las horas (10.00, 76.19, 76.19, 71.43, 71.43 y 65.08% respectivamente) seguida del crecimiento abundante (0.00, 9.52, 12.70, 15.87, 23.81, y 23.81% respectivamente), el nivel de crecimiento moderado se presenta en porciones semejantes a las 12, 24, y 36 hr (9.52, 11.11 y 7.94% respectivamente)

disminuyendo marcadamente a las 60 hr (1.59%) El nivel leve se presenta sin cambios (4.76%) a las 12, 36, y 48 hr y a las 60 aumenta (9.52%). Al tiempo de las 0 hr se presenta solo el nivel negativo ya que en este tiempo el inhibidor aun no ejerce su efecto y por lo tanto no es evaluado. El nivel que se encuentra de crecimiento abundante corresponde en gran medida al testigo sin inhibidor como se puede corroborar en la Figura 10 donde es posible observar con más claridad el fenómeno de inhibición excluyendo el testigo y comparando cada uno de los tiempos donde resulta menor el porcentaje de nivel abundante.

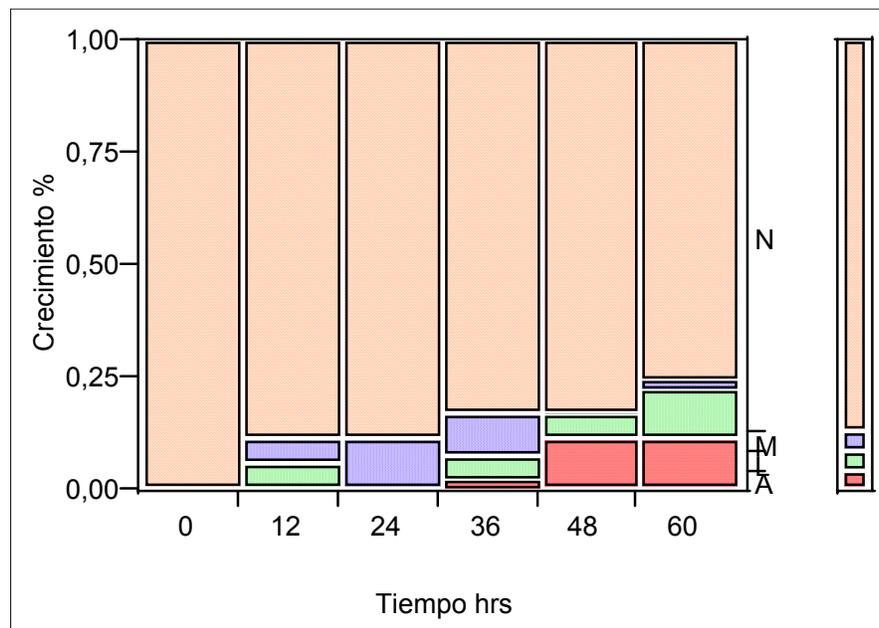


Figura 10. Distribución del crecimiento de *Cl. perfringens* (%) por tiempo (hr) excluyendo el testigo (0.00%)

El efecto del inhibidor se ve reflejado en el porcentaje de crecimiento a través del tiempo según la Figura 10, en donde en comparación con la Figura 9, a las 12 y 24 hr el crecimiento abundante es eliminado. A las 36, 48 y 60 hr el crecimiento abundante se presenta en 1.85% para la primera y 11.11 % para las ultimas dos, esto comparado con la Figura 9 representa una fuerte disminución; el

nivel de crecimiento pertenece a la concentración de 0.05% (Figura 6) de las fracciones 1 y 3(Figura 8). El crecimiento leve se encuentra en las mismas proporciones de la Figura anterior es decir no se modifico al eliminar el testigo, sin embargo el nivel moderado disminuye a las 12 hr (5.56%).

4.2.2 Valoración cualitativa del efecto antimicrobiano sobre *B. cereus*

Los resultados del tratamiento con las tres fracciones de aceite esencial de orégano sobre inóculos de *B. cereus*, son presentados en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Asignación del crecimiento para *B. cereus*

Frac.	[]%	Tiempo (hrs.) y asignación de crecimiento																	
		0			12			24			36			48			60		
1	0.00	N	N	N	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	
1	0.05	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	L	L
1	0.10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	0.15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	0.20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	0.25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	0.50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.00	N	N	N	M	A	A	M	A	A	M	A	A	M	A	A	M	A	A
2	0.05	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	0.50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	0.00	N	N	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	0.05	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M	M	N	M	A	N	M	A	N
3	0.10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	0.15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	0.20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	0.25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	0.50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

En la Figura 11 se presenta el análisis categórico vía la distribución de χ^2 ($P \leq 0.01$) del crecimiento microbiano en cada una de las concentraciones evaluadas.

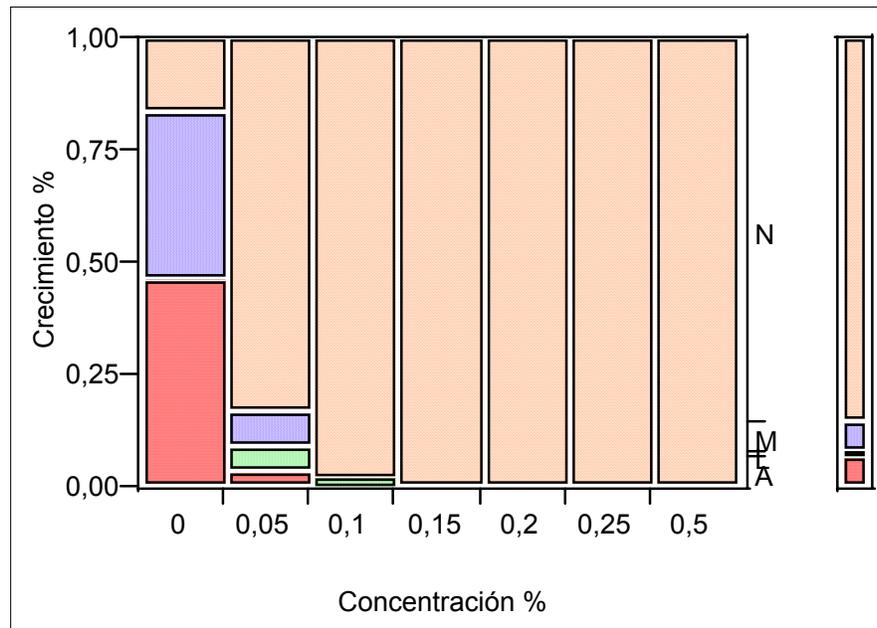


Figura 11. Distribución del crecimiento de *B. cereus* (%) por concentración

En la Figura 11 se presenta la distribución del crecimiento microbiano en cada una de las concentraciones evaluadas donde el testigo (concentración 0.00%) es la que presenta mayor nivel de crecimiento abundante adquiriendo un 46.3%, el nivel negativo presente en esta concentración corresponde al tiempo 0 donde el efecto inhibitor aun no se evalúa (Cuadro 12). *B. cereus* igual que *Cl. perfringes* es un microorganismo que se desarrolla rápidamente en ausencia de inhibición. Para la siguiente concentración de 0.05% el nivel abundante disminuye cuantiosamente a 3.7% presentando también niveles leve (5.5%) y moderado (7.4%) presentes en las fracciones 1 y 3 (Figura 13), aquí el crecimiento negativo aumenta ampliamente (83.3%), la concentración 0.10% cuenta con presencia de

nivel leve (1.85%) que se encuentra presente solo en la fracción 1(Figura 12) el resto es nivel negativo (98.15%). Las concentraciones 0.15, 0.20, 0.25 y 0.5 alcanzan el 100% de nivel de crecimiento negativo y por lo tanto son las mejores concentraciones para *B. cereus*, nuevamente coincidiendo con De la Fuente (2006).

La Figura 12 muestra el porcentaje de crecimiento microbiano obtenido en función a la fracción en estudio, incluyendo el testigo que corresponde a la concentración de 0.00%.

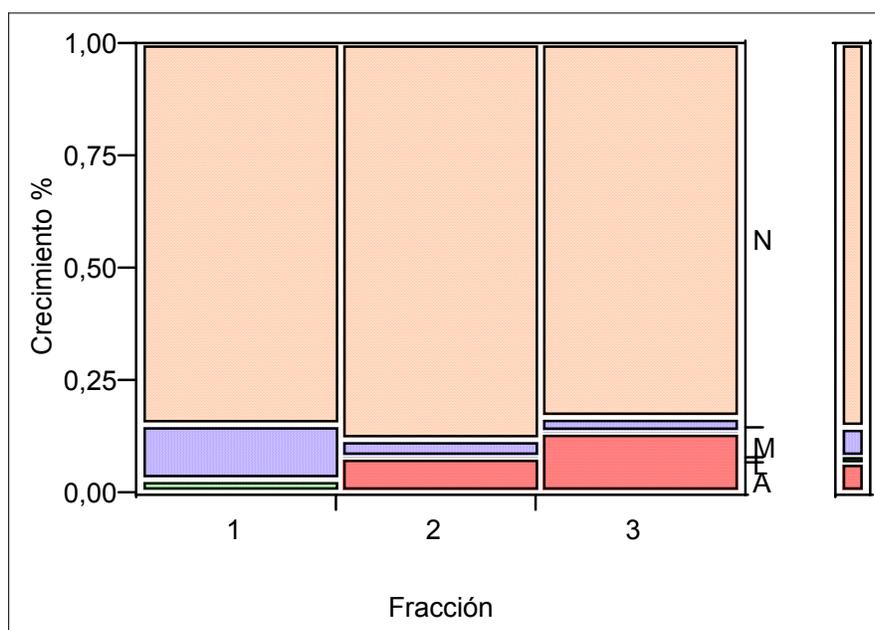


Figura 12. Distribución del crecimiento de *B. cereus* (%) en cada fracción incluyendo el testigo (0.00%)

En la presente Figura el porcentaje del crecimiento negativo igual que para *Cl. perfringes* es el mayor sobresaliendo aun más en la fracción 2(88.10%), en tanto que en las fracciones 1 y 3 es de 84.92 y 83.33% respectivamente. El nivel moderado se presenta mayormente en la fracción 1 (11.90%), para las fracciones

2 y 3 disminuye su presencia (3.97 y 3.17% en orden); el nivel leve solo se presenta en 3.17% para la fracción 1 y el nivel abundante en las fracciones 2 (7.94%) y 3 (13.49%). Este último nivel de crecimiento pertenece en su mayor parte al testigo (concentración 0.00%) por tal motivo se muestra la Figura 13, más adelante, eliminando el testigo en donde el crecimiento abundante corresponde sólo en presencia de inhibición.

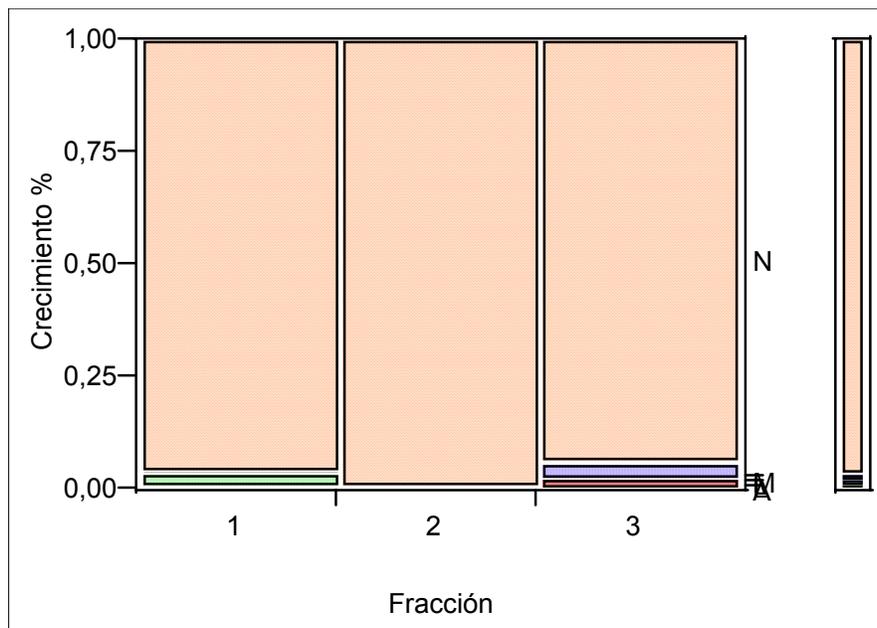


Figura 13. Distribución del crecimiento de *B. cereus* microbiano (%) en cada fracción excluyendo el testigo (0.00%)

En la Figura 13 se puede observar el efecto inhibitorio con más claridad eliminando el testigo. Se presenta la fracción 2 como la mejor ya que alcanza un nivel negativo en su totalidad, misma fracción que fue la mas efectiva para *Cl. perfringes*, seguida por la fracción 1 con 96.3% de crecimiento en nivel negativo y 3.7% de nivel leve. Por ultimo la fracción 3 presenta 94.4% de crecimiento en nivel negativo, 3.7% en nivel moderado y 1.85% en nivel abundantes esto vuelve a discrepar con Morales (2005) y por otra parte con Hernández (2005) que

reportan mayor acción inhibitoria en presencia de sinergismo de los componentes del aceite esencial de orégano, dichos estudios fueron realizados con microorganismos aerobios no esporulados.

En la Figura 14 se evaluó el factor tiempo a través del cual se observa el crecimiento microbiano.

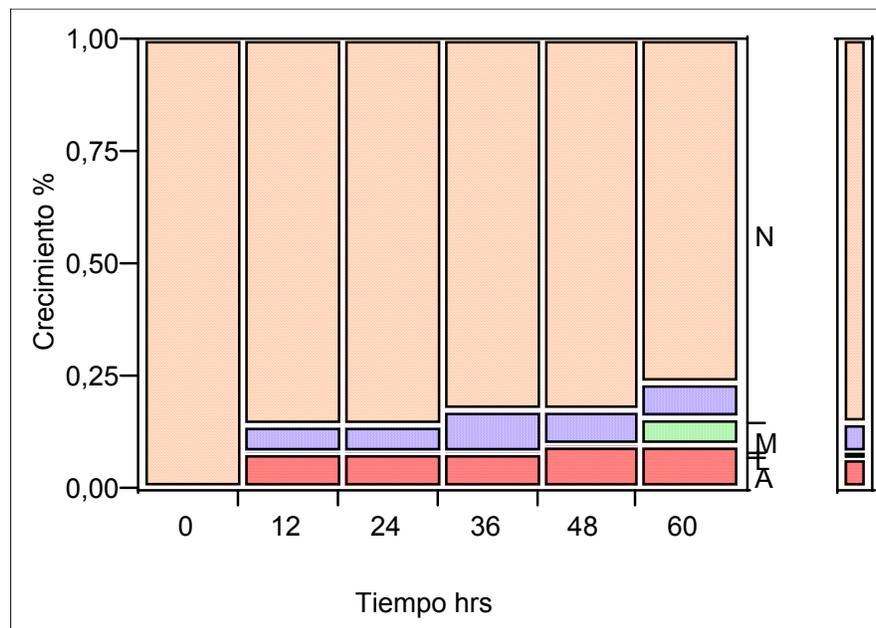


Figura 14. Distribución del crecimiento de *B. cereus* (%) por tiempo incluyendo el testigo (0.00%)

La Figura 14 muestra que el crecimiento de mayor proporción es el negativo disminuyendo conforme transcurre el tiempo. (100, 85.71, 85.71, 82.54, 82.54 y 76.19% ordenadamente), seguida del nivel abundante con 7.94% para las 12, 24 y 36 hr y 9.52% para las 48 y 60 hr el nivel moderado se presenta en 6.35% a las 12 y 24 hr, en 9.52% a las 36 hr y 7.94% a las 48 y 60 hr. Por ultimo el nivel leve solo se presenta a las 60 hr en un 6.35%. Al tiempo de las 0 hr se presenta sólo el nivel negativo ya que en este tiempo el inhibidor aun no ejerce su efecto y por lo tanto no es evaluado. En la Figura 15 se observa con más claridad

el fenómeno de inhibición excluyendo el testigo ya que los niveles de crecimiento abundante y moderado pertenecen en gran medida al testigo sin inhibición.

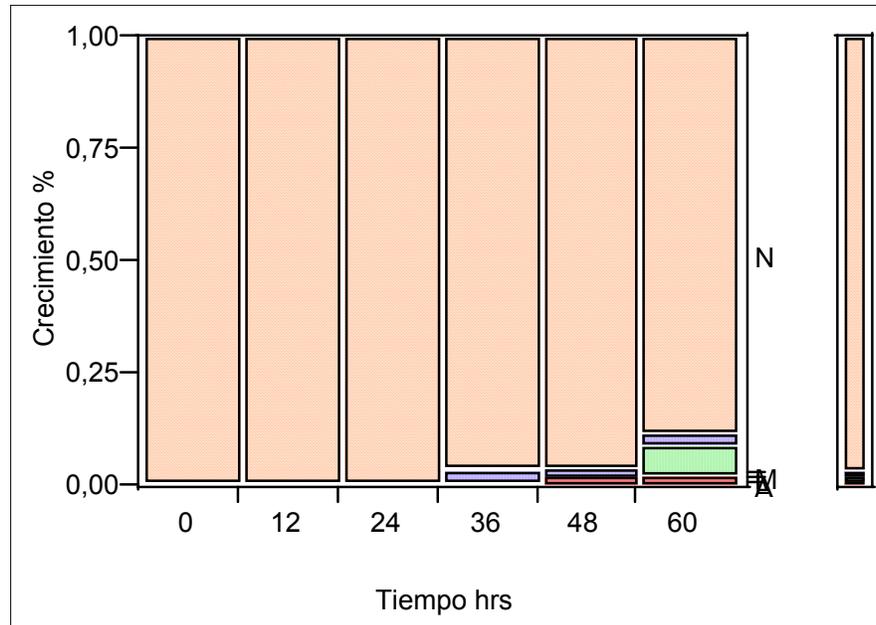


Figura 15. Distribución del crecimiento *B. cereus* (%) por tiempo (hr) excluyendo el testigo (0.00%)

El efecto de inhibición se expresa en la cantidad de crecimiento a través del tiempo según la Figura 15, que comparada con la Figura 14, el crecimiento abundante para las 12, 24 y 36 hr desaparece y a las 48 y 60 hr se presenta en un porcentaje de 1.85; esta mínima cantidad de nivel abundante corresponde a la concentración 0.05% de la fracción 3 reflejado en las Figuras 11 y 13. De igual manera se observa un marcado decremento del nivel moderado que desaparece a las 12 y 24 hr, a las 36 hr se presenta en un 3.70% y para los dos últimos tiempos en un 1.85% de crecimiento estos niveles corresponden a la concentración 0.05% de la fracción 3 también reflejado en las Figuras 11 y 13. Por ultimo el nivel leve no se modifica al excluir el testigo y este pertenece a las concentraciones 0.05 y 0.10% de la fracción 1.

A continuación se presenta la figura 16 que expresa la distribución de datos para cada microorganismo evaluado conforme se manifestaron las observaciones para cada nivel de crecimiento asignado, con el fin de sustentar las figuras anteriormente analizadas.

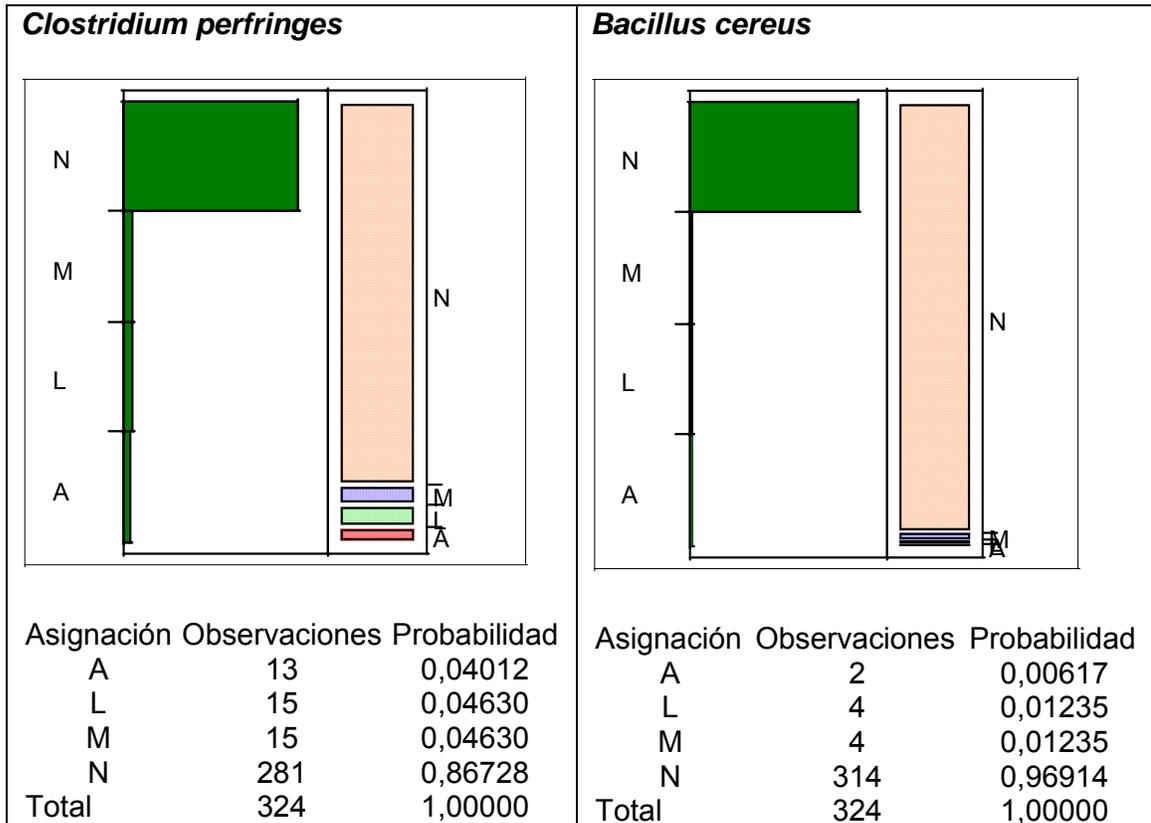


Figura 16. Distribución de datos del crecimiento cualitativo por microorganismo

La presente distribución del crecimiento microbiano muestra que para *C. perfringens* existen 281 observaciones con crecimiento negativo (86%) y las observaciones restantes se reparten equitativamente entre los niveles de crecimiento positivo (abundante, leve y moderado) en tanto que el número de observaciones de crecimiento negativo para *B. cereus* es de 96% del total, el resto se distribuye en observaciones de crecimiento positivo, por tanto es posible

aseverar que, *B. cereus* presenta mayor sensibilidad frente al aceite esencial de orégano. Dichos resultados concuerdan con los estudios realizados por Maguregui (2004) donde se probó el efecto antimicrobiano a partir de extractos de bagazo del orégano contra patógenos alimentarios (*E. coli* O157:H7 ATCC 4388, *S. thipimorium* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* y *L. monocitogenes*) en que el microorganismo con mayor sensibilidad fue *B. cereus*.

4.3 ETAPA 3. Valoración cuantitativa del efecto antimicrobiano

En esta etapa se presentan los resultados cuantitativos del efecto antimicrobiano ejercido por las diferentes fracciones de aceite esencial de orégano aplicadas a los microorganismos en estudio.

4.3.1 Valoración cuantitativa del efecto antimicrobiano sobre *Cl.*

Perfringes

Los resultados obtenidos de las lecturas de crecimiento microbiano de *Cl. perfringes* se muestran en el Cuadro 13 donde se observa el efecto inhibitorio de cada fracción en interacción con el tiempo y la concentración, los resultados se muestran como las medias del ANVA realizado ($p \leq 0.0001$).

Cuadro 13. Medias de crecimiento microbiano de *Cl. perfringens* en función a turbidez en unidades de absorbancia a 450 nm.

Fracción	Concentración %	Tiempo (hr)					
		0	12	24	36	48	60
1	0.00	0,050	0,967	1,163	1,296	1,298	1,163
1	0.05	0,030	0,033	0,065	0,196	0,308	0,435
1	0.10	0,006	0,000	0,000	0,011	0,035	0,050
1	0.15	0,020	0,032	0,030	0,026	0,038	0,036
1	0.20	0,020	0,050	0,055	0,062	0,056	0,049
1	0.25	0,020	0,008	0,007	0,007	0,014	0,008
1	0.50	0,000	0,000	0,043	0,060	0,072	0,113
2	0.00	0,118	1,137	1,277	1,333	1,304	1,246
2	0.05	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004
2	0.10	0,020	0,000	0,008	0,009	0,015	0,019
2	0.15	0,030	0,024	0,023	0,026	0,041	0,021
2	0.20	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0.25	0,022	0,188	0,182	0,214	0,221	0,222
2	0.50	0,022	0,028	0,028	0,085	0,081	0,113
3	0.00	0,050	1,083	1,294	1,324	1,367	1,233
3	0.05	0,068	0,042	0,086	0,147	0,211	0,248
3	0.10	0,072	0,042	0,051	0,058	0,066	0,072
3	0.15	0,048	0,066	0,089	0,085	0,102	0,100
3	0.20	0,060	0,046	0,038	0,038	0,061	0,065
3	0.25	0,023	0,058	0,081	0,043	0,059	0,045
3	0.50	0,037	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000

En la Figura 17 se muestra el comportamiento del crecimiento microbiano en cada una de las fracciones en función a las concentraciones evaluadas.

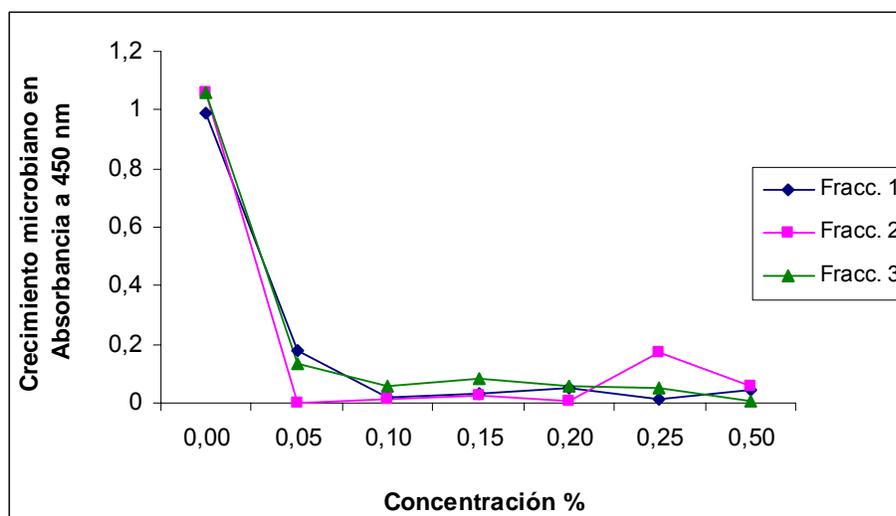


Figura 17. Crecimiento de *Cl. perfringens* en función de la fracción y la concentración (%)

En la Figura 17, se observa que las tres fracciones reportan porcentajes de crecimiento alrededor de la unidad de absorbancia en la concentración de 0.00%, disminuyendo drásticamente en todas las concentraciones siguientes presentando diferencias estadísticamente significativas y presentando porcentajes de desarrollo microbiano menores a 0.18 unidades de absorbancia (Anexo 14). De acuerdo con la prueba de t de Student la fracción que presenta mayor constancia y niveles inferiores de crecimiento estadísticamente semejantes con un ligero incremento en las últimas dos concentraciones es la 2, tal como se encontró en el estudio cualitativo para *Cl. perfringens*. Seguida de la fracción 1 que se mantiene constante con niveles estadísticamente semejantes de los niveles inferiores y por último se encuentra la fracción 3, contrastando con las aportaciones de Morales (2005) y De la Fuente (2006), en estudios con microorganismos aerobios no esporulados donde las fracciones con mejor efecto antimicrobiano son las que contienen cantidades semejantes de sus componentes timol y carvacrol.

Enseguida se presenta la Figura 18 donde se muestra el crecimiento microbiano de las concentraciones (%) en estudio a través del tiempo.

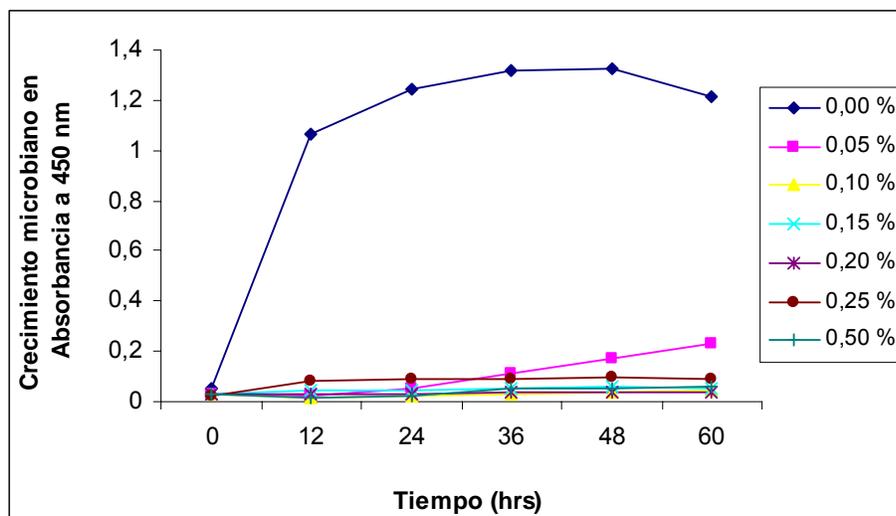


Figura 18. Crecimiento de *Cl. perfringens* a diferente concentración (%) en función del tiempo

La Figura 18 muestra la tendencia del comportamiento de *Cl. perfringens* ante las diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano, donde es evidente que el crecimiento microbiano en la concentración 0.00 % (testigo) se encuentra muy por encima de las demás concentraciones, reafirmando la efectividad del aceite esencial de orégano como inhibidor reportado en estudios previos.

Debido a la gran diferencia existente entre el testigo y las muestras adicionadas con aceite esencial, se dificulta la apreciación de las diferencias entre estas, por lo cual se presenta la Figura 19 a fin observar con mayor claridad el comportamiento de las concentraciones evaluadas (0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.5%) a través del tiempo excluyendo el testigo (0.00%).

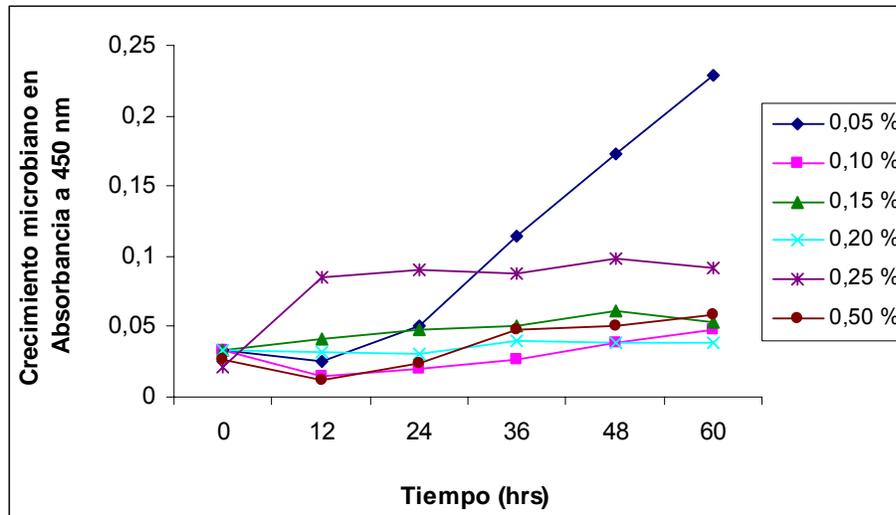


Figura 19. Crecimiento de *Cl. perfringens* a diferente concentración (%) en función del tiempo (hr) excluyendo el testigo (0.00%)

A pesar de que todas las concentraciones poseen actividad antimicrobiana respecto del testigo, existen diferencias entre estas. La concentración que menor efecto antimicrobiano presenta respecto al testigo es la 0.05% concordando con el análisis cualitativo anteriormente presentado, registrando los crecimientos más altos en las últimas horas seguido de la concentración 0.25% con conteos estables a partir de las 12 hr. Las concentraciones 0.10, 0.15, 0.20 y 0.5% resultan no tener diferencias significativas según la prueba de rango múltiple utilizada (t-Student, $p \leq 0.0001$), es decir registran los menores niveles de crecimiento por lo tanto se presentan como las mejores concentraciones respecto a *Cl. perfringens*. Dichas concentraciones coinciden con Catonga (2006) en estudios sobre carne de cerdo, tratados con aceite esencial de orégano.

4.3.2 Valoración cuantitativa del efecto antimicrobiano sobre *B.*

cereus

Los resultados obtenidos en la lectura de crecimiento microbiano de *B. cereus* se muestran en la Cuadro 14 donde se observa el efecto inhibitorio de cada fracción a diferente concentración en relación al tiempo, los resultados se muestran como las medias del ANVA realizado ($p \leq 0.0001$).

Cuadro 14. Medias de crecimiento de *B. cereus* en función a turbidez en unidades de absorbancia a 450 nm.

Fracción	Concentración %	Tiempo (hr)					
		0	12	24	36	48	60
1	0.00	0,050	0,843	1,126	1,314	1,325	1,280
1	0.05	0,098	0,095	0,142	0,260	0,302	0,421
1	0.10	0,043	0,044	0,056	0,072	0,085	0,120
1	0.15	0,076	0,082	0,085	0,108	0,106	0,093
1	0.20	0,000	0,049	0,056	0,057	0,062	0,069
1	0.25	0,030	0,028	0,021	0,029	0,037	0,048
1	0.50	0,000	0,087	0,080	0,087	0,071	0,095
2	0.00	0,050	0,714	0,868	1,094	1,158	1,029
2	0.05	0,020	0,020	0,000	0,000	0,002	0,032
2	0.10	0,050	0,057	0,025	0,028	0,036	0,066
2	0.15	0,024	0,024	0,014	0,015	0,019	0,021
2	0.20	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
2	0.25	0,174	0,174	0,204	0,215	0,252	0,244
2	0.50	0,050	0,099	0,130	0,128	0,143	0,151
3	0.00	0,050	0,999	1,181	1,299	1,235	1,188
3	0.05	0,050	0,050	0,073	0,117	0,153	0,211
3	0.10	0,070	0,083	0,055	0,069	0,072	0,088
3	0.15	0,094	0,088	0,105	0,094	0,104	0,125
3	0.20	0,030	0,039	0,065	0,058	0,078	0,079
3	0.25	0,060	0,060	0,060	0,051	0,075	0,067
3	0.50	0,030	0,047	0,031	0,040	0,062	0,047

En la figura 20 se muestra el comportamiento del crecimiento de *B. cereus* a través de las fracciones en función a las concentraciones evaluadas.

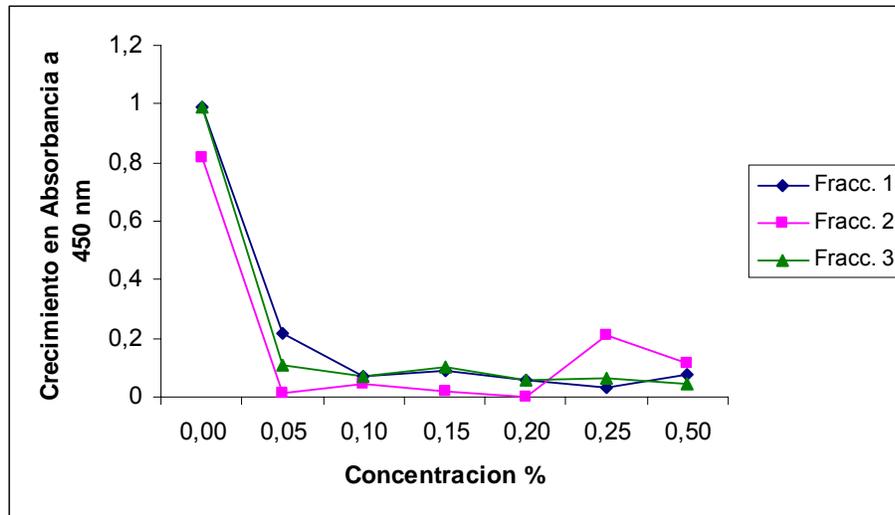


Figura 20. Crecimiento de *B. cereus* en función de la fracción y concentración (%)

La figura 20 muestra como los más altos conteos de crecimiento microbiano son los registrados para las tres fracciones en la concentración de 0.00%, disminuyendo fuertemente en las concentraciones siguientes, esto es prueba del efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano. De acuerdo con el análisis de pruebas de rango múltiple ($p \leq 0.0001$) realizado, la fracción 2 presenta mayor constancia en los niveles inferiores de crecimiento reportándolos como estadísticamente semejantes, obteniendo también un ligero incremento en las últimas dos concentraciones, por tal motivo dicha fracción resulta ser la mejor en la inhibición de *B. cereus* y esto coincide con el análisis cualitativo para este microorganismo y para *C. perfringes*.

Por otra parte las fracciones 1 y 3 resultan ser estadísticamente semejantes según el ANVA realizado, lo que las postula como las segundas mejores después de la 2. Reiteradamente estos resultados mantienen discordancia con las aportaciones de Morales (2005), De la Fuente (2006) y Catonga (2006), quienes aseveran que el mejor efecto antimicrobiano para

microorganismos aerobios no esporulados se logra con porciones semejantes en los componentes timol y carvacrol del aceite esencial de orégano.

La Figura 21 que presenta el crecimiento microbiano de las concentraciones (%) en estudio a través del tiempo.

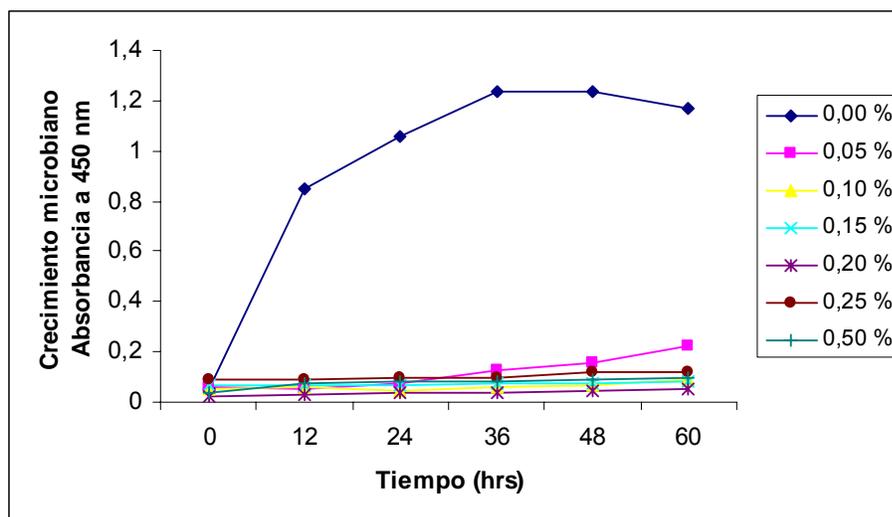


Figura 21. Crecimiento de *B. cereus* a diferente concentración (%) en función del tiempo (hr)

La Figura 21 muestra claramente el desarrollo de *B. cereus* donde el crecimiento microbiano a la concentración 0.00% (testigo) presenta niveles de crecimiento superiores a el resto de las concentraciones, corroborando la acción inhibitoria probada del aceite esencial de orégano.

De igual manera que para *Cl. perfringes* la diferencia que existe entre el testigo y las muestras adicionadas con aceite esencial es tan pronunciada que se complica apreciar las diferencias entre concentraciones, por tal motivo se presenta la Figura 22 a fin de observar con mayor claridad el comportamiento de las concentraciones evaluadas (0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.5%) a través del tiempo excluyendo el testigo (0.00%).

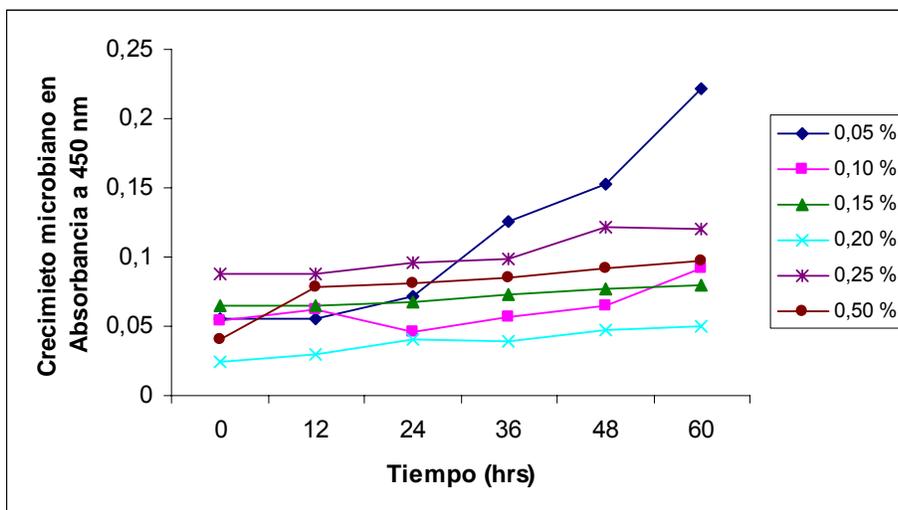


Figura 22. Crecimiento de *B. cereus* a diferente concentración (%) en función del tiempo (hr) excluyendo el testigo (0.00%)

Aún y cuando todas las concentraciones poseen actividad antimicrobiana respecto del testigo, existen diferencias entre estas (Figura 22). La concentración que menor efecto antimicrobiano presenta respecto al testigo es la 0.05% coincidiendo en el análisis cualitativo de *B. cereus*, seguido de la concentración 0.25%. Las concentraciones 0.10, 0.15, 0.20 y 0.5% resultan no tener diferencias significativas según la Prueba t de Student ($p \leq 0.0001$) realizada, es decir registran los menores niveles de crecimiento y se presentan como las mejores fracciones respecto a *B. cereus*. Dichas concentraciones coinciden con De la Fuente (2006) y Catonga (2006), en la evaluación del aceite esencial de orégano como inhibidor de patógenos de las carnes de pollo y cerdo respectivamente.

V CONCLUSIONES

Los resultados derivados de la presente investigación fundamentan la presencia de propiedades antimicrobianas presentes en el aceite esencial de orégano ya que demostró inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos anaerobios alimentarios *C. perfringes* y *B. cereus*, obteniendo conteos de crecimiento inferiores al testigo.

La fracción de aceite de orégano con la que se logró el mayor efecto de inhibición para los dos microorganismos evaluados fue la 2, conformada por 77.40% de timol. Esto debido a la cantidad abundante de timol presente en la fracción, lo que permite poner bajo discusión su actividad sinergista ya antes citada, en estudios previos. Las fracciones 1 (carvacrol 38.25%) y 3 (27.67% timol y 11.31% carvacrol) ejercen su poder de inhibición con un porcentaje de sus componentes mucho menor lo que impide realizar una mejor inhibición.

El estudio cualitativo ubica a *B. Cereus* como el microorganismo con mayor sensibilidad al aceite esencial de orégano. Mientras que el análisis cuantitativo establece que el mejor efecto inhibitorio tanto para *C. perfringes* como para *B. cereus* se logra obtener a las concentraciones de 0.10, 0.15, 0.20, 0.50%, las cuales presentan comportamiento estadísticamente semejante. Por lo tanto se sugiere, en función a rentabilidad hacer uso de la menor concentración (0.10%).

VI LITERATURA CITADA

Alatraste Montiel K.J. 2004. Mezclas ternarias de antimicrobianos naturales y/o sintéticos como agentes inhibidores del crecimiento en levaduras. Tesis Maestría en ciencia de Alimentos. Universidad de las Américas. Cholula, Puebla, México.

Anónimo. 2007. Conservas Alimenticias. Disponible en:

[http://kogi.udea.edu.co/talleres/Productos%20pecuarios/Tema%207b%20\(conservas%20alimenticias\).doc](http://kogi.udea.edu.co/talleres/Productos%20pecuarios/Tema%207b%20(conservas%20alimenticias).doc)

Arcila L.C., Loarca P.C, Guadalupe, Lecona U.G. Salvador *et al.* 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Disponible en:

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222004000100015&lng=es&nrm=iso

Badui Dergal S. 1999. Química de los alimentos. Ed. Pearson Educación. México, DF. Págs. 462-467.

Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. y Zucca, J. 1995. Microbiología Alimentaria Vol. 1. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Págs. 33,-35, 84,85, 89, 93-101, 110,111.

Brody Aaron L., 1996. Envasado de alimentos en atmósferas controladas, modificadas y a vacío. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Págs. 1-3,11.

Campomanes M. J. P. 2003. Evaluación del efecto de mezclas ternarias y cuaternarias de antimicrobianos sobre *Aspergillus parasiticus*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de las Américas, Puebla disponible en:

http://140.148.3.250/udl_a/servlet/mx.udlap.ict.tales.html.Block?Thesis=1111&Type=O

Catonga Casbis A. 2006. Aplicación de aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Shauer) en carne de cerdo para su conservación. Tesis (Ing. en Ciencia y Tecnología de Alimentos). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2006. Estudio de mercado y comercialización del orégano. Gerencia de investigación de cadenas Productivas. Zapopan, Jalisco, México.

Cortés José A. 2005. Recursos Didácticos para Biología, Buscador de Medios de Cultivo para Microbiología. Disponible en:

<http://www.joseacortes.com/microbiologia/buscamedios/index.htm>

De La Fuente Estupiñán M. P. 2006. Aplicación de aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) como antimicrobiano en patógenos de importancia en la carne de res. Tesis (Ing. en Ciencia y Tecnología de Alimentos). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Desrosier Norman W. 1987. Conservación de alimentos. Ed. Continental. México DF. Págs. 197, 203,215.

González Paulino H. 2005. Determinación de la capacidad antimicrobiana del látex de Sangregado (*Croton lechleri*). Tesis Ingeniería en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Hernández P.L del C. 2003. Actividad inhibitoria y letal de los extractos de ajo para *E. coli* y *L. Innocua*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de las Ameritas Puebla. Disponible en:

http://140.148.3250/udla/servlet/mx.udlap.ict.tales.html.Block?Thesis_857&Type_O

Hernandez Zamudio. 2005. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) En reunión nacional sobre el orégano (2º, 2005, CIRENA, Salaces, Chihuahua, México) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, UL. Pág. 156.

Huerta, C. 2005.Orégano Mexicano: oro vegetal. Conabio.

Disponible en:

http://www.conabio.gob.mx/institución/conabio_espanol/doctos/indice15.html

INFOAGRO. 2005. Microorganismos productores de alteraciones en los alimentos enlatados. Disponible en:

<http://www.infoagro.com/conservas/microorganismos3.asp>

Justesen U, Knuthsen P. 2001. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. Food Chemistry. Pp. 73, 245-250. Disponible en:

[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222004000100015&script=sci_ar
ttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222004000100015&script=sci_ar
ttext)

Klement Z., K. Rudolph, D.C. Sands, 1990, Methods in Phytobacteriology. Academia Kiado, Budapest. Pág.98.

Lynch M.J., Raphael S.S., Mellor L.D., Spare P.D., Inwood M.J.H.1987.Métodos de Laboratorio Vol. II Segunda edición Ed. Interamericana. México, DF. Págs. 924,928.

Madrid,A., Cenzano I. y Vicente J.M.1994.Nuevo manual de las industrias alimentarias. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. Pág. 64

Maguregui Olivas, Torres Muñoz, Gastelum Franco. Efecto antimicrobiano de extractos organicos obtenidos a partir de bagazo de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) En reunión nacional sobre el orégano (2º, 2005, CIRENA, Salaires, Chihuahua, México) Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de ciencias químicas. Pág. 177.

Mc Gimpsey, J. 1993. Orégano, *Origanum vulgare*. Crop & Food research.

Disponible en: <http://www.crop.cri.nz/psp/broadshe/oregano.htm>

Morales Ángeles G. 2005. Aplicación de aceite esencial de orégano (Limpia berlandieri Shauer) como antimicrobiano en patógenos de importancia en la carne de res. Tesis Ing. en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Mossel D.A.A., B.Moreno y C. B. Struijk. 2003. Microbiología de los alimentos. Segunda edición Ed. Acribia. Zaragoza, España. Págs. 98, 137,169, 170, 181, 185,186, 272,273

Norman W. Desrosier. 1987. Conservación de los alimentos. Ed. Continental. México D.F. Pags 11,38, 39,52, 53, 54,58.

Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A.2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. J. Ethnopharmacol. Pp. 76,201-214.Disponible en:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222004000100015&script=sci_arttext

Prescott L.M., J.P.Harley, D.A.Klein. 2004. Microbiología quinta edición Ed. Mc.Graw-Hill-Interamericana. Madrid, España Págs. 870, 886,887.

Putievsky E. 1996 Dudai N, Ravid U. Cultivation, selection and conservation of oregano species in Israel. Ed. Padulosi. Disponible en:
http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222004000100015&lng=pt&nrm=iso

Rastrelli L, Caceres A, Morales C, De Simone F, Aquino R. 1998. Iridoids from *Lippia gaveolens*. Phytochem. Pp. 1829-1832. Disponible en:

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222004000100015&script=sci_arttext

Santiesteban, A. 2002. Agentes Antimicrobianos de Alto Espectro a Partir de Mezclas de Agentes Antimicrobianos Sintéticos Naturales. Tesis de Maestría. Universidad de las Americas-Puebla.

Silva Vázquez Ramón. 2003. El Orégano (Los nuevos caminos de la agricultura). Folleto técnico CONAZA. CIRENA (Centro de Investigación para los Recursos Naturales). Salaires, López, Chihuahua.

Wagner KH, Elmadfa I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. Ann. Nutr. Metabol. 2003; 47 (3-4): 95-106.

Disponible en:

http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222004000100015&lng=pt&nrm=iso

Wilkins MB. The physiology of plant and development, McGraw-Hill. 1998- University of California-Small Farm Center. Culture Information for Oregano. Disponible en:

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222004000100015&script=sci_arttext

VII ANEXOS

Cromatografías correspondientes a la caracterización del aceite esencial de orégano

Figura A 1. Cromatografía de fracción 1 alto carvacrol

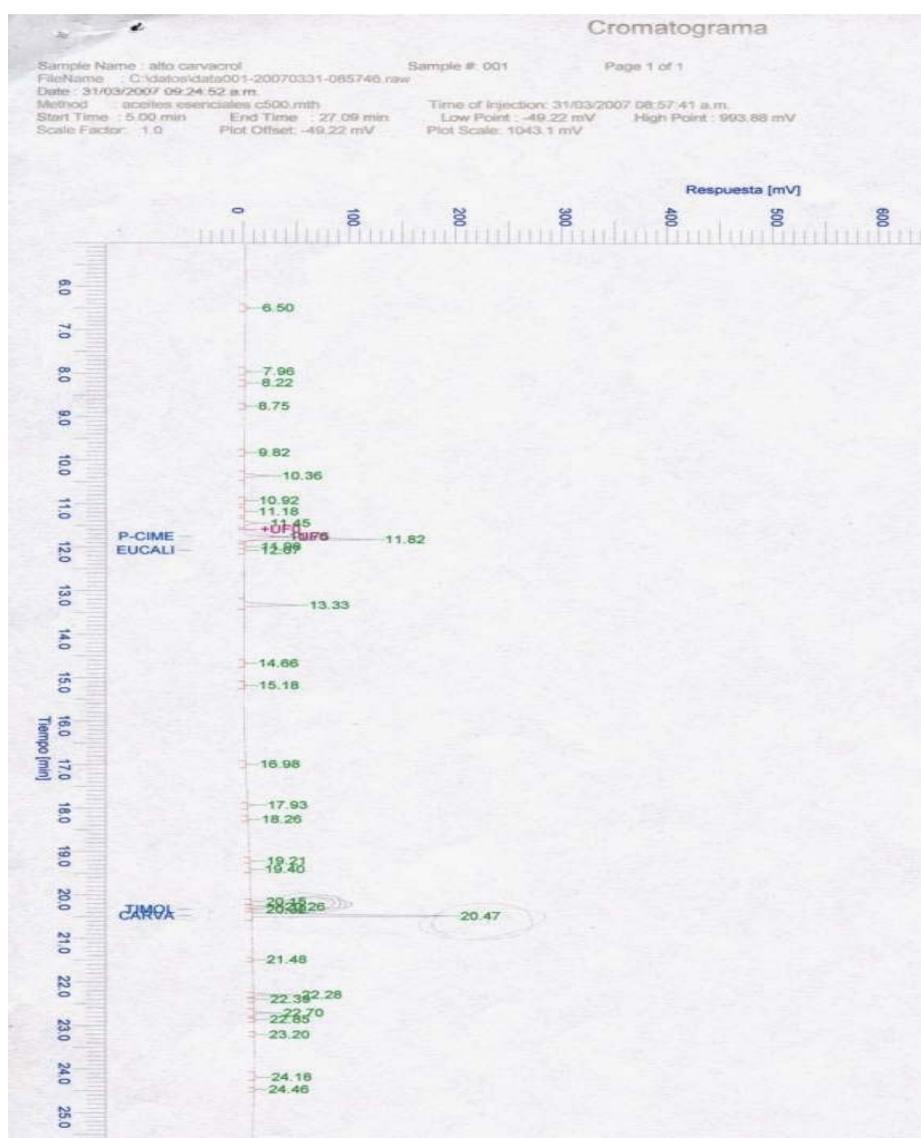


Figura A 2. Cromatografía de fracción 2 alto Timol

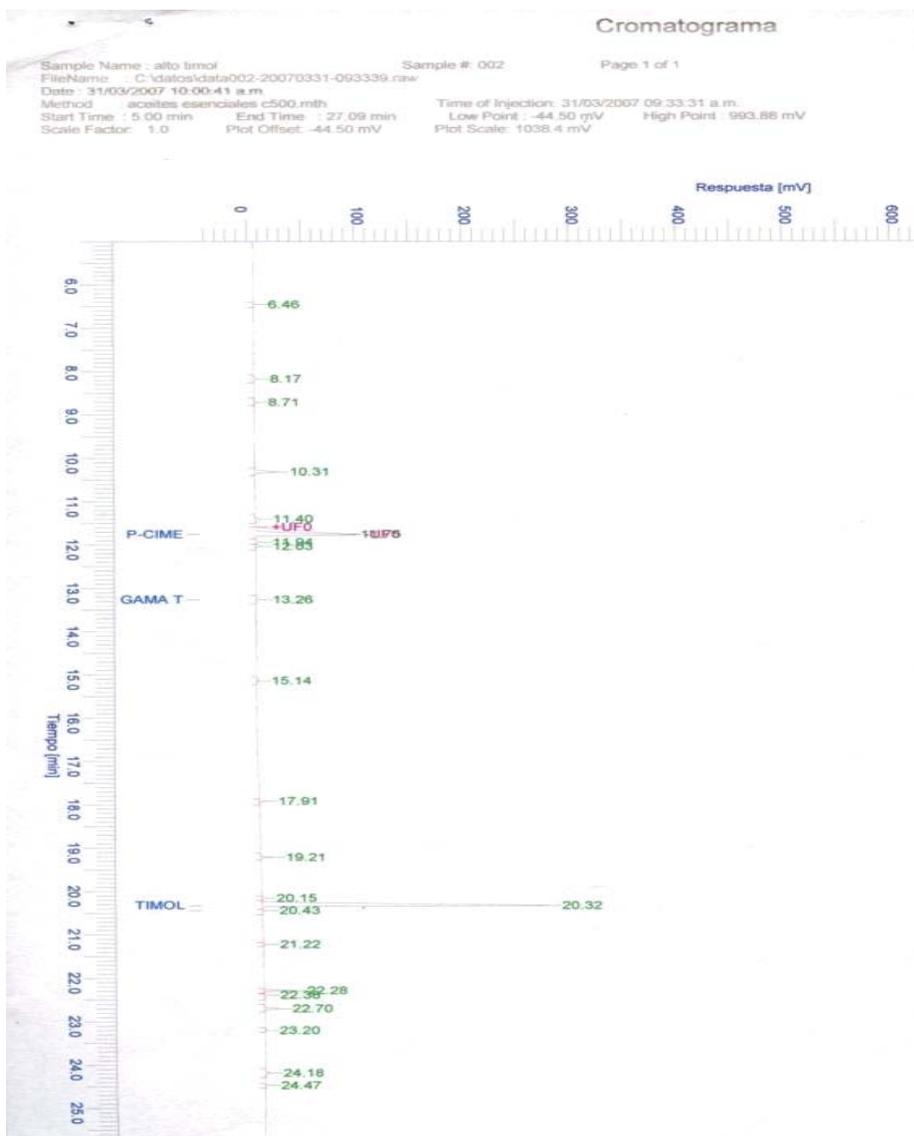
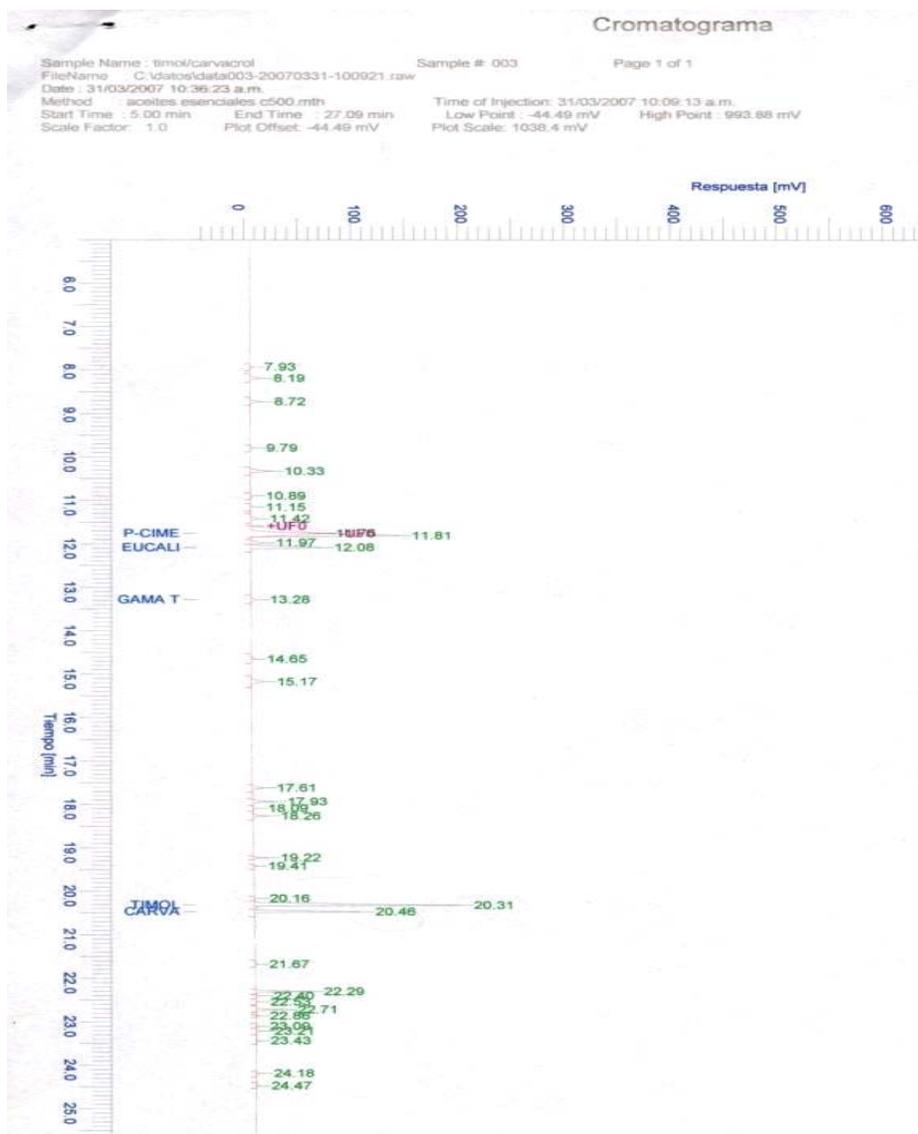


Figura A 3. Cromatografía de fracción 3 timol/carvacrol



Cuados del análisis categórico vía la distribución de $X^2(P \leq 0.01)$ del análisis cualitativo.

Clostridium perfringens

Cuadro A 4. Concentración por Crecimiento %

Observ Total % Col % Fila %	A	L	M	N	
0.00%	41 10,85 75,93 75,93	0 0,00 0,00 0,00	4 1,06 21,05 7,41	9 2,38 3,10 16,67	54 14,29
0.05%	13 3,44 24,07 24,07	12 3,17 80,00 22,22	14 3,70 73,68 25,93	15 3,97 5,17 27,78	54 14,29
0.10%	0 0,00 0,00 0,00	2 0,53 13,33 3,70	1 0,26 5,26 1,85	51 13,49 17,59 94,44	54 14,29
0.15%	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	54 14,29 18,62 100,00	54 14,29
0.20%	0 0,00 0,00 0,00	1 0,26 6,67 1,85	0 0,00 0,00 0,00	53 14,02 18,28 98,15	54 14,29
0.25%	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	54 14,29 18,62 100,00	54 14,29
0.50%	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	54 14,29 18,62 100,00	54 14,29
	54 14,29	15 3,97	19 5,03	290 76,72	378

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

Cuadro A 5. Fracción por Crecimiento %

Observ Total % Col % Fila %	A	L	M	N	
1	18 4,76 33,33 14,29	3 0,79 20,00 2,38	13 3,44 68,42 10,32	92 24,34 31,72 73,02	126 33,33
2	15 3,97 27,78 11,90	9 2,38 60,00 7,14	0 0,00 0,00 0,00	102 26,98 35,17 80,95	126 33,33
3	21 5,56 38,89 16,67	3 0,79 20,00 2,38	6 1,59 31,58 4,76	96 25,40 33,10 76,19	126 33,33
	54 14,29	15 3,97	19 5,03	290 76,72	378

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

Cuadro A 6. Fracción por Crecimiento % excluyendo el testigo (concentración 0.00%)

Observ Total % Col % Fila %	A	L	M	N	
1	7 2,16 53,85 6,48	3 0,93 20,00 2,78	9 2,78 60,00 8,33	89 27,47 31,67 82,41	108 33,33
2	0 0,00 0,00 0,00	9 2,78 60,00 8,33	0 0,00 0,00 0,00	99 30,56 35,23 91,67	108 33,33
3	6 1,85 46,15 5,56	3 0,93 20,00 2,78	6 1,85 40,00 5,56	93 28,70 33,10 86,11	108 33,33
	13 4,01	15 4,63	15 4,63	281 86,73	324

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

Cuadro A 7. Tiempo hr por Crecimiento %

Observ Total % Col % Fila %	A	L	M	N	
0 hr	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	63 16,67 21,72 100,00	63 16,67
12 hr	6 1,59 11,11 9,52	3 0,79 20,00 4,76	6 1,59 31,58 9,52	48 12,70 16,55 76,19	63 16,67
24 hr	8 2,12 14,81 12,70	0 0,00 0,00 0,00	7 1,85 36,84 11,11	48 12,70 16,55 76,19	63 16,67
36 hr	10 2,65 18,52 15,87	3 0,79 20,00 4,76	5 1,32 26,32 7,94	45 11,90 15,52 71,43	63 16,67
48 hr	15 3,97 27,78 23,81	3 0,79 20,00 4,76	0 0,00 0,00 0,00	45 11,90 15,52 71,43	63 16,67
60 hr	15 3,97 27,78 23,81	6 1,59 40,00 9,52	1 0,26 5,26 1,59	41 10,85 14,14 65,08	63 16,67
	54 14,29	15 3,97	19 5,03	290 76,72	378

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

Cuadro A 8. Tiempo hr por Crecimiento % excluyendo el testigo (concentración)

0.00%)

Observ	A	L	M	N	
Total %					
Col %					
Fila %					
0 hr	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	54 16,67 19,22 100,00	54 16,67
12 hr	0 0,00 0,00 0,00	3 0,93 20,00 5,56	3 0,93 20,00 5,56	48 14,81 17,08 88,89	54 16,67
24 hr	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	6 1,85 40,00 11,11	48 14,81 17,08 88,89	54 16,67
36 hrs.	1 0,31 7,69 1,85	3 0,93 20,00 5,56	5 1,54 33,33 9,26	45 13,89 16,01 83,33	54 16,67
48 hr	6 1,85 46,15 11,11	3 0,93 20,00 5,56	0 0,00 0,00 0,00	45 13,89 16,01 83,33	54 16,67
60 hr	6 1,85 46,15 11,11	6 1,85 40,00 11,11	1 0,31 6,67 1,85	41 12,65 14,59 75,93	54 16,67
	13 4,01	15 4,63	15 4,63	281 86,73	324

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

Bacillus cereus

Cuadro A 9. Concentración por Crecimiento %

Observ Total % Col % Fila %	A	L	M	N	
0.00%	25 6,61 92,59 46,30	0 0,00 0,00 0,00	20 5,29 83,33 37,04	9 2,38 2,79 16,67	54 14,29
0.05%	2 0,53 7,41 3,70	3 0,79 75,00 5,56	4 1,06 16,67 7,41	45 11,90 13,93 83,33	54 14,29
0.10%	0 0,00 0,00 0,00	1 0,26 25,00 1,85	0 0,00 0,00 0,00	53 14,02 16,41 98,15	54 14,29
0.15%	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	54 14,29 16,72 100,00	54 14,29
0.20%	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	54 14,29 16,72 100,00	54 14,29
0.25%	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	54 14,29 16,72 100,00	54 14,29
0.50%	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	54 14,29 16,72 100,00	54 14,29
	27 7,14	4 1,06	24 6,35	323 85,45	378

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

Cuadro A 10. Fracción por Crecimiento %

Observ Total % Col % Fila %	A	L	M	N	
1	0	4	15	107	126
	0,00	1,06	3,97	28,31	33,33
	0,00	100,00	62,50	33,13	
	0,00	3,17	11,90	84,92	
2	10	0	5	111	126
	2,65	0,00	1,32	29,37	33,33
	37,04	0,00	20,83	34,37	
	7,94	0,00	3,97	88,10	
3	17	0	4	105	126
	4,50	0,00	1,06	27,78	33,33
	62,96	0,00	16,67	32,51	
	13,49	0,00	3,17	83,33	
	27	4	24	323	378
	7,14	1,06	6,35	85,45	

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

Cuadro A 11. Fracción por Crecimiento % excluyendo el testigo (concentración 0.00%)

Observ Total % Col % Fila%	A	L	M	N	
1	0	4	0	104	108
	0,00	1,23	0,00	32,10	33,33
	0,00	100,00	0,00	33,12	
	0,00	3,70	0,00	96,30	
2	0	0	0	108	108
	0,00	0,00	0,00	33,33	33,33
	0,00	0,00	0,00	34,39	
	0,00	0,00	0,00	100,00	
3	2	0	4	102	108
	0,62	0,00	1,23	31,48	33,33
	100,00	0,00	100,00	32,48	
	1,85	0,00	3,70	94,44	
	2	4	4	314	324
	0,62	1,23	1,23	96,91	

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

Cuadro A 12. Tiempo hr por Crecimiento %

Observ	A	L	M	N	
Total %					
Col %					
Fila %					
0 hr	0	0	0	63	63
	0,00	0,00	0,00	16,67	16,67
	0,00	0,00	0,00	19,50	
	0,00	0,00	0,00	100,00	
12 hr	5	0	4	54	63
	1,32	0,00	1,06	14,29	16,67
	18,52	0,00	16,67	16,72	
	7,94	0,00	6,35	85,71	
24 hrs.	5	0	4	54	63
	1,32	0,00	1,06	14,29	16,67
	18,52	0,00	16,67	16,72	
	7,94	0,00	6,35	85,71	
36 hr	5	0	6	52	63
	1,32	0,00	1,59	13,76	16,67
	18,52	0,00	25,00	16,10	
	7,94	0,00	9,52	82,54	
48 hr	6	0	5	52	63
	1,59	0,00	1,32	13,76	16,67
	22,22	0,00	20,83	16,10	
	9,52	0,00	7,94	82,54	
60 hr	6	4	5	48	63
	1,59	1,06	1,32	12,70	16,67
	22,22	100,00	20,83	14,86	
	9,52	6,35	7,94	76,19	
	27	4	24	323	378
	7,14	1,06	6,35	85,45	

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

Cuadro A 13. Tiempo hr por Crecimiento % excluyendo el testigo (concentración 0.00%)

Observ	A	L	M	N	
Total %					
Col %					
Fila %					
0 hr	0	0	0	54	54
	0,00	0,00	0,00	16,67	16,67
	0,00	0,00	0,00	17,20	
	0,00	0,00	0,00	100,00	
12 hr	0	0	0	54	54
	0,00	0,00	0,00	16,67	16,67
	0,00	0,00	0,00	17,20	
	0,00	0,00	0,00	100,00	
24 hr	0	0	0	54	54
	0,00	0,00	0,00	16,67	16,67
	0,00	0,00	0,00	17,20	
	0,00	0,00	0,00	100,00	
36 hr	0	0	2	52	54
	0,00	0,00	0,62	16,05	16,67
	0,00	0,00	50,00	16,56	
	0,00	0,00	3,70	96,30	
48 hr	1	0	1	52	54
	0,31	0,00	0,31	16,05	16,67
	50,00	0,00	25,00	16,56	
	1,85	0,00	1,85	96,30	
60 hr	1	4	1	48	54
	0,31	1,23	0,31	14,81	16,67
	50,00	100,00	25,00	15,29	
	1,85	7,41	1,85	88,89	
	2	4	4	314	324
	0,62	1,23	1,23	96,91	

Crecimiento A: abundante, L: leve, M: moderado, N: negativo

Cuadros del análisis de varianza T-Student del análisis cuantitativo

Clostridium perfringes

Cuadro A 14. Fracción por Concentración (%)

Fracción Concent,		Mínimo cuadrado medio
3,0.00	A	1,0589444
2,0.00	A	1,0581667
1,0.00	B	0,9897222
1,0.05	C	0,1782222
2,0.25	C	0,1750556
3,0.05	D	0,1338889
3,0.15	E	0,0820556
3,0.10	E F	0,0604444
2,0.50	E F G	0,0597778
3,0.20	E F G	0,0547778
3,0.25	E F G	0,0516667
1,0.20	F G H	0,0488889
1,0.50	F G H I	0,0431111
1,0.15	F G H I J	0,0330556
2,0.15	G H I J	0,0277222
1,0.10	H I J	0,0172222
2,0.10	I J	0,0121111
1,0.25	I J	0,0108333
3,0.50	J	0,0076667
2,0.20	J	0,0033333
2,0.05	J	0,0010000

Cuadro A 15. Concentración (%) por Tiempo (hr)

Concent, hr		Mínimo cuadrado medio
0.00,48	A	1,3234444
0.00,36	A	1,3181111
0.00,24	B	1,2451111
0.00,60	B	1,2143333
0.00,12	C	1,0626667
0.05,60	D	0,2292222
0.05,48	E	0,1732222
0.05,36	F	0,1144444
0.25,48	F G	0,0980000
0.25,60	F G H	0,0921111
0.25,24	F G H	0,0903333
0.25,36	F G H	0,0881111
0.25,12	F G H I	0,0848889
0.15,48	G H I J	0,0605556
0.50,60	G H I J K	0,0590000
0.15,60	G H I J K L	0,0525556
0.50,48	H I J K L	0,0510000
0.15,36	H I J K L	0,0506667
0.05,24	H I J K L	0,0505556
0.00,0	H I J K L	0,0500000
0.50,36	H I J K L	0,0484444
0.15,24	H I J K L	0,0478889
0.10,60	H I J K L	0,0475556
0.15,12	I J K L	0,0413333
0.20,36	I J K L	0,0398889
0.20,48	I J K L	0,0392222
0.10,48	I J K L	0,0390000
0.20,60	J K L	0,0381111
0.05,0	J K L	0,0333333
0.20,0	J K L	0,0333333
0.10,0	J K L	0,0326667
0.15,0	J K L	0,0326667
0.20,12	J K L	0,0322222
0.20,24	J K L	0,0312222
0.10,36	J K L	0,0263333
0.50,0	J K L	0,0263333
0.05,12	J K L	0,0254444
0.50,24	J K L	0,0238889
0.25,0	J K L	0,0216667
0.10,24	J K L	0,0198889
0.10,12	K L	0,0141111
0.50,12	L	0,0124444

Bacillus cereus

Cuadro A 16. Fracción por Concentración (%)

Fracción Conc ent.		Mínimo cuadrado medio
3,0.00	A	0,99238889
1,0.00	A	0,98988889
2,0.00	B	0,81905556
1,0.05	C	0,22016667
2,0.25	C	0,21066667
2,0.50	D	0,11700000
3,0.05	D E	0,10927778
3,0.15	D E F	0,10183333
1,0.15	D E F G	0,09188889
1,0.50	D E F G H	0,07694444
3,0.10	D E F G H I	0,07327778
1,0.10	E F G H I	0,07044444
3,0.25	F G H I J	0,06238889
3,0.20	F G H I J	0,05833333
1,0.20	G H I J K	0,05566667
2,0.10	H I J K L	0,04400000
3,0.50	H I J K L	0,04305556
1,0.25	I J K L	0,03233333
2,0.15	J K L	0,01977778
2,0.05	K L	0,01261111
2,0.20	L	0,00094444

Cuadro A 17. Concentración (%) por tiempo (hr)

Concent, hr		Mínimo cuadrado medio
0.00,48	A	1,2398889
0.00,36	A	1,2360000
0.00,60	B	1,1656667
0.00,24	C	1,0587778
0.00,12	D	0,8523333
0.05,60	E	0,2216667
0.05,48	F	0,1530000
0.05,36	F G	0,1258889
0.25,48	F G H	0,1214444
0.25,60	F G H I	0,1197778
0.25,36	F G H I J	0,0986667
0.50,60	F G H I J	0,0977778
0.25,24	F G H I J	0,0953333
0.50,48	F G H I J K	0,0922222
0.10,60	F G H I J K	0,0918889
0.25,0	G H I J K	0,0880000
0.25,12	G H I J K	0,0875556
0.50,36	G H I J K L	0,0850000
0.50,24	G H I J K L	0,0808889
0.15,60	G H I J K L	0,0801111
0.50,12	G H I J K L	0,0781111
0.15,48	G H I J K L	0,0767778
0.15,36	G H I J K L	0,0725556
0.05,24	G H I J K L	0,0720000
0.15,24	G H I J K L	0,0682222
0.10,48	G H I J K L	0,0647778
0.15,0	G H I J K L	0,0646667
0.15,12	G H I J K L	0,0646667
0.10,12	H I J K L	0,0617778
0.10,36	I J K L	0,0568889
0.05,0	J K L	0,0560000
0.05,12	J K L	0,0555556
0.10,0	J K L	0,0543333
0.20,60	J K L	0,0502222
0.00,0	J K L	0,0500000
0.20,48	J K L	0,0466667
0.10,24	J K L	0,0457778
0.20,24	J K L	0,0407778
0.50,0	J K L	0,0400000
0.20,36	J K L	0,0385556
0.20,12	K L	0,0293333
0.20,0	L	0,0243333