
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS



APLICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri Schauer*) EN LA CONSERVACIÓN DE CARNE DE PAVO

TESIS POR:

NUYÉN DÍAZ CORTÉS

**Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de
Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Junio 2007

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi **querida alma terra mather** por darme la oportunidad de haber culminado esta carrera, y permitido ser parte de ella.

Al departamento de Nutrición por brindarme el apoyo durante mi estancia.

Al Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA), por haberme permitido ser parte de este proyecto.

A la **M. C. María Hernández Gonzáles**, por el tiempo dedicado para la realización de este proyecto, así como su valiosa amistad brindada durante todo este tiempo.

A la M. C. Xochitl Ruelas Chacón y al M. C. Oscar Noe Reboloso Padilla, por aceptar ser parte esencial de este proyecto. Por su paciencia, amistad y apoyo incondicional brindado tanto en la formación profesional como en la elaboración de la tesis.

A los T.Q.L Carlitos y Maricela por su amistad y apoyo brindado en el Laboratorio de Nutrición, ya que sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

Mis más sinceros agradecimientos a la **T.Q.L. Cristy Sánchez** por sus consejos, atención y amistad brindada tanto como estudiante como en la asesoría de mi tesis. **Muchas Gracias.**

DEDICATORIAS

A Dios por darme la dicha de vivir, estando siempre a mi lado hasta poder culminar esta carrera.

A mis padres:

Régulo Díaz Bustos

Miguelina Cortés Díaz

Por haberme dado la vida, estando siempre presente en sus oraciones y pensamientos, siendo una luz en mi camino, brindando su apoyo y sabiduría, ya que han sabido guiar mis pasos para ser una persona de bien. Por todo eso y más **los AMO. Este logro es de ustedes mas que mío. Gracias.**

A mis Hermanos (as), **IVAR, ZURY, YARIS, YOYÍN**, por brindarme todo su cariño y comprensión, siendo un ejemplo a seguir, y por ser auténticos y únicos, gracias por ser parte de esto, **los quiero.**

A mis amigos, **Francisco Centeno**, por enseñarme que más allá de lo que ven nuestros ojos es hermoso, a **Enoc Barrera** (el diablito) por ser uno de mis más grandes amigos, por estar siempre conmigo en todo momento sin importar nada. A mis amigas **Lupis, Luz, Ivonne, Gama, Fer, Polo, Nehemias, Rubén**, por compartir momentos agradables. A mi mejor amiga **Nubia Areli** por todos los momentos compartidos y las aventuras realizadas en estos cinco años, estando presente en los momentos difíciles apoyándome para no caer.

A mis compañeros de generación, **Liz, Sarahí, Emanuel, Brez, Rosi, Luis, Mimí, Rene, Lore, Mayra**, gracias por los buenos y malos momentos.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	II
INDICE DE CUADROS.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	1
I INTRODUCCIÓN.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	5
OBJETIVOS.....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
Hipótesis.....	7
II REVISIÓN DE LITERATURA	
La carne de pavo.....	8
Consumo nacional.....	8
Consumo mundial.....	10
Valor nutritivo.....	11
Ventajas de su consumo.....	13
Microbiología de la carne de pavo.....	14
Factores que favorecen el desarrollo microbiano.....	15
El pH.....	15
Temperatura.....	16
Potencial óxido-reducción.....	18
Actividad de agua.....	18
Composición general del medio.....	19
Patógenos presentes en la carne de pavo.....	20
<i>Salmonella tiphy</i>	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	23
<i>Escherichia coli</i>	25
Conservadores.....	27

Antimicrobianos.....	27
Antimicrobianos sintéticos.....	31
Antimicrobianos naturales.....	35
Generalidades del orégano.....	39
Características morfológicas y anatómicas.....	40
Características botánicas.....	40
Clasificación taxonómica.....	42
Clima y suelo.....	43
Usos y composición química del orégano.....	43
Método de extracción.....	46
Actividad biológica de los componentes del orégano.....	48
Importancia económica del orégano.....	49
III METODOLOGÍA.....	52
ETAPA 1. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra mesófilos aerobios.....	52
Obtención del aceite esencial de orégano.....	52
Valoración de la actividad antimicrobiana.....	53
Preparación de las muestras de carne y conteo de mesófilos aerobios.....	53
ETAPA 2: Evaluación de la actividad antimicrobiana en patógenos Viabilización de cepas patógenas.....	54
Inoculación de la carne de pavo con <i>E coli</i> , <i>S aureus</i> y <i>S typhi</i>	55
IV RESULTADOS.....	56
ETAPA 1: Evaluación de la actividad antimicrobiana Determinación de la fracción de timol carvacrol con mejor actividad antimicrobiana en carne de pavo.....	56
Determinación de la concentración con la mejor actividad antimicrobiana en carne de pavo.....	60

ETAPA 2: Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a patógenos	
Determinación de la concentración óptima del aceite esencial con mejor actividad antimicrobiana ante <i>Staphylococcus aureus</i> en la carne de pavo en condiciones de refrigeración.....	63
Determinación de la concentración óptima del aceite esencial con mejor actividad antimicrobiana ante <i>Escherichia coli</i> en la carne de pavo en condiciones de refrigeración.....	65
Determinación de la concentración óptima del aceite con mejor actividad antimicrobiana ante <i>Salmonella typhi</i> en la carne de pavo en condiciones de refrigeración.....	67
V DISCUSIONES.....	69
VI CONCLUSIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73
ANEXOS.....	78

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Composición nutritiva (por cada 100 gr de porción comestible).....	13
2	Alimentos involucrados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en EEUU y México.....	20
3	Agentes Etiológicos de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en EEUU (1988-1992).....	21
4	Agente Etiológicos de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en México (1980-1989).....	21
5	Sustancias provenientes de plantas con actividad antimicrobiana.....	39
6	Clasificación Taxonómica del orégano.....	42
7	Componentes químicos del orégano que determinan su calidad comercial, análisis comparativo de dos especies extranjeras.....	46
8	Actividades biológicas del orégano.....	49
9	Composición del aceite esencial de orégano para cada fracción.....	52
10	Medias de las ufc/ml bajo condiciones Ambientales.....	57
11	Medias de las ufc/ml bajo condiciones de refrigeración.....	58
12	Medias de las ufc/ml de <i>S. aureus</i>	64
13	Medias de las ufc/ml de las <i>E. coli</i>	66
14	Medias de las ufc/ml de <i>S. typhi</i>	67

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Tinción de Gram de <i>Salmonella typhi</i>	22
2	Tinción de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
3	Tinción de Gram de <i>Escherichia coli</i>	26
4	<i>Lippia berlandieri</i> Schauer.....	42
5	Estructura química de los principales componentes del orégano.....	45
6	Estructura química de los principales flavonoides del orégano.....	45
7	Sistema de arrastre por vapor convencional.....	48
8	Crecimiento microbiano en las muestras de las fracciones 1, 2 y 3 en función del Tiempo (0,24, 48, 72, 96 y 120 hrs.) en condiciones Ambientales.....	57
9	Crecimiento microbiano de las muestras de las fracciones 1, 2 y 3 en función del Tiempo (0, 24, 48, 72, 96 y 120 hrs.) en condiciones de Refrigeración.....	60
10	Gráfica de crecimiento microbiano para cada concentración (0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) en función al tiempo, en condiciones Ambientales.....	61
11	Gráfica de crecimiento microbiano para cada concentración (0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) en función al tiempo, en condiciones de Refrigeración.....	62
12	Gráfica de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en función a la concentración F3 (0, 0.10, 0.15 y 0.20%).....	64
13	Gráfica de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en función a la concentración F3 (0, 0.10, 0.15 y 0.20 %).....	67
14	Gráfica de crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en función a la concentración F3 (0, 0.10, 0.15 y 0.20 %).....	68

RESUMEN

En la actualidad se buscan alimentos que correspondan a las necesidades de nutrición, la fácil preparación y semejantes a lo natural por lo que el objetivo de este trabajo es probar la capacidad antimicrobiana de las diferentes fracciones de aceite esencial de orégano sobre la principal flora contaminante y patógena de la carne de pavo mediante análisis microbiológicos (Morales, 2005).

El aceite esencial contiene compuestos activos antimicrobianos como el timol y el carvacrol en diferentes concentraciones de las tres fracciones, puede llegar a ser un método nuevo para la conservación de las carnes, sin agravar al producto.

Los análisis microbiológicos de las muestras de carne se realizaron mediante estrictas condiciones de asepsia para prevenir la contaminación en los tratamientos efectuados. La evaluación antimicrobiana se realizó mediante la aplicación de tres fracciones con diferentes proporciones de timol-carvacrol, valoradas en diferentes concentraciones (0, 0.05, 0.10, 0.15 %), permaneciendo dichas muestras en condiciones de refrigeración y temperatura ambiente, para el posterior conteo en placa con agar nutritivo, monitoreadas a intervalos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 hrs., y sembradas por duplicado, con el fin de determinar la fracción y la concentración que ejerce mayor inhibición microbiana.

Una vez determinada la fracción y la concentración óptima, se prosiguió a la inoculación de los microorganismos patógenos en la carne fresca de pavo, los cuales fueron: *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*. La carne inoculada fue almacenada en refrigeración para el monitoreo con intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 hrs. y sembradas en agares selectivos para su posterior conteo.

Una vez que se obtuvieron los resultados, se realizó el análisis estadístico de los datos con el análisis de varianza ($p \leq 0.5$), los factores que se estudiaron fueron: concentración, tiempo, fracción y ufc/ml, para conocer la actividad antimicrobiana de cada fracción, obteniendo como la mejor. La mejor fracción fue la 3, y los mejores resultados se obtuvieron de la concentración al 0.15%.

I. INTRODUCCIÓN

La vasta expansión de dietas y cada vez menos sabores, el experimento incipiente y aún balbuceante de la gastronomía molecular, el uso creciente de conservantes químicos y naturales y las inagotables polémicas sobre los alimentos transgénicos se ocuparon de demostrar que, en los últimos años, el sencillo acto de comer es cada vez menos instintivo y más reflexivo.

La pérdida de la calidad que algunas veces se produce en los alimentos puede deberse a cambios físicos, químicos, enzimáticos y microbiológicos. Las consecuencias de la pérdida de calidad por acción de los microorganismos suponen un riesgo para el consumidor debido a la posible presencia de toxinas o microorganismo patógenos, además de las pérdidas económicas causadas por la alteración. Muchas tecnologías de conservación de alimentos, algunas en uso desde hace mucho tiempo, protegen a los alimentos de la alteración por microorganismos. Así tenemos que los microorganismos pueden ser inhibidos por refrigeración, reducción de la actividad de agua, acidificación, modificación de la atmósfera del envase, por tratamientos no térmicos o bien por adición de compuestos antimicrobianos.

Los antimicrobianos continúan estando entre los aditivos alimentarios más importantes. Actualmente, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados, envasados bajo diferentes atmósferas y refrigerados, está aumentando el interés por los antimicrobianos

de origen natural que puedan extraerse para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y la seguridad para el consumidor.

Los antimicrobianos alimentarios son compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos que retardan el crecimiento o causan la muerte de los microorganismos, aumentando así la resistencia a la alteración de la calidad o seguridad. Los blancos principales de los agentes antimicrobianos son los microorganismos productores de intoxicaciones alimentarias (agentes infecciosos y productores de toxinas) y los que alteran los alimentos, cuyos productos metabólicos finales (catabolitos) o enzimas causan malos olores, sabores desagradables, problemas de textura, cambios de coloración o riesgo sanitario (Davidson y Zivanovic, 2003).

JUSTIFICACION

De acuerdo a las necesidades actuales, donde la alimentación es uno de los principales factores de interés social, la conservación y el procesamiento de los alimentos debe ser lo más natural y orgánico posible. La alteración y la contaminación de los alimentos por los distintos factores: microorganismos, malas técnicas de fabricación, conservadores sintéticos u otros, constituyen un problema que no está controlado a pesar de las diversas técnicas utilizadas.

La conservación de los alimentos, en un sentido más amplio, comprende el conjunto de todas las medidas para evitar su descomposición. En el sentido más estricto se designa como conservación de alimentos a los procedimientos que se dirigen contra el ataque por los microorganismos. Tomando esto en consideración, se justifica la búsqueda de nuevas y mejores metodologías de conservación, buscando siempre llevar productos inocuos al consumidor final a través de la aplicación de los componentes que nos brinda la misma naturaleza, como es en el caso del presente trabajo.

El orégano es una planta que no requiere de numerosos cuidados para poder desarrollarse y cultivarse, es fácil de conseguir por su consumo como especias para los diferentes platillos mexicanos, además de ser un excelente digestivo.

El aceite de orégano es un producto que tiene diferentes compuestos antimicrobianos y antioxidantes que son benéficos para el alimento, su costo como hoja es bajo, sin embargo el costo del aceite obtenido a partir de este,

se eleva excesivamente y es utilizado por variadas industrias como lo son la farmacéutica, cosmética, alimentaria, etc. Este aceite no es tóxico ni produce efectos secundarios al consumidor ni en el producto. La extracción del mismo a partir de la hoja es mediante el método de arrastre por vapor, el cual es sencillo y barato. De esta extracción solamente se requerirá la purificación de dos compuestos (timol y carvacrol) mediante el uso de una columna de fraccionamiento. Todo esto hace del producto mencionado una opción viable para favorecer la extensión de vida de anaquel de algunos productos frescos, como lo es el caso de la carne.

La carne de pavo está teniendo mucho auge en la sociedad, por su bajo contenido calórico se dispone en la dietas actuales, así como su bajo contenido de sales para la administración de una alimentación especial, para personas convalecientes. Este producto cada vez se consume más en el país y en todo el mundo, de acuerdo a las estadísticas su consumo se ha incrementando un 26% desde 1995 a la fecha. Así pues, se dirige este esfuerzo hacia la conservación de un producto tan saludable, como lo es el tipo de carne mencionada, favoreciendo su conservación, y por ende, una mayor disponibilidad en el mercado de este producto a favor de una mejor nutrición en la población.

OBJETIVOS

Objetivo General

Probar la capacidad antimicrobiana de las diferentes fracciones timol-carvacrol extraídas del aceite de orégano (*Lippia berlandieri Shauer*), sobre la flora contaminante de la carne de pavo.

Objetivos Específicos

- Valorar la actividad antimicrobiana de las tres fracciones obtenidas a partir del aceite esencial del orégano (*Lippia berlandieri Shauer*) en carne de pavo fresca variando la dosis y la condición del almacenamiento.
- Determinar la concentración óptima de la fracción timol-carvacrol para la conservación de carne de pavo.
- Evaluar la efectividad antimicrobiana de la fracción timol-carvacrol en carnes de pavo inoculadas con los principales agentes patógenos: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*.

HIPÓTESIS

Es posible la conservación de carnes de pavo mediante la aplicación del aceite esencial del orégano, así como el control de la flora patógena.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

La Carne de Pavo

El pavo, también llamado gallina de las indias por los conquistadores, es originario de América del Norte.

Desde Noviembre de 1620, que se sirvió de sustento a los colonos en Estados Unidos, se ha convertido en un protagonista de las fiestas tradicionales del citado país.

En general puede afirmarse que las carnes blancas son las que exhiben mayores tasas de crecimiento. En cambio las carnes rojas, manifiestan un crecimiento menor, observándose retrocesos en diversas regiones (Consumer, 2003).

Consumo Nacional

El consumo de la carne de pavo en México es prácticamente estacional, siendo en Navidad y fin de año la época de mayor demanda de parte de los consumidores mexicanos. La producción de carne de pavo es incipiente y todavía se crían pavos destinados al autoconsumo, sin visión comercial. Existen pocos emprendimientos industriales de envergadura y parte del volumen necesario para el abastecimiento del mercado interno es de importación (SAGARPA, 2001).

El pavo que se consume en México en la temporada decembrina se estima que es el 65% de la producción nacional y ofertada por dos principales empresas productoras localizadas en Chihuahua y Sonora y el 35% restante es importado de Estados Unidos y de la República de Chile (SAGARPA, 2001).

La producción promedio de enero a noviembre oscila entre las 2 mil toneladas mensuales, y en diciembre se cuenta con 14 mil toneladas de carne (SAGARPA, 2001).

La avicultura mexicana en el 2005 aportó el 0.76% en el PIB total, el 16.57% en el PIB pecuario. Se produjeron cerca de 2.5 millones de toneladas de carne de pollo, muy por encima de los cárnicos, y la del pavo 13,840 toneladas anuales, con una tasa media de crecimiento anual de 1994-2005 del 6.4%. El consumo per cápita aparente de pavo se ubica en 1.86 Kg. (SAGARPA, 2001).

EL sector avícola mexicano participa con el 63.2% de la producción pecuaria, 33 % la aporta la producción de pollo, 0.20% la producción de pavo y 30.1% la producción de derivados avícolas.

El 90% de la producción de carne de pavo en México se localiza en los estados de Sonora (40%), Chihuahua (35%) y Yucatán (20%) y en otros estados tan solo con el 5% (SAGARPA, 2001)..

Consumo Mundial

A escala mundial la producción pecuaria cuenta con más del 40% del valor bruto de la producción pecuaria, incrementándose sobre el 50% en los países desarrollados, mientras que en las naciones en desarrollo alcanza un aproximado de un tercio de la producción total (Anónimo¹).

La producción mundial de carne de pavo promedia 4 millones de toneladas, lo que representa el 9% de la producción mundial de la carne aviar (Anónimo¹).

Estados Unidos es el primer productor con más del 55% de la producción total, seguido con Francia con 15%. Ambos países junto a Italia, Reino Unido, Alemania, Canadá y Brasil concentran cerca del 94% de la producción mundial de carne de pavo (Anónimo³).

Los principales importadores de carne de pavo son: México, Rusia, Alemania y Sudáfrica. Los principales exportadores son EEUU, Francia, Holanda y Brasil (Anónimo³).

Actualmente, el pavo no solo se destina a las fiestas decembrinas, también está constituyendo parte de la dieta diaria de la población.

En Sudamérica y Chile, registran el mayor consumo, superando los 2.75 kg/hab, el consumo brasileño alcanza medio kg/hab y Argentina registra el nivel más bajo con un 0.09 kg/hab, dado que no es un producto tradicional en la dieta nacional (Anónimo⁴).

Valor Nutritivo

La incipiente incorporación de la carne de pavo a la dieta, en los últimos años, tiene sus razones. Se trata de un alimento de menor tenor graso, bajas calorías, mayor digestibilidad y menor contenido de colesterol.

La carne de pavo es un producto de alto rendimiento para productores y consumidores, por cada kilogramo de carne se obtienen 600 gr comestibles, mientras que la del pollo solo rinde 420 gr, así como su rendimiento post-cocción.

El término carne fresca es utilizado en un contexto especial para incluir productos que han pasado por los cambios químicos y físicos luego de la matanza, pero que han sido mínimamente procesados (Aberle et. al, 2001).

Las propiedades físico-químicas de la carne fresca dictan su utilidad para el comerciante, su atractivo para el comprador o consumidor y su adaptabilidad para algún procesamiento ulterior.

La capacidad de retención de agua, el color, la estructura, la firmeza y la textura son propiedades de particular importancia. La mayoría de las veces los consumidores adquieren aquellos productos que les parecen más atractivos a su vista. Desde el punto de vista de aceptabilidad, la percepción que tiene el comprador en cuanto a la posible relación entre características visuales y calidad del producto tiende a ser bastante apropiado. Si estas

características no llenan las expectativas del consumidor, este considera que el producto es de baja calidad (Ramos, 2005).

La creciente incorporación de la carne de pavo a la dieta, se debe a que es un alimento magro, fácil de digerir y bajo en contenido de grasa y colesterol.

El aporte calórico es moderado, menos de 130 kcal/100gr, aspecto importante para quienes buscan una comida ligera y sabrosa, la carne de pavo tiene un bajo contenido de grasa que además tiene la ventaja de no ser una grasa entreverada, la mayor parte se encuentra bajo la piel y se puede retirar fácilmente. El muslo es la parte más grasa del pavo.

La carne de pavo es muy proteica (20-25% de proteína según porción) y se puede equiparar en cantidad y calidad con el resto de las carnes. Su bajo contenido de colágeno facilita la digestibilidad. El contenido de hierro en la carne de pavo, permite su fácil absorción, también es abundante en potasio y magnesio, así como en vitamina B₃ ó niacina.

La carne de pavo es un aliado de gran valor para el mantenimiento de la forma física y la salud en todas las edades y para toda la familia, el cuadro 1 muestra la composición nutritiva para una porción de 100 gramos.

Cuadro 1. Composición nutritiva (por cada cien gramos de porción comestible)

Alimento	Energía (Kcal)	Proteína (g)	Grasas (g)	AGS (mg)	AGM (mg)	AGP (mg)
Muslo de Pavo	114,49	20,50	3,61	1,31	0,73	0,90
Pechuga de Pavo	96,11	21,80	0,99	0,34	0,21	0,18
Alimento	Colesterol (mg)	Niacina (mg)	Potasio (g)	Magnesio (g)	Hierro (mg)	
Muslo de Pavo	75,00	4,70	289,00	17,00	2,00	
Pechuga de Pavo	60,00	11,33	333,00	20,00	1,00	

AGS= Grasas saturadas / AGM= Grasas Monoinsaturadas / AGP= Grasas Poliinsaturadas
Fuente: Consumer, 2003

Ventajas de su Consumo de la Carne de Pavo

El pavo se elige como una de las carnes para el seguimiento de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol. Dado que es un alimento fácil de digerir, es recomendable incluirlo en la dieta infantil y en la de personas con el estómago delicado, así como para pacientes con dietas hipoalergénicas (Anónimo³).

El pavo se obtiene en el mercado de diversas formas: fresco, congelado, entero o por piezas.

La carne de pavo cruda se deteriora fácilmente por lo que los comerciantes se basan en las normas higiénicas y de conservación para evitar trastornos digestivos a los consumidores.

Microbiología de la Carne de Pavo.

La microbiología sanitaria estudia los microorganismos presentes en el agua y en los alimentos, considerando sus características generales, su ecología, su resistencia al medio ambiente, su capacidad para sobrevivir y desarrollarse

en los propios alimentos, las consecuencias de ese desarrollo y los factores que influyen en esto, se consideran en cuatro grupos (Tejeda, 2006):

- Microorganismos Deterioradores: Son aquellos que afectan las características organolépticas de los alimentos.
- Microorganismos Indicadores: Son aquellos que se agrupan en función de ciertas características morfológicas, fisiológicas y ecológicas, a través de las cuales adquieren un significado especial. Estos grupos de microorganismos se consideran indicadores de fuentes de contaminación indeseable o de otro tipo de accidente que sugiere la comisión de malas prácticas higiénicas de trabajo durante el manejo de agua y de los alimentos.
- Microorganismos Patógenos: Son aquellos que pueden causar daño a la salud.
- Microorganismos Útiles para el Hombre: Son aquellos que se han adicionado intencionalmente a los alimentos con el propósito de proporcionar alguna característica organoléptica especial.

Factores que Favorecen el Desarrollo Microbiano

EL pH

En general, la presencia de ácidos en el alimento produce una drástica reducción de la supervivencia de los microorganismos. Los ácidos fuertes (inorgánicos) producen una rápida bajada del pH externo, aunque su presencia en la mayoría de los alimentos es inaceptable.

Los ácidos orgánicos débiles son más efectivos que los inorgánicos en la acidificación del medio intracelular, se supone que esto ocurre por que es más fácil su difusión a través de la membrana celular en su forma no disociada (lipofílica) y posteriormente se disocian en el interior de la célula inhibiendo el transporte celular y la actividad enzimática. La acción del pH sobre el crecimiento de los microorganismos se puede situar en tres niveles: el medio, la permeabilidad de la membrana y la actividad metabólica (ICMSF, 2000).

La mayoría de los microorganismos crecen a pH entre 4.5 y 9, en general los hongos y las levaduras son capaces de crecer a pH más bajos que las bacterias. Puesto que la acidificación del interior celular conduce a la pérdida del transporte de nutrientes, los microorganismos no pueden generar más energía del mantenimiento y, a una velocidad variable según las especies, se produce la muerte celular.

Dentro de las bacterias patógenas, los microorganismos de los géneros *Vibrio* y *Clostridium* son más sensibles a las variaciones de pH que la mayor parte de las bacterias, mientras que *E. Coli* y *Staphylococcus* son más resistentes (Adams et. al., 1997).

Temperatura

Este es uno de los valores más importantes que actúan sobre el crecimiento de los microorganismos y que tiene la aplicación casi generalizada en la conservación de los productos frescos y también congelados. La mayor parte

de los microorganismos proliferan a temperaturas medias superiores o iguales a 20°C. Se admite de forma general que las células microbianas pueden crecer mientras las temperaturas estén comprendidas entre -18 °C y 90 °C. A estos valores extremos el crecimiento está muy limitado, pero la actividad metabólica puede ser muy significativa (Jay, 1973).

Los microorganismos se clasifican en función de la temperatura en tres grandes grupos (Adams y Moss; 1997):

- Los **psicrotrofos o psicrófilos**: Son gérmenes adaptados al frío, no suelen encontrarse en alimentos a no ser en regiones polares. Se desarrollan a 0° C con un óptimo crecimiento comprendido entre 15° C y 20° C Se caracterizan por un metabolismo lento y son poco competitivos con los otros gérmenes, cuando la temperatura aumenta.
- Los **mesófilos**: Estos gérmenes que se multiplican a temperaturas entre 20° C y 45° C con un óptimo crecimiento de 37° C. Sus tasas de crecimiento son elevadas y la duración de su proliferación relativamente corta. Se encuentra en alimentos almacenados a temperatura ambiente o en alimentos refrigerados en los que se ha roto la cadena fría.
- Los **termófilos**: Son microorganismos capaces de desarrollarse a temperaturas elevadas, entre 45° C y 65° C con un óptimo de 55° C. Se caracterizan por una tasa de crecimiento muy elevado pero con una duración corta. Los termófilos suelen encontrarse en el agua, aire y suelo.

Potencial de óxido-reducción

Los microorganismos se clasifican en función de sus exigencias en oxígeno y/o en la toxicidad del mismo. Tradicionalmente se distinguen (Adams y Moss; 1997):

- Los **aerobios estrictos** que necesitan oxígeno como aceptor final de electrones, no tienen la posibilidad de utilizar una vía fermentativa y disponen de catalasa para eliminar el peróxido de hidrógeno.
- Los **aerobios facultativos** que pueden desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno. Poseen en su cadena respiratoria, las enzimas necesarias para la fermentación y son catalasa positiva.
- Los **anaerobios estrictos y los microaerofilos** poseen obligatoriamente un metabolismo fermentativo, son catalasa negativa e inactivada de forma variable por la presencia de oxígeno.

Actividad de Agua (Δ_w)

El agua es utilizada por el crecimiento de los microorganismos de dos formas diferentes: como solvente de nutrientes, lo que permite su transporte y disponibilidad en el citoplasma; como agente químico que toma parte en las reacciones hidrolíticas que dan lugar a monómeros necesarios para la síntesis microbiana y para las reacciones energéticas.

Los alimentos con a_w baja (0.61-0.85) producen alteraciones microbianas más frecuentes que son producidas por mohos. Las bacterias se ven inhibidas a estos valores.

Toda disminución de la actividad acuosa afecta el crecimiento bacteriano; la mayor parte de las bacterias tienen un crecimiento óptimo alrededor de 0.990-0.995. Para valores más bajos, el crecimiento disminuye, por ejemplo, la tasa de crecimiento de *Staphylococcus aureus* desciende en un 10% de su máximo cuando la actividad acuosa baja a 0.90 (ICMSF, 2000).

Composición General del Medio

Los microorganismos necesitan agua, una fuente de energía, nitrógeno, sales minerales y, eventualmente, oxígeno y/o factores de crecimiento, para su desarrollo.

Los productos alimenticios contienen en general todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos, pero las diferencias de composiciones observadas tienen un efecto selectivo sobre su flora microbiana.

Así la composición de un producto determina su pH y en cierta forma su potencial de óxido reducción. El contenido de azúcares de un zumo de fruta dado permite el crecimiento exuberante de levaduras, y la supremacía de la flora láctica de la leche está en función de la riqueza de los factores de crecimiento que son indispensable (Jay, 1973).

Patógenos Presentes en la Carne de Pavo

Según las estadísticas, los alimentos que más transmiten enfermedades transmitidas por alimentos en México y en Estados Unidos citados en el cuadro 2, son:

Cuadro 2. Alimentos involucrados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en EEUU y México.

Alimento	EEUU	México
Frutas y Verduras	6 %	----
Pescados y Mariscos	17 %	7 %
Carne y aves	17 %	15 %
Leche	---	15 %
Pasteles	---	17 %
Queso	---	32 %
Otros	60 %	14 %

Fuente: Bean et al 2000 (EEUU), y Parrilla et al 1993 (México)

De acuerdo a las estadísticas realizadas, los agentes que son más transmisibles son las bacterias de todo tipo, ya sea patógenas o facultativas. En el cuadro 3, se presentan los agentes etiológicos transmitidos por alimentos en EEUU, y en el cuadro 4 los encontrados en México.

Cuadro 3. Agentes Etiológicos de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en EEUU (1988-1992)

Agente	Brotos (%)	Casos (%)
Bacterias	80	90
Virus	4	7
Parásitos	2	1
Substancias Químicas	14	2

Fuente: Bean et. al, 2000.

Cuadro 4. Agentes Etiológicos de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en México (1980-1989)

Agente	Brotos (%)	Casos (%)
Bacterias	91.3	73.1
Parásitos	3.4	14.6
Substancias Químicas	5.2	12.3

Fuente: Parrilla et al, 1993

Salmonella typhi

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, con rica composición antigénica. Es un bacilo gram negativo aeróbico o facultativamente anaeróbico (figura 1), móvil por flajelos peritricos, no esporulado, catalasa positiva, oxidasa negativa, fermentan la glucosa, producen gas, no fermentan la lactosa ni la sacarosa, no producen indol, no hidrolizan la urea, descarboxilan la arginina, lisina y ornitina (ICMSF, 1997).

Los factores para su desarrollo son, una temperatura ideal que es la mínima de 6° C y la máxima de 46° C con una óptima de 35-37° C; un pH mínimo de 3.8, con un máximo de 9.0 y un óptimo de 7.0; una actividad acuosa de 0.94. La fuente inicial de la bacteria es el tracto intestinal de aves y otros animales. Los seres humanos adquieren la bacteria a través de alimentos contaminados como carnes de vaca, aves de corral, huevos, y derivados o el agua (Tejeda, 2006).

El periodo de incubación de la bacteria es de 8 a 48 horas. La enfermedad se produce como consecuencias de una verdadera infección transmitida por alimentos, puesto que las bacterias se multiplican e invaden la mucosa

intestinal, donde producen una enterotoxina y citotoxina que destruye las células epiteliales.

Los síntomas más llamativos son dolor abdominal, espasmos, diarrea, náuseas, vómitos y fiebre que suelen persistir de 2 a 5 días, pero pueden durar varias semanas (Prescott, 2000).

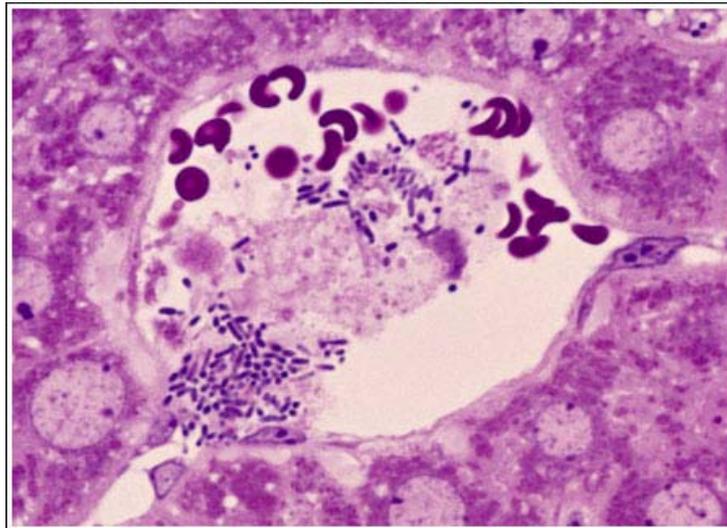


Figura 1. Tinción de Gram de *Salmonella typhi*

Staphylococcus aureus

De la familia *Micrococcaceae*, *Micrococcus* y *Planococcus*. Es un coco gram positivo de 0.05-1.5 micras de diámetro (figura 2), no esporulados inmóviles, se encuentran distribuidos en racimos, de metabolismo fermentativo y oxidativo, con catalasa positivo, oxidasa negativo y manitol positivo, son halotolerantes (10 % NaCl), muy resistente al calor, la desecación y la irradiación. Producen toxinas termoestables, coagulasa positiva y termonucleasa positiva (Tejeda, 2006).

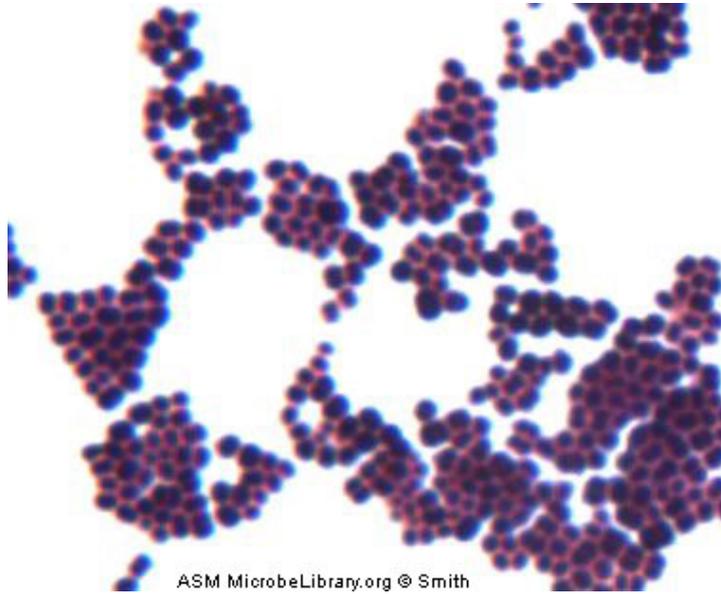
Son mesófilos halotolerantes que requieren de una actividad acuosa para su desarrollo de 0.98, así también el ácido acético es un inhibidor para ellos, son antagonistas, requieren de una temperatura mínima de 7° C y una máxima de 48° C con una óptima de 37° C; necesitan de un pH mínimo de 4.0 un máximo de 10.0 y un óptimo de 6.5 (ICMSF, 1997).

Se han identificado 6 enterotoxinas diferentes que se designan como A, B, C1, C2, D y E. Estas toxinas parecen activas como neurotoxinas, que estimulan el vómito a través del nervio vago. Por lo menos algunas de ellas son superantígenas y desencadenan la liberación de Interleucina-2 y otras linfocinas.

Se encuentra en las fosas nasales y en la piel en los seres humanos, y en otros mamíferos de todo el mundo. También se pueden encontrar presentes en el polvo, drenaje, agua, leche, equipo y superficies. Son bacterias no deterioradoras de los alimentos, posee cepas toxigénicas y no toxigénicas, la enterotoxina producida es termoestable. Los síntomas típicos comprenden dolor abdominal, sudoración, espasmos, diarreas, vómitos y náuseas. El inicio de los síntomas es rápido de 1 a 8 horas y de corta duración, menor a 24 horas (Harley, 2000).

La cantidad mínima de toxina que se necesita para causar la enfermedad en el hombre es de aproximadamente 200 ng, pero también se maneja una dosis menor que un microgramo, en un alimento contaminado puede producir síntomas de intoxicación alimentaria estafilocócica, este nivel de toxina es

alcanzada cuando la población del estafilococo exceda las 100,000 cel/gr. (Tejeda, 2006).



ASM MicrobeLibrary.org © Smith
Figura 2. Tinción de Gram de Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Es un bacilo gram negativo, es de la familia *Enterobacteriaceae*, es anaerobio facultativo móvil (figura 3), ornitina descarboxilasa, glucosa, lactosa, sacarosa, indol, nitratos y catalasa positiva (Tejeda, 2006).

Posee cinco cepas Enteropatógenas:

- La enterohemorrágica (ECEH), Es muy rara variedad, produce dos toxinas la vero-toxina y la toxina Shiga-like, esta estrechamente relacionada con *Shigella dysenteriae*, su periodo de incubación es de 20 a 24 horas con una duración de 7 a 10 días, su dosis infectiva es muy baja y toxigénica.

- La enteropatógena (ECEP), causante de lesiones de las microvellosidades en el tejido del intestino lo cual la lleva a ser la causante principal en niños (Polosky et al., 1997)
- La enterotoxigénica (ECET), además de los factores de colonización (La fijación a la pared intestinal mediada por fimbrias), la virulencia de las cepas depende de la formación de toxinas mediadas por plásmidos. Han sido descritos dos tipos principales de toxina, que son fácilmente diferenciables en base a la termoestabilidad, peso molecular y modo de acción; estos dos tipos son la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST). La toxina termoestable actúa principalmente como un antiabsorbente más que de una forma secretora, es extraordinariamente termorresistente, siendo estable a 100° C durante 15 minutos (Gross y Rowe, 1985).
- La enteroinvasiva (ECEI), tiene un parecido estrecho con *Shigella* en cuanto a su patología. Los organismos se diferencian de la mayoría de los *E. Coli* en que fermentan lentamente la lactosa, pueden ser anaerógenos y son inmóviles (Hale et al., 1983)
- La enteroagregativa (ECEAg), no se han detectado toxinas extracelulares convencionales en las cepas, pero producen lesiones peculiares en las células epiteliales, lo que sugiere la participación de toxinas (Prescott, 2000).

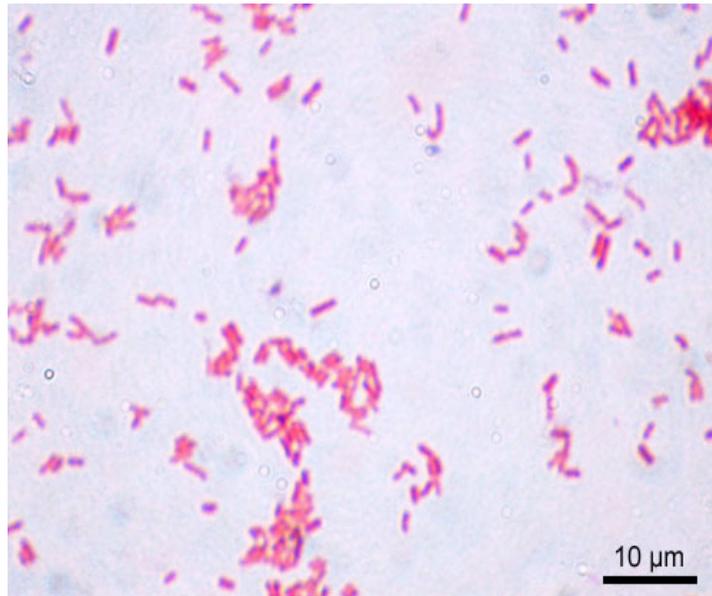


Figura 3. Tinción de Gram de *Escherichia coli*

Conservadores

Los conservantes alimentarios, a las concentraciones autorizadas no mutan en general a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación, por lo que solo su acción es en materia prima de buena calidad.

La aplicación de estos agentes para la conservación presenta muchas ventajas, pero pueden resultar obsoletas ya que la sociedad demanda, alimentos con menos conservadores y se consideran sospechosos de poseer cierto grado de toxicidad y por esta razón son rechazadas. Por lo que la industria ha optado por adoptar nuevas técnicas para la mejora y mantenimiento de sus productos y así darles mayor vida útil (Multon, 2000)

Antimicrobianos

Sustancias químicas relacionadas parcial o totalmente en el laboratorio capaces de inhibir el crecimiento y/o destruir microorganismos (Anónimo², 2005).

La mayor parte de los antimicrobianos alimentarios solamente son bacteriostáticos o fungistáticos, en lugar de bactericidas o fungicidas, por lo que su efectividad sobre los alimentos es ilimitada. Por otra parte, debido a que algunos microorganismos pueden no verse inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de antimicrobianos utilizados individualmente, puede ser preferible utilizar una combinación de ellos, ampliando así el espectro de cobertura en la preservación de los alimentos en general (Martín, 2005).

La eficacia de los antimicrobianos alimentarios depende de muchos factores entre los que se incluyen: el pH, la capacidad amortiguadora del alimento, el tiempo y la temperatura de almacenamiento del mismo, el microorganismo de interés, el tipo y la concentración de antimicrobiano. Entre los factores que influyen en la actividad antimicrobiana se encuentra la resistencia específica entre células vegetativas y esporas, las diferencias entre cepas, el nivel inicial de microorganismos, la interacción con otros microorganismos y el estado de los mismos (Martín, 2005).

Desde el punto de vista práctico existen distintos tipos de antimicrobianos:

- **Desinfectantes:** solo se aplican a sistemas inanimados y eliminan la carga microbiana total.
- **Sanitizantes:** Sólo se aplican a sistemas inanimados y disminuyen la carga microbiana total.
- **Antisépticos:** Reducen y controlan la presencia de microorganismos potencialmente patógenos, sólo se pueden aplicar externamente en seres vivos (piel y/o mucosas)
- **Antimicrobianos de uso sistémico:** Reducen y controlan la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos. Actúan en el organismo, pudiendo ser ingeridos (vía oral), absorbidos por piel (apósitos) y/o inyectados.

Los agentes antimicrobianos de uso sistémico se pueden clasificar según:

- **Origen:**
 - **Naturales:** Se obtienen a partir de microorganismos (hongos, bacterias, etc.)
 - **Sintéticos o Artificiales:** Compuestos no presentes en la naturaleza, sintetizados a nivel laboratorio, por ejemplo los nitratos, nitritos, sulfito sódico y bifenilo.
 - **Semisintéticos o Modificados:** Se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos.

➤ **Efecto:**

- **Bacteriostático:** la máxima concentración no tóxica que se alcanza en suero y tejidos impide el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, sin destruirlos, pudiendo estos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente antimicrobiano. Sirven para complementar los mecanismos defensivos del huésped.
- **Bactericida:** su acción es letal sobre los microorganismos, por lo que éstos pierden irreversiblemente su viabilidad o son lisados.

➤ **Espectro de actividad:**

- **Amplio:** actúan sobre un gran número de especies microbianas
- **Intermedio:** actúan sobre un número limitado de microorganismos.
- **Reducido:** actúan sobre un pequeño número de especies microbianas.

➤ **Mecanismos de acción:**

- Inhibición de las síntesis de la pared celular.
- Alteración de la permeabilidad celular.
- Inhibición de la síntesis proteica.
- Inhibición de la síntesis de DNA y RNA.

La demanda de los antimicrobianos en Europa para su uso en alimentos y bebidas es impulsada de acuerdo a la demanda constante de productos de alta vida útil y expansión del mercado de los alimentos de conveniencia (Anónimo², 2005).

La principal área de los antimicrobianos en la industria alimentaria esta en los productos horneados, bebidas, lácteos, carne, fruta, vegetales y productos de conveniencia, siendo la industria láctea el principal usuario.

En Europa el principal mercado de los antimicrobianos es el uso de ellos sintéticamente por la desconfianza y seguridad de los productos (Frost & Sullivan, 2003).

Antimicrobianos Sintéticos

Uno de los factores que gobierna el crecimiento de los microorganismos en los alimentos es el pH. En general las bacterias crecen a pH cercanos a la neutralidad (pH 6.5 a 7.5) pero sin embargo, son capaces de tolerar un rango de pH entre 4 y 9. A diferencia de estas, los mohos y las levaduras toleran un rango más amplio de pH para su crecimiento, ya que pueden crecer a pH por debajo de 3.5. Las bacterias por lo regular proliferan en carnes, ya que se encuentran dentro del pH neutro (de 6.5 a 7.5) (Doores, 1993).

- **Ácido Ascórbico:** Usado como aditivo alimentario, es activo poco ácido y carece de sabor. Es eficaz contra mohos y levaduras, se pierde cuando el producto esta en ebullición.

- **Sorbatos:** Es eficaz en alimentos ácidos, es económico, se utiliza contra levaduras, bacterias y mohos, posee sabor astringente poco agradable y su toxicidad es baja. Es utilizado en bebidas, productos lácteos, repostería, galletas, derivados cárnicos, conservas, etc.
- **Parabenos:** Compuestos sintéticos útiles contra mohos y levaduras. Son activos en medios neutros, proporcionan olores y sabores fenólicos a los alimentos. Son poco tóxicos. Se utilizan en protección de derivados cárnicos, conservas, productos grasos, repostería, salsas.
- **Sulfitos:** Su acción principal es la inhibición de bacterias y mohos, y en menor grado a levaduras, también actúan como antioxidantes inhibiendo reacciones de oscurecimiento producidas por enzimas en vegetales y crustáceos. Es eficaz en medio ácido. Utilizados para la conservación de zumos de uva, mostos y vinos, salsas de mostazas, derivados de fruta.
- **Nisina:** Proteína producida por un microorganismo presente en la leche fresca. Eficaz contra algunas bacterias, utilizado en productos lácteos y quesos fundidos.
- **Pimaricina:** Antibiótico útil en la protección externa de ciertos alimentos contra el ataque de mohos. Se emplea para impregnar la superficie de los quesos duros o semiduros, chorizo, salchichón, y jamones.
- **Ácido fórmico y derivados:** Proporcionan un sabor poco agradable a los productos conservados con ellos, Son bastante tóxicos, se utilizan

en la conservación de zumos de frutas, especialmente los que tienen seguimiento industrial.

- **Formaldehído:** Es un gas bastante tóxico que suele utilizarse en solución acuosa (formol o formalina). Es un agente mutágeno y cancerígeno débil. Es empleado en la desinfección de equipos industriales.
- **Acetatos:** Se utilizan como conservantes, es relativamente poco eficaz, es utilizado en la panadería y repostería. La acción conservante del ácido acético es un efecto añadido en aquellos productos en los que la acidez o el aroma típico que confiere es deseable o característico como, los escabeches, salmueras y encurtidos. El ácido acético y los acetatos son productos totalmente inocuos a las concentraciones utilizables en los alimentos.
- **Ácido propiónico:** Un ácido de cadena corta, y sus sales, se usan como conservantes alimentarios en panadería. Es efectivo contra mohos, poco eficaz contra levaduras y bacterias. Son económicos, y se utilizan también para impregnar exteriormente ciertos tipos de quesos.
- **Anhídrido carbónico:** Se produce en la fermentación de la masa del pan y en las fermentaciones que dan lugar al vino, cerveza, sidra, y es el gas responsable de la formación de las burbujas de estas bebidas.

Es poco eficaz como conservante, es un complemento de sus efectos estéticos y organolépticos. Al desplazar el oxígeno actúa también como antioxidante. En atmósferas de lugares cerrados puede ser perjudicial (más

del 3%) e incluso mortal (30 al 60%), la cantidad en los alimentos es inofensiva.

- **Cloruro sódico** (sal común): Además de ser condimento es un conservante eficaz en la mantequilla, margarina, quesos y derivados del pescado. Una dosis de 100 g puede causar la muerte.
- **Antibióticos**: Evitan la aparición de cepas bacterianas resistentes y la posible alteración de la flora intestinal de los consumidores.
- **Agua oxigenada**: Se ha utilizado en algunos productos como leche y derivados del pescado, en un proceso engañoso de “pasteurización en frío”, se emplea con frecuencia en la conservación de leche destinada a la fabricación de queso.
- **Percarbonato sódico**: Produce agua oxigenada cuando se disuelve en agua, su efecto como conservante es el mismo.
- **Ácido bórico**: Se utiliza para la conservación de mantequilla y margarina, carne, pescado y mariscos. Es relativamente tóxico, su uso está prohibido con excepción de su empleo para el caviar.
- **Oxido de etileno**: Es altamente tóxico, este gas se utiliza únicamente para la desinfección de equipos y algunas especias.
- **Dietilpirocarbonato**: Se ha utilizado para la desinfección en frío de bebidas.
- **Ácido salicílico**: Es un conservante muy usado en la elaboración de conservas caseras y encurtidos, posee relativa toxicidad.
- **Cloro**: Se utiliza como desinfectante del equipo y del agua a utilizar y como agente en el tratamiento de harinas. En forma pura es un gas muy venenoso.

Antimicrobianos Naturales

Los antimicrobianos naturales, compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, incluyendo bacterias, virus y hongos, constituyen cada vez una nueva forma de garantizar alimentos seguros, manteniendo inalterable la calidad del alimento. En boga desde hace años, el uso de estos compuestos empieza a crecer en el mercado europeo, según admiten expertos británicos, especialmente en combinación con otras técnicas modernas de control, como el análisis de riesgos y control de puntos críticos (Martín, 2006).

El uso de antimicrobianos (conservadores) es una práctica común en la industria de los alimentos, por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente, lo que ha causado en ocasiones un rechazo por parte de los consumidores de productos procesados, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones. En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados (Nychas, 1995).

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos, incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial de antimicrobianos alimentarios directos. El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos con fines antimicrobianos a los alimentos sin que ello afecte negativamente a

las características sensoriales, nutritivas y a su garantía sanitaria. Eso tiene que lograrse manteniendo los costes de formulación, procesado o comercialización (Martín et. al, 2006).

La almendra o el arándano son algunos de los alimentos con actividad antimicrobiana natural (Ferrer, 2006).

Algunos antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias. Lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad (Beuchat y Golden, 1989).

El uso de metodologías clásicas, como los tratamientos térmicos para garantizar la seguridad de los alimentos, se complementa cada vez más con nuevas tecnologías emergentes. Es el caso del uso de compuestos antimicrobianos de origen natural, una alternativa atractiva para ofrecer productos sanos y seguros (Martín, 2006).

En la mayoría de los casos, los antimicrobianos se usan principalmente para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras, y su acción depende en gran medida del pH. Cuanto más ácido es un alimento, más activo es contra los microorganismos. Los sistemas antimicrobianos naturales presentes en plantas, animales o microorganismos van ganando adeptos en el ámbito de la conservación natural, sobre todo de las actividades antimicrobiana procedente de extractos de varios tipos de plantas y partes de plantas que se usan como agentes saborizantes en algunos alimentos (Ferrer 2006).

Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen animal, vegetal y microbiano. El primero de estos grupos incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas, tales como lipasa y proteasas (Beuchat, 2001) y polisacáridos como el quitosán (Davidson y Zivanovic, 2003).

El segundo grupo incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Beuchat, 2001), mientras que el tercer grupo incluye compuestos producidos por microorganismos.

Muchas especias y hierbas exhiben actividad antimicrobiana; entre las usadas en alimentos se encuentran por ejemplo el apio, cilantro, laurel, almendra, albahaca, café, angélica, puerro, rábano picante, hierbabuena, tomillo, etc.

Los compuestos presentes en especias y hierbas que tienen actividad antimicrobiana son derivados simples y complejos del fenol (cuadro 5), los cuales son volátiles a temperatura ambiente (Martín, 2006).

Las especias son raíces, cortezas, semillas, brotes, hojas o frutos de plantas aromáticas que se añaden a los alimentos como agentes flavorizantes. Sin embargo, se sabe desde tiempos antiguos que las especias y sus aceites esenciales tienen diferentes grados de actividad antimicrobiana. El primer reporte del uso de las especias como conservadores se remonta a unos

1,550 años a. C., cuando los antiguos egipcios las empleaban para conservar alimentos y embalsamar a los muertos (Davidson, 2001).

Muchas partes de plantas y sus extractos usados como especias y hierbas han demostrado efectos antimicrobianos contra bacterias y hongos.

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces (Burt, 2004). De acuerdo a sus características químicas son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además con compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua (Nychas, 1995).

Cuadro 5: Sustancias provenientes de plantas con actividad antimicrobiana

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, Orégano
P-cimeno	Isopropil-tolueno	Tomillo
Ciñelo	Eucaliptol	Laurel, Romero
Citral	3,7 dimetil-2-6octadienal	Limón
Cominal	Culminaldehido p-isopropilbenzaldehido	Comino
Eugenol	4-alil-2-metoxifenol	Clavo
Geranoil	3,7-dimetil-3-hidroxi-1-6-octadieno	Limón, albahaca
Linatol	3,7-dimetil-3-hidroxi-1-6-octadieno	Albahaca, Cilantro
Mentol	Hexahidrotimol	Menta
Pineno	2,6,6-trimetil biciclo (3.1.1.)-2hepteno	Orégano, Perejil
Terpineol	x-terpineol	Mejorana
Timol	5-metil-4-hidroxibenzaldehido	Vainilla, Orégano

Fuente: Santiesteban, 2002.

Generalidades del Orégano

El orégano proviene de la palabra griega “Origanum” y se deriva de dos palabras, “oros” montaña y “ganos” alegría, en alusión a la apariencia festiva que le da esta planta a las laderas de las montañas donde crece (Olivier, 1997).

El orégano es una planta originaria de México, conocida con varios nombres como orégano del cerro, O. cimarrón, O silvestre, O mexicano, mejorana. Es una planta fuertemente olorosa y de gran sabor; en las zonas más cálidas el

aroma es de mayor intensidad, el sabor más picante y el perfume más persistente. Se cultiva por su demanda en el sector farmacéutico, de los licores y cosmético, además de la industria alimentaria, conservera y semillera. También la herboristería lo consume ampliamente, por sus propiedades tónicas, digestivas, estomacales y antiasmáticas (Flores, 1991).

Características Morfológicas y Anatómicas

En México se conocen aproximadamente 40 especies de plantas herbáceas pertenecientes a las cuatro familias botánicas que se le conocen con el nombre de orégano (Huerta 2005).

El orégano mexicano, por sus propiedades de aroma y sabor, ha sido utilizado en muchas formas y para distintos fines. Principalmente se ha utilizado desde tiempo inmemorial en el arte culinario mexicano, como hierba de olor (CONABIO 2005).

Características Botánicas

Las plantas de las diferentes familias del orégano mexicano se encuentran en estado silvestre (figura 4), en regiones áridas y semiáridas de 24 estados de la república. Sus principales hábitats están en suelos generalmente pedregosos de cerros, laderas y cañadas entre los 400 y 2000 metros de altitud, aunque se le halla en mayor abundancia entre los 1400 y 1800 metros de altitud. La mayor producción del orégano para fines comerciales es la del género *Lippia*, cuyas especies abundantes en México son *Lippia berlandieri* Schauer y *Lippia graveolens* HBK. Esta producción se encuentra

principalmente en los estados de Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas (CONABIO 2005).

Los oréganos comerciales son arbustos de hojas oblongadas, alcanzan de 1.2 a 2 metros de altura, y desarrollan en promedio 1.20 metros de follaje. La planta tiene sus tallos ramificados con gran cantidad de hojas, que constituyen la parte aprovechable. Estas hojas de 1 a 3 cm de largo y 0.5 a 1.5 de ancho son opuestas, alterna 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 semillas de color café, no mayores de 0.25 mm, florece en verano, de julio a octubre, y su fruto es un tetraquenio con cada parte ovoidea y lisa, es seco y globoso (Morales, 2005).



Figura 4. *Lippia berlandieri* Schauer

Clasificación Taxonómica

De acuerdo a las características morfológicas, al orégano establecido en el sur de Coahuila le corresponde la siguiente clasificación (cuadro 6).

Cuadro 6. Clasificación taxonomica del orégano

REINO	Vegetal
CATEGORÍA	<i>Metaphyta</i>
DIVISION	<i>Tracheophyta</i>
SUBDIVISIÓN	<i>Pteropsida</i>
SUPERCLASE	<i>Spermathopyta</i>
CLASE	<i>Angiospermas</i>
SUBCLASE	<i>Dicotiledoneae</i>
SERIE	<i>Gamopetalas</i>
ORDEN	<i>Lamiales</i>
FAMILIA	<i>Verbenaceae</i>
GENERO	<i>Lippia</i>
ESPECIE	<i>berlandieri</i>

Fuente: Silva, 2003

Clima y Suelo

El cultivo del orégano tiene éxito en todos los tipos de terrenos ricos en materia orgánica, sueltos, silíceos arcillosos, francos, gumíferos, calcáceos, arcilloso-arenosos e incluso en lugares áridos. Los mejores resultados, tanto cualitativos como cuantitativos, se obtienen en las zonas cálidas del sur.

Los mayores rendimientos en aceite esencial, tanto cuantitativamente como cualitativamente, se obtienen en zonas bien 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).

Usos y Composición Química del Orégano

El orégano (*Lippia berlandieri*) tiene usos medicinales, culinarios y cosméticos. Es utilizado en forma fresca y seca en la cocina mediterránea y de América Latina.

Las especies de *Lippia* tiene usos tradicionales y farmacológicos tales como culinarios, analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, sedantes, antidiarreico, tratamiento de infecciones cutáneas, antifúngico, tratamiento de desordenes hepáticos, diurético, antihipertensivo, remedio de desordenes menstruales, antimicrobiano, repelente, antimalaria, antiespasmódico, tratamientos de enfermedades respiratorias, de sífilis y gonorrea, contra la diabetes, abortivo y anestésico local (Pascual et al, 2001).

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

Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, carvacrol, canfor, linalol, α -pineno y timol, los cuales pueden variar de acuerdo al quimiotipo (cuadro 7).

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 No 5 y 6 presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano (Rastrelli, 1998).

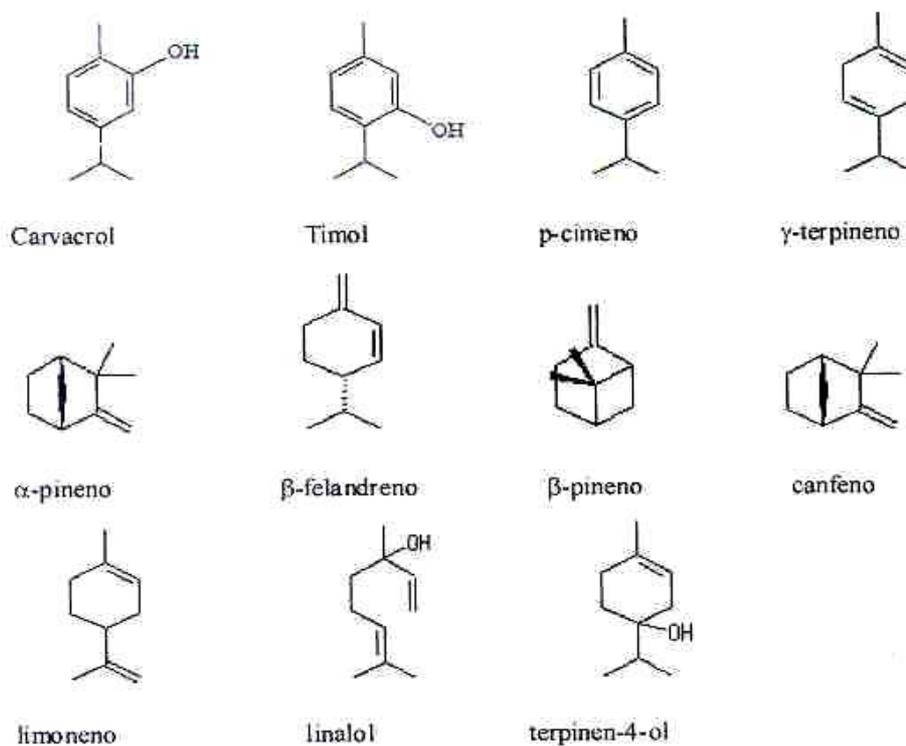


Figura 5. Estructura química de los principales componentes del orégano

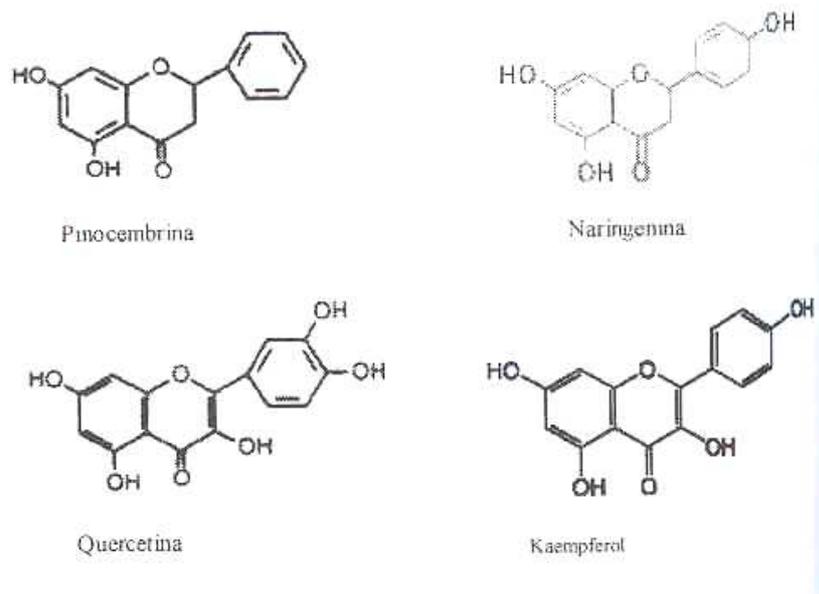


Figura 6. Estructura química de los principales flavonoides del orégano

Cuadro 7. 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%

Fuente: Huerta, 2005.

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 (Putiessky, 1996).

Los métodos convencionales (Figura 7) utilizados para la extracción de aceites esenciales son la destilación con 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 contenidos de timol superiores al 30% en muestras de orégano (*L. graveolens* Kunth) recolectadas en el estado de Jalisco (Vernin *et. al*, 2001), obtuvieron el aceite esencial de *Lippia graveolens* HBK por hidrodestilación y encontraron 45 compuestos que constituyeron el 92-93% del aceite. Los componentes principales fueron carvacrol (71%) y timol (5%) (Huerta, 2005).

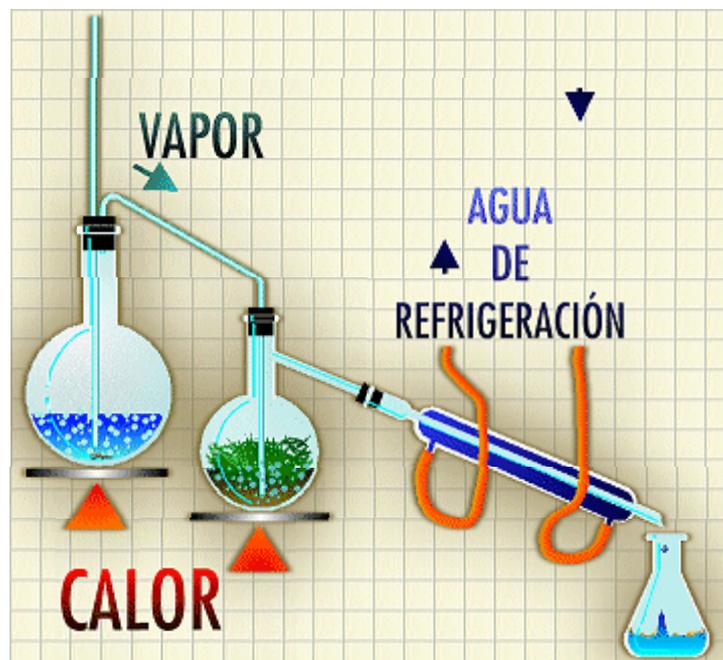


Figura 7. Sistema de arrastre por vapor convencional

Actividad Biológica de los Componentes del Orégano

En el cuadro 8 se menciona que una de las principales actividades biológicas del orégano es su capacidad antioxidante, especialmente en especies del género *Oreganum* (Barievik, 2002).

La función antioxidante de diversos compuestos en los alimentos ha atraído mucha atención en relación con el papel que tienen en la dieta en la prevención de enfermedades (Kahkoren, 1999).

Los compuestos antioxidantes son importantes porque poseen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo, el cual provoca envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas, tales como el cáncer, enfermedad cardiovascular y diabetes. Los antioxidantes como los tocoferoles, los carotenoides, el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos se consumen a través de los alimentos. En algunos estudios de especias se han aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos (Azuma, 1999).

Cuadro 8. Actividades biológicas de orégano

Actividad	Genero
Antioxidante	<i>Origanum</i>
	<i>Lippia</i>
Antimicrobiana	<i>Origanum</i>
	<i>Lippia</i>
Antiparasítica	<i>Lippia</i>
Estrogénica	<i>Origanum</i>
Antigenotóxica	<i>Origanum</i>
	<i>Lippia</i>
Insecticida	<i>Origanum</i>

Importancia Económica del Orégano

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 su calidad como en el volumen que se produzca. 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 actualmente son escasos e irregulares.

De las casi 4000 ton 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. Obviamente esto no beneficia al productor, al que se le paga el producto a precios ínfimo.

Nuestro país ha participado durante una década con 35 ó 40% de la producción mundial en el mercado internacional, lo que lo ubica como el principal productor de esta especia. El segundo lugar lo ocupa Turquía con el 30% y el tercer lugar Grecia, con el 22.5% aproximadamente. El comercio del orégano mexicano se realiza principalmente con Estados Unidos, al cual se exporta alrededor del 85% de la producción nacional; el 10% va al mercado doméstico y el 5% a países europeos y asiáticos. La aceptación del orégano

mexicano se explica por su calidad, expresada en su gran poder saborizante (Huerta, 2005).

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 tener el aceite esencial un precio de 180 dls por litro, debido a esto la comercialización de este se convierte en un negocio rentable, siendo los principales compradores Estados Unidos, Francia, Italia y España, además de ser utilizado como antimicrobiano en la conservación de alimentos también se utiliza en licorería, perfumería, antirreumático, pomadas contra la dermatitis, etc (Silva, 2003).

III METODOLOGÍA

El trabajo fue realizado en dos etapas, con la finalidad de obtener resultados preliminares y estructurarlos en la segunda.

ETAPA 1. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana Contra Mesófilos Aerobios.

Obtención del Aceite Esencial de Orégano

El aceite esencial de orégano utilizado, se compone de tres fracciones, extraídas mediante el método de arrastre por vapor, el cual consiste en exponer el producto a un flujo de vapor de agua que extrae los compuestos de interés. Obteniendo así, tres fracciones, con diferentes contenidos de timol y carvacrol (cuadro 9), el aceite fue proporcionado por el Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA) ubicado en Salaires, Chihuahua.

Cuadro 9. Composición del aceite esencial de orégano para cada fracción.

FRACCIÓN	COMPOSICIÓN
1	38.25% Carvacrol
2	77.4% Timol
3	27.67% Timol + 11.31% Carvacrol

Valoración de la Actividad Antimicrobiana

A fin de evaluar la capacidad inhibitoria de las tres fracciones de aceite esencial obtenidas, se procedió a la aplicación en carne fresca para su posterior almacenamiento bajo condiciones ambientales y refrigeración. La

evaluación se dio en función al tiempo de desarrollo microbiano siguiendo los procedimientos que a continuación se describen:

Preparación de las Muestras de Carne y Conteo de Mesófilos Aerobios

Se evaluaron muestras de carne de pavo, las cuales fueron adquiridas bajo condiciones controladas en establecimientos de la ciudad de Saltillo, Coahuila.

La carne fue pesada y adicionada con el aceite esencial a concentraciones de 0, 0.05, 0.10, 0.15 % de las fracciones obtenidas con diferentes proporciones de timol y carvacrol, componentes activos, usando como vehículo aceite vegetal. Posteriormente fueron almacenados bajo condiciones de refrigeración (4 °C) y temperatura ambiente (30 °C) para su evaluación en función al contenido de flora contaminante, a intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas de almacenamiento. El método utilizado para la cuenta total de mesófilos fue el propuesto por la AOAC 1993.

Los resultados obtenidos del conteo de mesófilos aerobios fueron analizados estadísticamente a través de un análisis de varianza y de t-student a fin de establecer tanto la fracción a la cual se presenta la mayor inhibición del desarrollo microbiano, como la concentración más apta.

ETAPA 2. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana en Patógenos.

Viabilización de cepas patógenas

Las cepas empleadas fueron cultivos puros, con los que se trabajaron en investigaciones anteriores en la misma Universidad, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Las cepas de *E. coli*, y *Staphylococcus aureus*, se viabilizaron mediante caldos de enriquecimiento (TSB), en tanto que para la *Salmonella typhi* se utiliza caldo de tetracionato, posteriormente fueron incubadas a 35 °C durante 24 horas, para después sembrarse en agar selectivos correspondiente.

Posteriormente se realizó un estudio de su morfología colonial macroscópica y se tomó muestra para frotis y observación microscópica, mediante tinción de Gram.

Inoculación de la Carne de Pavo con *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella typhi*

Una vez determinada la fracción del aceite esencial, con la mayor actividad antimicrobiana se continúa con la inoculación de las cepas patógenas, sobre las muestras de carne de pavo por duplicado siendo el inóculo promedio de 76×10^5 ufc/ml en *E. coli* y 25×10^5 de *S. aureus*, previamente adicionadas con la fracción 2 a concentraciones de 0.10, 0.15 y 0.20 % cada una,

almacenándose en refrigeración para su posterior monitoreo en función al desarrollo microbiano a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 hrs. Mediante las técnicas propuestas por la AOAC 1993 para los casos de *E. coli* *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*.

Los resultados alcanzados del conteo de patógenos fueron analizados estadísticamente a través de un análisis de varianza y mediante el método de t-student a fin de evaluar el grado de inhibición obtenido para cada concentración y microorganismo en estudio.

IV RESULTADOS

ETAPA 1 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Determinación de la Fracción de timol-carvacrol con mejor actividad antimicrobiana en carne de pavo.

Se aplicaron las tres fracciones del aceite esencial, conteniendo diferentes proporciones timol-carvacrol en la carne de pavo a fin de probar su actividad antimicrobiana contra mesófilos aeróbicos contaminantes de la carne.

Los resultados obtenidos en la cuenta de mesófilos aerobios bajo condiciones ambientales muestran el cambio en el conteo inicial, donde es posible observar el comportamiento microbiano bajo las diferentes concentraciones de las tres fracciones del aceite esencial que se encuentran en el cuadro 10 presentando el efecto inhibitorio sobre los mismos. Los resultados se presentan como las medias del análisis de varianza realizado ($p \leq 0.05\%$).

Cuadro 10. Medias de las ufc/ml bajo condiciones Ambientales.

Fracción	Concentración %	Tiempo (hrs.)					
		0	24	48	72	96	120
1	0	4.45	5.78	4.69	11.80	9.91	3.34
1	0.05	4.45	4.75	6.69	9.31	10.00	6.75
1	0.1	4.45	4.15	8.12	9.29	9.32	6.37
1	0.15	4.45	4.23	10.40	9.37	9.07	6.26
2	0	4.45	2.82	8.47	6.65	12.20	5.84
2	0.05	4.45	2.77	9.11	8.77	9.73	6.02
2	0.1	4.45	3.43	5.83	6.23	10.00	4.77
2	0.15	4.45	4.37	6.12	8.75	10.50	4.80
3	0	4.45	7.30	8.38	9.00	8.35	7.97
3	0.05	4.45	8.50	9.41	8.00	6.45	3.69
3	0.1	4.45	8.00	9.03	8.00	4.87	2.81
3	0.15	4.45	9.05	8.15	8.00	5.59	1.80

La figura 8 presenta el desarrollo de la flora aerobia bajo condiciones ambientales, en función a las fracciones evaluadas (1, 2 y 3).

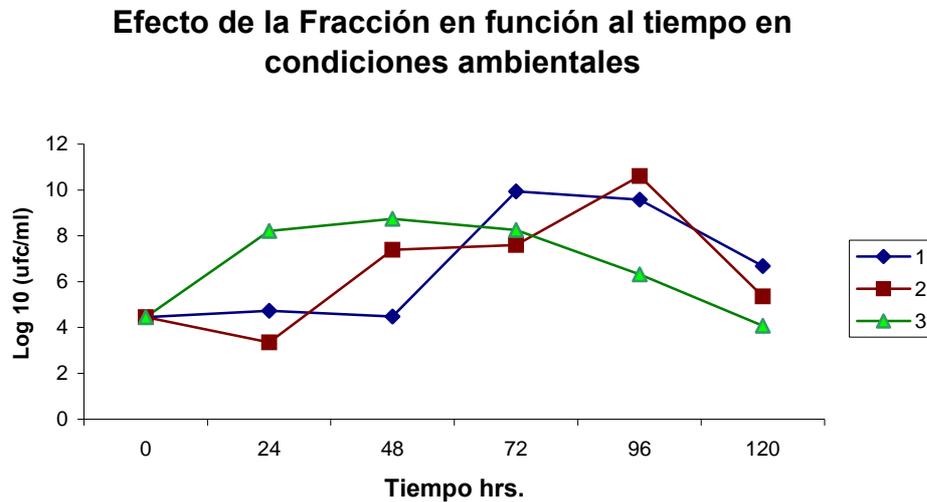


Figura 8. Crecimiento microbiano en las muestras de las fracciones 1, 2 y 3 en función del Tiempo (0,24, 48, 72, 96 y 120 hrs.) en condiciones ambientales.

Del ANOVA (Anexo 1) realizado es posible citar que la fracción 3, presenta un incremento significativo a las 24 y 48 hrs. del tratamiento para posteriormente decrecer constantemente hasta alcanzar niveles inferiores al conteo inicial. La fracción 2 disminuye por debajo de la cuenta inicial a las 24 hrs. de contacto para mantener incrementos constantes en el desarrollo microbiano hasta las 96 hrs. decayendo finalmente a las 120 hrs. La fracción 1 mantiene incrementos constantes en el desarrollo de flora aerobia hasta las 72 hrs. con un ligero decremento a las 96 y 120 hrs. dichos conteos son superiores a los presentados a los mismos tiempos por las fracciones 2 y 3.

La cuenta de mesófilos aerobios en condiciones de refrigeración se muestran en el cuadro 11, como la media del análisis de varianza realizado.

Cuadro 11. Medias de las ufc/ml bajo condiciones de refrigeración

Fracción	Concentración %	Tiempo (hrs.)					
		0	24	48	72	96	120
1	0	4.45	7.16	9.16	10.22	10.79	7.39
1	0.05	4.45	6.61	8.21	9.37	9.73	6.69
1	0.1	4.45	5.44	8.00	9.06	10.13	7.35
1	0.15	4.45	4.63	7.10	9.34	7.25	6.90
2	0	4.45	6.01	6.19	6.28	7.11	6.81
2	0.05	4.45	4.85	5.00	7.56	9.68	5.59
2	0.1	4.45	5.47	5.55	6.93	7.24	3.80
2	0.15	4.45	5.60	6.11	9.15	5.59	2.68
3	0	4.45	6.54	7.70	9.20	5.45	2.23
3	0.05	4.45	8.39	11.55	8.30	4.90	1.07
3	0.1	4.45	8.00	11.51	10.53	3.74	2.23
3	0.15	4.45	8.15	8.39	8.59	4.45	0.48

En la figura 9 se encuentran graficados los datos obtenidos del ANOVA correspondientes a los mesófilos alcanzados en condiciones de refrigeración (Anexo 2), donde se manifestó que las fracciones uno y dos incrementan constantemente su cuenta microbiana hasta las 72 hrs. aumentando en mayor grado de significancia la fracción uno, manifestándose una constancia hasta las 96 hrs. para las dos fracciones y un decremento a las 120 hrs., obteniendo valores por encima del tiempo inicial, más sin embargo, la fracción dos decrece en mayor proporción que la fracción uno.

Para la fracción tres, el comportamiento de la flora microbiana incrementa hasta las 48 hrs., donde posteriormente decrece constantemente hasta las 96 hrs. en la cual se obtiene que la cuenta microbiana es estadísticamente similar a la fracción dos a las 120 hrs. siguiendo su decremento hasta las 120 hrs. donde se logran cuentas microbianas por debajo de la cuenta inicial siendo estadísticamente significativas.

Efecto de la Fracción en función al tiempo en Refrigeración

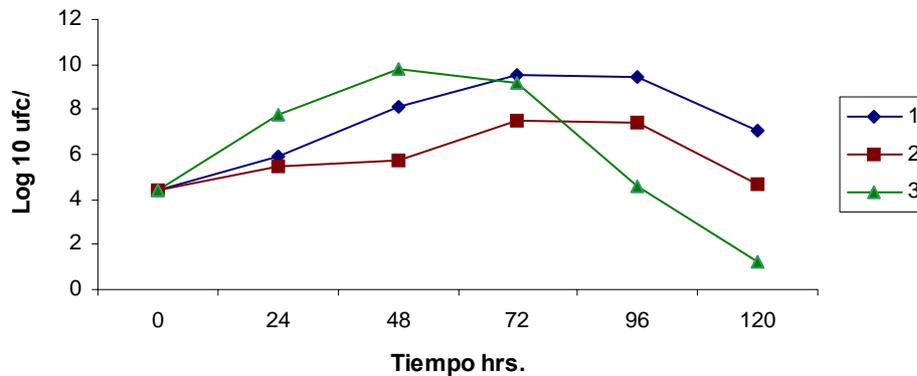


Figura 9. Crecimiento microbiano en las muestras de las fracciones 1, 2 y 3 en función del Tiempo (0, 24, 48, 72, 96 y 120 hrs.) en condiciones de refrigeración.

Donde se observa que la mayor actividad antimicrobiana en condiciones ambientales y de refrigeración es la fracción 3, siendo estadísticamente significativa, seguida por la fracción dos.

Determinación de la Concentración con Mejor Actividad Antimicrobiana en Carne de Pavo

Se procedió al análisis del efecto que presentaron las concentraciones en función al tiempo y distinto almacenamiento, obteniendo la gráfica que muestra la figura 10 a partir de los datos de la tabla 10, expresando como las medias del análisis de varianza bajo condiciones ambientales.

Efecto de la concentración en función al tiempo en condiciones ambientales

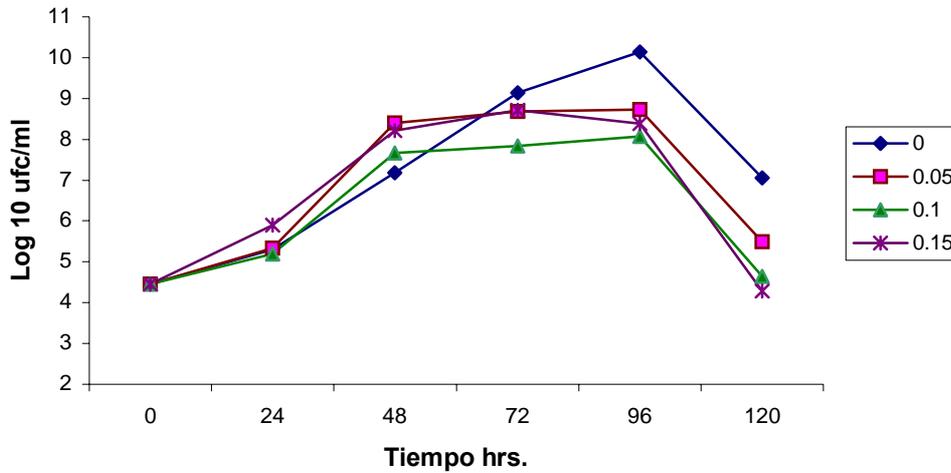


Figura10. Gráfica de crecimiento microbiano para cada concentración (0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) en función al tiempo, en condiciones ambientales.

Donde se puede apreciar a partir del ANOVA (Anexo 3) un incremento constante en el conteo microbiano en función al tiempo hasta las 72 hrs. de contacto con el antimicrobiano, para todas las concentraciones, sobre saliendo la de 0.10%, en la cual los incrementos presentados son estadísticamente menores a los de el resto de los tratamientos. Las concentraciones de 0 y 0.05% continúan con su crecimiento a las 96 hrs. y decrecen a las 120, siendo las lecturas de la concentración 0 mayores que las del resto de las muestras.

Opuestamente los tratamientos al 0.10 y 0.15% presentaron estabilidad a las 96 hrs. y decrementos a las 120 hrs.

También se puede apreciar la semejanza de los valores que se obtienen en las fracciones evaluadas de 0.10 y 0.15 %.

La figura 11 contiene la grafica obtenida a partir de el cuadro 11, donde es posible apreciar el efecto obtenido con las distintas concentraciones del aceite esencial en la carne de pavo.

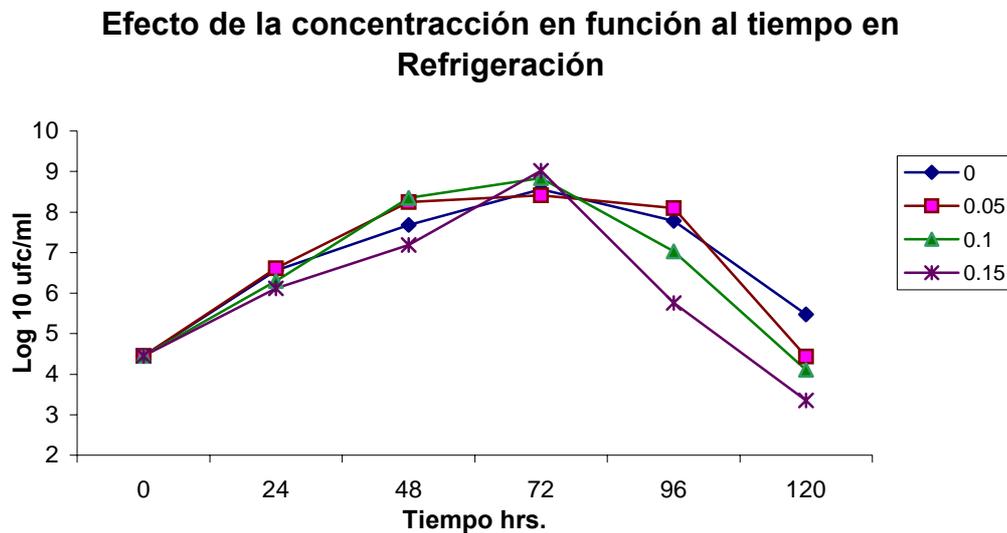


Figura 11. Gráfica de crecimiento microbiano para cada concentración (0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) en función al tiempo, en condiciones de Refrigeración.

A partir del ANOVA (Anexo 4), los resultados obtenidos fueron, que para la concentración cero, que es el testigo, se aprecia un aumento en la carga microbiológica hasta las 72 hrs., conllevando un decremento constante a las 96 hrs., y terminando con un descenso hasta las 120 hrs.

Para la concentración de 0.05 y 0.10% incrementa constantemente la cuenta bacteriológica hasta las 72 hrs. decreciendo a las 96 y 120 hrs. sin embargo, para la concentración de 0.05% los resultados de las 120 hrs. son estadísticamente igual a la cuenta microbiana inicial, y para la concentración de 0.10% los valores obtenidos a las 120 hrs. resultan inferiores a la cuenta inicial, teniendo que las diferencias son estadísticamente significativas.

En la concentración de 0.15% aumentan sus valores hasta las 72 hrs. donde son estadísticamente similares a los obtenidos a la misma hora pero en concentraciones de 0.10%, donde se da un descenso en las 96 y 120 hrs. teniendo valores muy por debajo de la cuenta inicial.

Por otra parte, la mejor concentración para la inhibición de mesófilos aeróbicos para las dos condiciones de almacenamiento (Ambiente y Refrigeración) fue la concentración de 0.15% seguida por la de 0.10%.

ETAPA 2. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana Frente a Patógenos.

Determinación de la Concentración Óptima del Aceite Esencial con Mejor Actividad Antimicrobiana ante *Staphylococcus aureus* en la Carne de Pavo en Condiciones de Refrigeración

De acuerdo a los resultados obtenidos (Cuadro 12), se puede observar el constante descenso de la carga microbiana en el transcurso de las horas en las concentraciones manejadas.

Cuadro 12. Medias de las ufc/ml de *S. aureus*.

Concentración %	Tiempo					
	0	24	48	72	96	120
0	4.19	4.60	4.65	4.69	4.81	5.02
0.1	4.19	3.00	3.14	3.70	2.58	0.72
0.15	4.19	3.87	3.86	3.02	2.84	2.15
0.2	4.19	3.38	3.59	3.15	2.27	0.45

Como se puede observar en la figura 12, el testigo, sin adición de aceite de orégano, presentó incrementos constantes en el conteo de la población microbiana siendo estos estadísticamente significativos ($p \leq 0.05\%$).

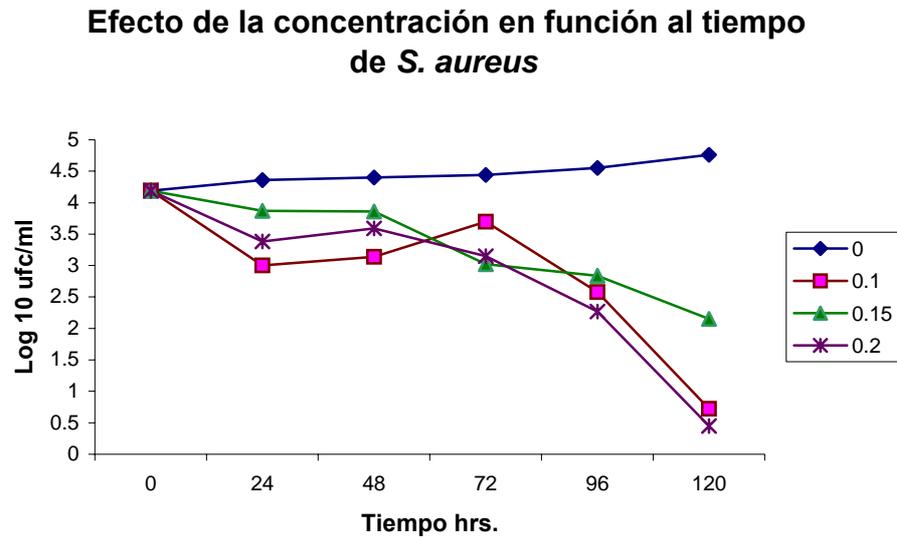


Figura 12. Gráfica de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en función a la concentración F3 (0, 0.10, 0.15 y 0.20 %)

En contraste de acuerdo al ANOVA, todas las muestras tratadas con las diferentes concentraciones del aceite esencial, presentaron un comportamiento diferente al testigo ya que ninguna de ellas muestra valores superiores, pudiendo apreciar claramente el efecto de inhibición de la multiplicación microbiana.

Del análisis de varianza (anexo 5) realizado a los tratamientos aquí presentados es posible apreciar los diferentes comportamientos para cada una de las concentraciones aplicadas teniendo que la concentración de 0.10% presenta un disminución significativa en el conteo microbiano a las 24 hrs. y constancia a las 48 hrs. ($p \leq 0.05\%$), para tener un incremento a las 72 hrs. y una nueva disminución a las 96 y 120 hrs. de tratamiento.

De acuerdo al mismo análisis es posible apreciar como para la concentración de 0.15% y 0.20% los conteos en el desarrollo de la población microbiana disminuyen con respecto al inóculo inicial a las 0 hrs. y este decremento es continuo en función al tiempo, teniendo que los decrementos son estadísticamente mas significativos para la muestra tratada al 0.20% que para la del 0.15%.

Determinación de la Concentración Óptima del Aceite Esencial con Mejor Actividad Antimicrobiana ante *Escherichia coli* en la Carne de Pavo en Condiciones de Refrigeración

Los resultados que se obtuvieron en el conteo de *E. coli*, son presentados en el cuadro 13 y graficados en la figura 13, los cuales indican que para la muestra sin inhibidor existe un aumento constante durante el periodo monitoreado.

A partir del ANOVA (Anexo 6) es posible citar que la concentración de 0.10% disminuye a las 24 hrs. de exposición con el aceite esencial manteniendo el conteo de la carga microbiana a niveles estadísticamente similares, para posteriormente, a partir de las 72 hrs. tener decrementos significativos, constantes hasta las 120 hrs. Para las concentraciones de 0.15 y 0.20% se observa un gran decremento a las 24 hrs., el cual es estadísticamente similar, y superior al obtenido con el tratamiento al 0.10%, seguido por un incremento con respecto a este, pero por debajo de los niveles inoculados inicialmente, para la concentración de 0.15% y cuyo valor es estadísticamente similar al

nivel alcanzado a este mismo tiempo, pero con la concentración de 0.10, no siendo así para la concentración de 0.20% la cual alcanza un nivel estadísticamente similar al inoculado, para luego mantenerse constante hasta las 72 hrs., en la concentración de 0.15% y disminuir en la 0.20 a nivel estadísticamente similares, e iniciar su decremento a partir de las 96 hrs. a niveles estadísticamente similares entre los tres tratamientos.

Cuadro 13. Medias de las ufc/ml de *E. coli*.

Concentración %	Tiempo					
	0	24	48	72	96	120
0	4.53	4.55	4.58	4.63	4.75	4.87
0.1	4.53	3.27	3.31	3.27	2.72	1.95
0.15	4.53	1.54	3.07	3.04	2.84	1.93
0.2	4.53	1.60	4.61	3.30	2.08	1.89

Efecto de la concentración en función al tiempo de *E. coli*

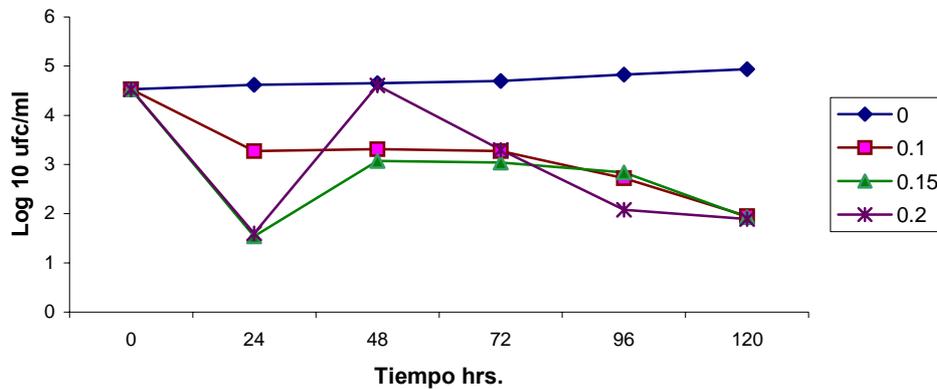


Figura 13. Gráfica de crecimiento de *Escherichia coli* en función a la concentración F3 (0, 0.10, 0.15 y 0.20 %).

Determinación de la Concentración Óptima del Aceite Esencial con Mejor Actividad Antimicrobiana ante *Salmonella typhi* en la Carne de Pavo en Condiciones de Refrigeración

En el cuadro 14 se muestran las medias obtenidas durante todo el tratamiento de sus distintas concentraciones en función al tiempo, con las cuales se analizan en el ANOVA (Anexo 7) para la obtención de su mejor tratamiento.

Cuadro 14. Medias de las ufc/ml de *Salmonella, typhi*

Concentración %	Tiempo					
	0	24	48	72	96	120
0	4.29	4.58	4.70	4.88	5.10	5.23
0.1	4.29	3.15	2.15	0	0	0
0.15	4.29	1.54	0	0	0	0
0.2	4.29	1.5	0	0	0	0.39

En la figura 14 se puede apreciar el crecimiento de la cuenta microbiana sin la adición del aceite esencial, en la cual se incrementa constantemente en el transcurso de las horas.

Se puede observar que las carnes tratadas con las diferentes concentraciones presentan un decremento desde las 24 horas de adición del inhibidor, manteniéndose constante hasta alcanzar niveles de 0 a las 72 hrs. para la muestra tratada al 0.10% y a las 48 hrs. para las muestras tratadas al 0.15 y 0.20%. La concentración de 0.20% mostró un aumento estadísticamente significativo a las 120 hrs.

Efecto de la concentración en función al tiempo de *S. typhi*

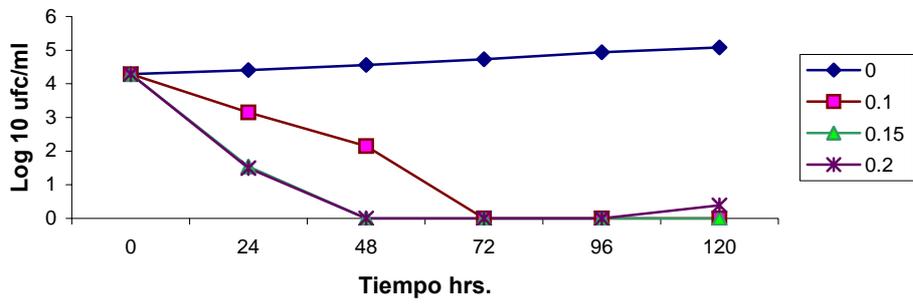


Figura 14. Gráfica de crecimiento de *Salmonella typhi* en función a la concentración F3 (0, 0.10, 0.15 y 0.20 %).

V. DISCUSIONES

Los resultados obtenidos concuerdan con trabajos presentados anteriormente donde se obtiene que la mejor fracción es la 3 debido a las proporciones que se encuentra el timol (27.63%) y el carvacrol (11.31%), ya que causa efectos sinergistas.

Los resultados coinciden con los estudios realizados por Morales (2005) y De la Fuente (2006), quienes evaluaron la aplicación del aceite esencial del orégano en la carne de res y pollo respectivamente, también concuerda con los de la UDLA donde se evaluaron mezclas ternarias y cuaternarias con estos compuestos, además de que usaron antimicrobianos sintéticos y su actividad antimicrobiana se comportó de manera similar (Campomanes, 2003). Así mismo, la dosis en la cual el efecto inhibitorio fue mayor es en la de 0.15% y 0.10%, ya que estas reducen la carga microbiana considerablemente presentándose este comportamiento en todas las fracciones usadas. La dosis de 0.05%, en algunos casos esta concentración no tuvo ningún efecto.

Los patógenos estudiados en el trabajo fueron *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, de las cuales la que tuvo mayor resistencia a las concentraciones usadas fue *Escherichia coli* donde las tres concentraciones utilizadas no tuvieron diferencias significativas. Para la concentración de 0.15% resulta una gráfica muy peculiar, según autores manifiestan que esos comportamientos se deben a la resistencia antimicrobiana debido a las defensas frente al antimicrobiano, causando su

muerte o su evolución y mutación. Presentan una disminución en su desarrollo en tanto llega una duplicación de los microorganismos terminando con la curva normal de crecimiento (Navarro, 2007).

Para *Staphylococcus aureus* presenta una disminución importante en el contenido microbiano para las concentraciones de 0.20% y 0.10%, siendo éstas significativamente iguales, pero la que tuvo mayor inhibición fue la de 0.20%, lo cual concuerda con los estudios realizados por de la Fuente (2006), quien evaluó la aplicación de aceite de orégano en carne de pollo para su conservación, ya que dichas carnes son parecidas en su estructura y composición, así también concuerda con estudios obtenidos en la Universidad Autónoma de Chihuahua, donde en dicho experimento se manejaron CMI y CMB para los patógenos anteriormente mencionados y de los cuales *S. aureus* muestra las más bajas concentraciones tanto inhibitorias como bactericidas (Maguregui et. al., 2004)

Salmonella typhi presentó mayor sensibilidad al aceite de orégano en las tres concentraciones, principalmente la de 0.15 y 0.20% reduciendo su carga bacteriana a cero, Morales en el 2006 recomienda el uso de una concentración superior, similar a lo reportado por la Universidad de Gante para un estudio in vivo (Rota et. al., 2004) donde indican una reducción a cero en el conteo microbiano en hojas de lechuga, así como la Universidad de Oklahoma en el estudio antes citado donde se observa inhibición a concentraciones de 0.15% y 0.20%, siendo que este microorganismo baja su cuenta a valores indetectables.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación con la carne de pavo adicionada con diferentes concentraciones de aceite esencial bajo condiciones de almacenamiento de ambiente y refrigeración, se concluye que el aceite esencial de orégano es efectivo contra la flora mesófila contaminante de la misma, siendo la mejor la fracción 3 a una concentración de 0.15%, seguida de la de 0.10%, para condiciones de medio ambiente y refrigeración, con mayores efectos inhibitorios en la carga microbiana aerobia. También la fracción 2 expresó un comportamiento similar, pero en menor cantidad. Dichas fracciones reducen la carga microbiana de la carne y la mantienen constante.

En lo referente a microorganismos patógenos, la misma fracción 3 a concentración de 0.15% fue la que presentó mejores resultados, seguido de la concentración al 0.20%. El microorganismo patógeno más sensible fue *S. typhi*, seguido de *S. aureus*, y el que presentó mayor resistencia fue *E. coli*.

Por lo anterior, se sugiere la aplicación de aceite esencial de orégano mexicano (*L. berlandieri* Schauer) en la conservación de carne fresca de pavo, aunque se recomienda realizar estudios sensoriales, así como de metodologías de envasado a fin de mejorar resultados de calidad sensorial y de inocuidad para beneficio del consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS**, M.R. Moss, M. O. 1997. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp 141-148.
- ANÓNIMO 1, 2006.** Carne de pavo. Desafío para emprendedores. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_13/13_03_pavo.htm
- ANÓNIMO 2.** 2005. Disponible en:
<http://www.microbiologia.com.ar/antimicrobianos/general.php>
- ANÓNIMO 3, 2003.** Revista CONSUMER. El pavo un ave de bajo contenido graso, Revista Consumer, Erosky Marzo 2003. Disponible en:
http://consumer.es/web/es/alimentación/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/carnes_huevos:y_derivados/2003/03/04/58578.php
- ANÓNIMO 4, 2003.** USDA, Guía de alimentos consumer. Guía de alimentos Consumer 2003. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas7r_13/13_03_pavo.htm
- ARDERLE,** et al. 2001. Disponible en:
<http://grad.uprm.edu/tesis/ramoshernandez.pdf>
- AZUMA** K. Ippoushi K. Ito, H. Higashio, 1999. Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers. J, Sci Food Agric. Pp. 79-2010-2016
- BARIEVIK**, D. Bartol, 2002. Orégano. The genero *Origanum* and *Lippia*. Medicinal and aromatic plants industrial profiles. Edited by Spiridon E. Kintzios Arhens, Greece. Taylor and Francis, London and New York. Chap 8, Pp. 177-213.
- BEAN**, et al, 2000. Técnicas Tradicionales en el Análisis Microbiológico de los Alimentos. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- BEUCHAT** & Goleen, 2001. Control of Food borne Pathogens and Spoilage Microorganisms by Naturally Occurring Antimicrobials. En: Microbial Food Contamination, Wilson. CL, S Droby (Ed) CRC Press London, pp 11:149-169
- BURT S.** 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods a Review. J. Food Microbiol. Pp 223-253
- CAMPOMANES M. J. P.** 2003. Evaluación del efecto de mezclas ternarias y cuaternarias de antimicrobianos en *Aspergillus parasiticus*. Tesis de Licenciatura en ingeniería de Alimentos. Universidad de las Américas, Puebla. Disponible en: http://140.148.3.250/u_dl_a/servlet/mx.udlap.ict.tales.html.Block?Thesis=111&Type=o
- CONABIO**, 2005. (Comisión Nacional de Biodiversidad) Orégano Mexicano: Oro Vegetal. 28 de Enero 2005. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/biodiversitas.hym>
- DAVIDSON**, P. M. 2001. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobials Compounds. En: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, 2da Edición Doyle MP. LR Beuchat, JT Montville (Eds). Asm Press, Washington, D. C, USA. Pp 29:593-627
- DAVIDSON P. M.;** S Zivanovic, 2003. The use of naturals antimicrobials. E: Food Preservation Techniques, Zeuthen P, L Bogh_ Sorencen (Ed), Washington, D.C, USA, Pp, 2:5-29.
- DE LA FUENTE** Estupiñan M.P. 2006. Aplicación de Aceite de Orégano (*Lippia Berlandieri*) en Carne de Pollo para su conservación. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- DOORES S,** 1993. Organic acids. En antimicrobials in Foods, 2da Edición Davidson P. M. Al Branen (Ed) Marcel Dekker, inc New York, USA. Pp 4:95-135
- FERRER,** 2006. Antimicrobianos naturales. Disponible en: http://www.ciad.mx/images/files_pdf
- FLORES G.G.T.,** 1991. Selección De una propuesta de manejo para Orégano, en la Zona Norte de Jalisco. INIFAP-CIFAP-Jalisco.
- FROST & Sullivan,** 2003. Mercado de los Compuestos Antimicrobianos. Disponible en:

<http://docum.aztiltranet/Alimentatec.nsf/vwTematicaPlana/F3266E86CDA4AFA8C1257227003CEB40?OpenDocument&Categoria=Tendencias%20en%20mercado>.

- GROSS** & Rowe, 1985. *Escherichia coli diahehuea*, Juarnal of higiene. Pp. 95: 531-550
- HALE** et al, 1983. "Characterizacion of vivience plasmids and plasmad-asociated outer membrana proteins in *Shigella flexeneri*, *Shigella sonnei*, and *Escherichia coli* infeccion and inmunity. Pp. 40: 340-350
- HUERTA**, C, 2005. Orégano Mexicano: Oro Vegetal. Conabio. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctps/indice15.htm
- ICMSF**, 1997. Microbiología de los Alimentos. Características de los Microorganismos Patógenos. 1ra Edición Internacional Comision on Microbिलical Specification for Foods. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp 259-265
- ICMSF**, 2000. Microbiología de los Alimentos. Su significado y Métodos de Enumeración, 2da Edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp2.14
- JAY** J. M. 1973. Microbiología Moderna de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp 103-116
- JUSTESEN** U, 2001. Composition of Flavonoids in freshherbs calculation of flavonoid intake by use of herbs in tradicional Danish dishes. Food Chemistry. Pp. 245-250.
- KAHKOREN**, M. P., 1999. Hopia Al. Vurela HJ, Rauha JP, Pihlaja Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food. Chem 47, Pp. 3954-3962.
- MAGUREGUI**, O. C.C. Muñoz, V. T. Gastelum, G. G. 2004. Efecto antimicrobiano de extractos orgánicos obtenidos a partir de Bagazo de Orégano Mexicano (*Lippia berlandieri*) Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Ciencias Químicas.
- MARTÍN** B., Olga, et al 2005. Aceites Esenciales como Antimicrobianos en Frutas y Hortalizas. Disponible en: http://www.ciad.mx/dtaor/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf

- MORALES**, A. G., 2005. Aplicación del Aceite Esencial de Orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) en la Conservación de Carne de Res. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- MULTON**, J. L., 2000. Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las Industrias Agroalimentarias, 2da Edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp 14-19.
- NAVARRO** Risueño, et al, 2007. Lectura interpretada del Antibiograma de enterobacterias. Disponible en: http://external.doyma.es/espacio_formacion/eime/temasm2t2.pdf
- NYCHAS**, 1995. Conservadores. Antimicrobianos Naturales. Disponible en: http://www.ciad.mx/dtaor/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil.pdf
- OLIVIER** G., 1999. The world market of orégano. Oregano. Proceedings of the IPGRI International work shop on oregano. Ed, Padulosi S. Pp. 141-145.
- PASCUAL**, ME et al, 2001. Lippia: tradicional uses, Chemistry and pharmacology: A review. J. Ethnopharmacol. Pp 76, 201-214. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_isorefpid=s0004-62220040001000151Ing=es
- PARRILLA**, et al, 1993. Técnicas Tradicionales en al Análisis Microbiológicos de los Alimentos. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- POLOTSKY** Y. V. E. et al, 1997. Pathogenic effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Escherichia coli* causing infantile diarrhoea, Acta Microbiological. Hungárica. Pp. 24: 221-236
- PRESCOTT**, Harley, Klein, 2000. Microbiología Quinta Edición. Editorial Mc Graw Hill*Interamericana. Pp 1010-1013
- PUTIEVSKY**, E, 1996. Cultivation , Selectioin and Conservation of Oregano Species in Israel. Ed Padulosi. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_isorefpid=s0004-62220040001000151Ing=es
- RAMOS** Hernández, 2005. Disponible en: <http://grad.uprm.edu/tesis/ramoshernandez.pdf>

- RASTRELLI L**, 1998. Iridoids from *Lippia gaveolens*. Phytochem. Pp, 1829-1832. Disponible en:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_isorefpid=s0004-62220040001000151Ing=es
- ROTA, C.** 2004. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas. Depto, de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria.
- SAGARPA**, 2001. Disponible en:
<tp://www.sagarpa.gob.mx/csgs/comunica/boletines/2001/Diciembre/B372.htm>
- SANTIESTEBAN**, 2002. Agentes Antimicrobianos de Alto Espectro a Partir de Mezclas de Agentes Antimicrobianos Sintéticos Naturales. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas-Puebla.
- SILVA, V. R.** 2003. El orégano (*Lippia Berlandieri Schauer*) como Alternativa de Producción Agrícola Sustentable para las Zonas Áridas y Semiáridas de México. Folleto para Productores. CIRENA. Saltaices, Chihuahua.
- TEJEDA Fausto**, 2006. Técnicas Tradicionales en al Análisis Microbiológicos de los Alimentos. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- VERNIN, et. al**, 2001. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from. El Salvador Flavour Fragrance J. Pp. 219-226.
- WAGNER**, 2003. Eldmadfa I. Biological relevante of terpenoids. Overview focusing on mono; di-and tetraterpenes. Ann: Nutri Metabol. Pp. 47: 3-4, 95-106.

ANEXOS

Respuesta del Log 10 D*10 5 Crecimiento Medio Ambiente

Anexo 1:Fracción-Tiempo

t-student

Nivel		Cuadrado de las Mo
2,96	A	10,60
1,72	B	9,94
1,96	C	9,58
3,48	D	8,74
3,72	E	8,25
3,24	E	8,21
2,72	F	7,60
1,48	F G	7,47
2,48	G	7,38
1, 120	H	6,68
3,96	I	6,32
2, 120	J	5,35
1,24	K	4,73
3,0	L	4,45
2,0	L	4,45
1,0	L	4,45
3, 120	M	4,07
2,24	N	3,35

Respuesta del Log 10 D*10 5 Crecimiento Refrigeración

Anexo 2: Concentración-Tiempo

t-student

Nivel		Cuadrado de las Mo
0,15,72	A	9.02
0,1,72	A	8.84
0.72	B	8.56
0,05,72	B C	8.41
0,1,48	C	8.35
0,05,48	C D	8.25
0,05,96	D	8.10
0.96	E	7.78
0.48	E	7.68
0,15,48	F	7.19
0,1,96	F	7.03
0,05,24	G	6.61
0.24	G	6.56
0,1,24	H	6.30
0,15,24	H	6.12
0,15,96	I	5.76
0.12	J	5.47
0	K	4.45
0,05,0	K	4.45
0,1,0	K	4.45
0,15,0	K	4.45
0,05,120	K	4.44
0,1,120	L	4.11
0,15,120	M	3.35

Respuesta del Log 10 D*10 5 Crecimiento en Ambiente

Anexo 3: Concentración-Tiempo

t-student

Nivel		Cuadrado de la Mo
0,96	A	10,14
0,72	B	9,14
0,05,96	C	8,73
0,15,72	C	8,71
0,05,72	C	8,69
0,05,48	D	8,40
0,15,96	D	8,38
0,15,48	D E	8,22
0,1,96	E	8,07
0,1,72	F	7,84
0,1,48	F	7,66
0,48	G	7,18
0,120	G	7,05
0,15,24	H	5,89
0,05,120	I	5,49
0,05,24	I J	5,34
0,24	I J	5,30
0,1,24	J	5,19
0,1,120	K	4,65
0,05,0	L	4,45
0,0	L	4,45
0,1,0	L	4,45
0,15,0	L	4,45
0,15,120	L	4,28

Respuesta del Log 10 D*10 5 Crecimiento Refrigeración

Anexo 4: Fracción-Tiempo t-student

Level		Cuadrado de las Mo
3.48	A	9.79
1.72	B	9.49
1.96	B	9.47
3.72	C	9.15
1.48	D	8.11
3.24	E	7.76
2.72	F	7.47
2.96	F	7.40
1.120	G	7.08
1.24	H	5.95
2.48	I	5.71
2.24	J	5.48
2.120	K	4.72
3.96	K	4.63
1, 0	L	4.45
2, 0	L	4.45
3, 0	L	4.45
3.120	M	1.24

Respuesta del Log 10 D*10 5 Crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Anexo 5: Concentración-Tiempo

Nivel		Cuadrado de las Mo
0.120	A	5.03
0.96	A	4.82
0.72	A B	4.69
0.48	A B	4.66
0.24	A B C	4.61
0	B C D	4.19
0,1,0	C D	4.19
0,15,0	C D	4.19
0,2,0	C D	4.19
0,15,24	D E	3.88
0,15,48	D E	3.87
0,1,72	E F	3.71
0,2,48	E F	3.60
0,2,24	F G	3.39
0,2,72	G H	3.15
0,1,48	G H	3.14
0,15,72	G H I	3.02
0,1,24	G H I	3.00
0,15,96	H I	2.84
0,1,96	I J	2.59
0,2,96	J K	2.28
0,15,120	K	2.15
0,1,120	L	0.73
0,2,120	L	0.45

Respuesta del Log 10 D*10 5 Crecimiento de *Escherichia coli*

Anexo 6: Concentración-Tiempo

Nivel		Cuadrado de las Mo
0.120	A	4.87
0.96	A B	4.76
0.72	B C	4.63
0,2,48	B C	4.61
0.48	B C	4.58
0.24	B C	4.55
0	C	4.54
0,1,0	C	4.54
0,15,0	C	4.54
0,2,0	C	4.53
0,1,48	D	3.32
0,2,72	D	3.30
0,1,24	D E	3.28
0,1,72	D E	3.27
0,15,48	E F	3.07
0,15,72	F G	3.04
0,15,96	G H	2.85
0,1,96	H	2.73
0,2,96	I	2.08
0,1,120	I	1.96
0,15,120	I	1.94
0,2,120	I	1.89
0,2,24	J	1.60
0,15,24	J	1.54

Respuesta del Log 10 D*10 5 Crecimiento de *Salmonella thipy*

Anexo 7: Concentración-Tiempo

Nivel		Cuadrado de las Mo
0.120	A	5.24
0.96	A	5.10
0.72	A B	4.89
0.48	B	4.71
0.24	B C	4.58
0,1,0	C D	4.29
0,15,0	C D	4.29
0,2,0	C D	4.29
0	D	4.29
0,1,24	E	3.15
0,1,48	F	2.15
0,15,24	G	1.54
0,2,24	G	1.51
0,2,120	H	0.39
0,15,48	I	0.00
0,2,48	I	0.00
0,2,96	I	0.00
0,2,72	I	0.00
0,1,72	I	0.00
0,1,96	I	0.00
0,15,96	I	0.00
0,1,120	I	0.00
0,15,72	I	0.00
0,15,120	I	0.00