
**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS



**APLICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri*
Shauer) EN LA CONSERVACIÓN DE CARNE DE RES**

TESIS POR:

Gabriela Morales Ángeles

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

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Septiembre 2005

AGRADECIMENTOS

A **Dios** por haberme dado la vida y con esta la oportunidad de culminar satisfactoriamente mi formación profesional y darme la fuerza para vencer los obstáculos que se interpusieron en mi camino.

A mi **Alma Mater** por brindarme su seno y ser mi hogar durante el tiempo de mi formación profesional, crear fuertes pilares en los que yace mi vida e inculcarme valores tan importantes como la amistad y el esfuerzo.

Al **Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECyT)** por el apoyo económico que me brindaron a través de su programa de becas tesis, ya que sin esta ayuda no se hubiera podido cumplir las expectativas esperadas en la realización de esta tesis.

Al **Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA)**, en especial M.C. Ramón Silva Vázquez por haber proporcionado el material de trabajo para la realización de este proyecto y ser guía para el correcto seguimiento de dicha investigación.

A todo el personal académico que por medio de sus enseñanzas a lo largo de la carrera lograron formarme como profesionista, en especial a los catedráticos del departamento de Nutrición y Alimentos: **M.C. Xochitl Ruelas, M.C. Oscar Noe Reboloso y Dra. Ma. De Lourdes Morales**, por haberme transmitido sus conocimientos para una mejor formación profesional y humana, especialmente agradezco a la **M.C. María Hernández González**, por haber dirigido este proyecto con el profesionalismo que la caracteriza, además de la amistad brindada en el transcurso de la carrera ya que ha sido una guía para alcanzar las metas propuestas y sin su ayuda no habría terminado esta etapa en mi vida.

A la Lic. Laura Olivia Lara y al QFB Carlos A. Sanmiguel por haber proporcionado el espacio para realización de esta investigación, así como sus conocimientos que sirvieron como apoyo para terminar apropiadamente la parte experimental de esta investigación y, por la amistad brindada.

A mis amigos de generación, por los lindos momentos que pasamos juntos y que sin esperar nada a cambio me brindaron su amistad incondicionalmente, especialmente agradezco a: Herberto González, Manuel tirado, Ana L. Salazar, Vanesa Jiménez, Dunia Ramírez, Daniel A. Ortiz, Mario A. Cruz, J. Manuel Ozuna, José Manuel, Mauro Vázquez, L. Armando Tonche, Andrés R. Ayala, y ha todas las personas que en transcurso de la carrera recibí su apoyo.

DEDICATORIAS

A mis padres, que gracias a su apoyo moral y económico hicieron que mi sueño también de ellos se volviera realidad al verme terminar mi carrera.

Ing. Mario Morales Mendoza

Ma. Concepción Ángeles Aviles

Y que con sus consejos y amor, a pesar de la lejanía, me ayudaron a salir adelante y enfrentar los retos que se cruzaban en el camino. Gracias por el esfuerzo realizado para poder darme la formación profesional que recibí.

A mis hermanos, que durante mi estancia en esta Institución siempre me mantuvieron animada para continuar cada día con este sueño.

Mario Morales Ángeles

Daniela Gpe. Morales Ángeles

Mónica I. Morales Ángeles

A pesar de la distancia, sin ustedes hubiera sido difícil poder continuar con mis estudios, sin embargo siempre nos mantuvimos unidos. Gracias hermanos por no haberme dejado sola en esta etapa de mi vida, mi sueño es su sueño.

A mi amor que cada día me alienta a enfrentarme a la vida sin temor alguno y gracias por la ayuda brindada para poder terminar este proyecto.

Obed García García

Y que con tu amor y comprensión siempre me animaste a echarle ganas a todo lo que hiciera, sin ti este proyecto no estaría bien terminado. Gracias además por tu amistad ya que has estado conmigo en todo momento, en las buenas y malas, sin un interés de por medio.....Te amo.

A mi gran amigo que siempre me brindo su amistad desinteresadamente y que juntos sorteamos muchos obstáculos pasándolos sin dificultad.

Ulises Uribia Salazar

Gracias por todos los momentos bonitos que vivimos juntos, por tus conejos que siempre me guiaron en el camino y por tu compañía en los malos momentos.....Te quiero amigo.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	iii
INDICE DE CUADROS	6
INDICE DE FIGURAS	7
I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	6
III. OBJETIVOS	9
IV. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	10
4.1 Conservadores	10
4.1.1 Antimicrobianos Sintéticos.....	11
4.1.2 Antimicrobianos Naturales.....	14
4.2 Orégano	16
4.2.1 Generalidades.....	16
4.2.2 Características Botánicas.....	17
4.2.3 Clasificación Taxonómica.....	18
4.2.4 Clima y Suelo.....	18
4.2.5 Usos y Composición Química.....	19
4.2.6 Método de Extracción.....	21
4.2.7 Actividad Biológica de los Compuestos	22
4.2.8 Importancia Económica del Orégano.....	23

4.3	Carne de res	24
4.3.1	Consumo de carne de res	24
4.3.2	Microbiología de carne de res	25
4.3.2.1	<i>Salmonella typhi</i>	26
4.3.2.2	<i>Escherichia coli</i>	27
4.3.2.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	28
4.3.2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	29
4.4	Factores que afectan el crecimiento de un microorganismo	30
4.4.1	PH	30
4.4.2	Temperatura	31
4.4.3	Potencial de oxido-reducción	32
4.4.4	Actividad de agua	32
4.4.5	Composición general del medio	33
V.	METODOLOGÍA	34
5.1	ETAPA 1: Evaluación de la actividad antimicrobiana en mesófilos aerobios	34
5.1.1	Obtención del aceite esencial de Orégano	34
5.1.2	Valoración de la actividad antimicrobiana	35
5.1.2.1	Preparación de las muestras de carne y conteo de mesófilos aerobios	35
5.2	ETAPA 2: Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a patógenos	35
5.2.1	Viabilización de cepas patógenas	35
5.2.2	Inoculación de la carne con <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ,	36
VI.	RESULTADOS	37
6.1	ETAPA 1 Evaluación de la actividad antimicrobiana	37
6.1.1	Determinación de la fracción timol carvacrol con mejor actividad antimicrobiana	37
6.1.2	Determinación de la concentración con mejor actividad antimicrobiana en carnes	41
6.2	ETAPA 2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a patógenos	42
6.2.1	<i>Salmonella typhi</i>	42
6.2.2	<i>Escherichia coli</i>	43
6.2.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	44
6.2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	45
VII.	DISCUSIONES	46

VIII.	CONCLUSIONES	48
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Clasificación de los aditivos alimentarios.....	10
2	Lista de conservadores aprobados por la UE.....	13
3	Sistemas antimicrobianos naturales de uso en los alimentos.....	14
4	Sustancias provenientes de plantas con actividad antimicrobiana.....	15
5	Taxonomía.....	18
6	Componentes químicos del orégano que determinan su calidad comercial. Análisis comparativo con dos especies extranjeras.....	21
7	Actividades biológicas del orégano.....	24
8	Factores que influyen en el crecimiento y toxigenesis de <i>S. aureus</i>	30
9	Concentraciones de timol-carvacrol en cada fracción.....	34
10	Medias de las UFC/ml bajo condiciones de refrigeración.....	37
11	Medias de las UFC/ ml bajo condiciones de ambiente.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	<i>Lippia berlandieri</i>	17
2	Estructura química de los principales componentes del orégano.....	20
3	Estructura química de los principales flavonoides en orégano.....	20
4	Cámara de arrastre por vapor.....	22
5	Tinción de gram de <i>Salmonella typhi</i>	26
6	Tinción de gram de <i>Escherichia coli</i>	27
7	Tinción de gram de <i>Listeria monocytogenes</i>	28
8	Tinción de gram <i>Staphylococcus aureus</i>	29
9	Grafica de crecimiento microbiano en cada fracción del aceite en condiciones refrigeración.....	38
10	Grafica de crecimiento microbiano en cada fracción del aceite en condiciones de ambiente.....	40
11	Grafica del crecimiento microbiano para cada concentración en condiciones de refrigeración.....	41
12	Grafica de crecimiento microbiano para cada concentración en condiciones de ambiente.....	42

13	Grafica de crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en función a la concentración F4.....	43
14	Grafica de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en función a la concentración F4.....	44
15	Grafica de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en función a la concentración F4.....	44
16	Grafica de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en función a la concentración F4.....	45

CAPITULO I

RESUMEN

La conservación de los alimentos en su sentido más amplio comprende el conjunto de todas las medidas para evitar su descomposición. En sentido más estricto se designa como conservación de alimentos a los procedimientos que se dirigen contra el ataque por los microorganismos.

El objetivo de este trabajo fue probar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano en carne de res tanto para mesófilos aerobios como para los principales patógenos encontrados en esta. La evaluación antimicrobiana se realizó mediante la aplicación de cinco fracciones cada una con diferentes proporciones timol-carvacrol, permaneciendo estas en condiciones de almacenamiento de refrigeración y temperatura ambiente, para el posterior conteo en placa con agar nutritivo en concentraciones de 0, 0.05, 0.10 y 0.15% monitoreadas a intervalos de 0, 24, 72 y 120 hrs, y sembradas por duplicado.

Una vez encontrada la mejor fracción con actividad antimicrobiana se prosiguió a viabilizar con caldos de preenriquecimiento según el microorganismo correspondiente. Los patógenos inoculados en la carne fueron: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*. La carne inoculada se almaceno en refrigeración para su monitoreo a intervalos de 0, 24, 72 y 120 sembrada así en agares selectivos para su posterior conteo.

Una vez obtenidos los resultados se prosiguió al análisis estadístico de los datos mediante un análisis de varianza ($p \leq 0.5$) los factores estudiados fueron concentración,

tiempo, fracción y UFC/ml, para conocer la actividad antimicrobiana de cada fracción, obteniendo así como las mejores fracciones 4 y 5 además la concentración de aceite que mejores resultados arrojó fue la de 0.15%.

CAPITULO II

INTRODUCCIÓN

La conservación de los alimentos se ha practicado a lo largo de la historia del hombre, actualmente no ha sido fácil mantener los alimentos con las características organolépticas y nutritivas originales. La conservación de los productos alimenticios ha permitido al hombre disponer de alimentos desde una cosecha hasta la siguiente, y es por eso que, la función principal de la conservación es retrasar el deterioro de los alimentos y prevenir alteraciones de su sabor o, en algunos casos, de su aspecto (Branen, 1993).

En la actualidad, la sociedad de consumo, incita a consumir cada vez más productos manufacturados que, aunque dejan mucho que desear en cuanto a valor nutritivo y características originales, garantizan el aspecto y facilitan la preparación, conservación, almacenamiento o el transporte de tales productos, enmascarando también la falta de algún ingrediente o su baja calidad: colorantes para dar incluso al producto un color mejor que el original, emulsionantes, estabilizantes y espesantes para mantener la textura, antioxidantes para evitar la oxidación o cambio de color, saborizantes, para mejorar el sabor de algo insípido y desagradable, y conservadores con el fin de retrasar su descomposición.

El uso de estos aditivos ha permitido a la industria satisfacer la demanda de los consumidores. El empleo descontrolado de aditivos en alimentos puede causar problemas para la salud humana, aunque también es cierto que sin éstos, la mayoría de los productos que se consumen no existirían sin el empleo de estos compuestos. Se consumen unas dos

terceras partes de alimentos procesados, y los aditivos son fundamentales en su elaboración.

Los organismos oficiales correspondientes, a la hora de autorizar el uso de un determinado aditivo tienen en cuenta que éste sea un auxiliar del proceso correcto de los alimentos y no un agente para enmascarar unas condiciones de manipulación sanitaria y tecnológica deficientes, ni un sistema para defraudar al consumidor engañándole respecto a la frescura real de un alimento (Furia, 1975).

Las causas principales de la descomposición de los alimentos son el crecimiento de microorganismos, la acción de las enzimas que se encuentren por naturaleza en los mismos, las reacciones químicas y la degradación física. La causa más importante de descomposición es por microorganismos ya que estos además de provocar deterioro en el alimento, puede causar infecciones e intoxicaciones en el humano.

La descomposición de un alimento específico, generalmente va asociada con ciertos tipos de alimentos y microorganismos. Algunos otros de los factores que controlan el tipo y grado de descomposición microbiana son el contenido de humedad, la temperatura, la concentración de oxígeno y los nutrientes disponibles.

La desecación, la fermentación, el empleo de azúcar o sal y el ahumado por citar algunas, son técnicas tradicionales de conservación que hoy día todavía se utilizan. La tarea de la industria alimentaria se ve enfocada a generar aditivos que cumplan con las condiciones de seguridad e higiene para el consumidor además de mantener las tendencias actuales de producir alimentos de alta calidad, con características propias de frescura y mínimo procesamiento (Gould, 1996).

Entre los conservadores más polémicos, en tanto a carnes se refiere destacan las sales de nitrato y nitrito, ya que en alimentos sometidos a asado se pueden formar unos compuestos cancerígenos denominados “nitrosaminas” y, no se autoriza su uso en la carne picada, ya que mantienen la apariencia de frescura. En muchos alimentos existen de forma natural sustancias con actividad antimicrobiana: el ácido benzoico y el ácido cítrico de ciertas frutas o el ácido láctico liberado en la fabricación de leches fermentadas. Los ajos, cebollas y muchas especias también contienen agentes antimicrobianos, o precursores que se transforman en ellos al triturarlos.

En la actualidad estas sustancias fitoquímicas están en estudio en los laboratorios de investigación de la industria farmacéutica y alimentaria. Entre las plantas que destacan por sus propiedades antimicrobianas son el clavo, la cebolla, la mostaza, el ajo, el cilantro, la vainilla y el orégano (Campomanes, 2003). Estas plantas contienen además compuestos fenólicos los cuales son inhibidores de bacterias virus y parásitos, y se encuentran en la parte oleaginosa de la planta por lo que es necesario extraer su aceite esencial.

Estas plantas contienen sustancias llamadas fitoquímicos mismas que les ayudan tanto en etapas de crecimiento o reproducción, como en la de defensa del medio ambiente (Campos, 2004). Es por esta razón que esta investigación se ha enfocado a dichas sustancias bioactivas específicamente al orégano, ya que es una planta con mínimos requerimientos para establecer el cultivo y además rica en estos compuestos, debido a ello esta investigación está inspirada en la probada capacidad del aceite de orégano de inhibir a ciertos microorganismos corruptores de alimentos, como una alternativa para alargar la vida de productos como la carne, a partir de sustancias de origen natural ampliamente aceptadas por el público consumidor debido a sus bondades

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

Objetivo General:

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

Objetivos específicos:

- 1 Valorar la actividad antimicrobiana de las cinco fracciones timol-carvacrol obtenidas a partir de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) en carne fresca variando dosis y condiciones de almacenamiento.
- 2 Determinación de la concentración óptima de la fracción timol-carvacrol para la conservación de carne de res
- 3 Evaluar la efectividad antimicrobiana de la fracción timol-carvacrol en

carnes inoculadas con los principales agentes patógenos: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO IV

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La mayoría de los consumidores actuales están convencidos de que los mejores y más sanos alimentos son, después de los frescos, los mínimamente procesados que no tienen conservadores, colorantes u otras sustancias dañinas a la salud. Por esto, la industria alimentaria se da a la labor de orientar esfuerzos para cubrir estas demandas investigando nuevas formas de conservación, y estudiando el efecto de diversos factores y formas tradicionales de conservación de alimentos para que sean estables y duraderos (Alzamora et al., 1995; Welte et al., 1997).

4.1 CONSERVADORES.

Los agentes conservadores son sustancias que, por separado o mezcladas entre sí, son capaces de inhibir, retardar o detener los procesos de fermentación, enmohecimiento, putrefacción y otras alteraciones biológicas de los alimentos y bebidas (Gould, 1989).

La aplicación de estos aditivos es un procedimiento de conservación que en nuestra época presenta muchas ventajas. Por una parte responden, a la necesidad de reducir ciertos tratamientos térmicos, permiten igualmente conservar a temperatura menos baja ciertos productos y por otra parte permiten alargar el tiempo de conservación al estado fresco, que responde a una fuerte demanda del consumidor .

A pesar de todas estas ventajas, es un procedimiento rechazado por los consumidores que temen los efectos tóxicos insidiosos de las sustancias químicas. Pero en la actualidad los progresos científicos permiten colocarnos en un punto que satisfaga el aspecto sintético extrayendo así conservadores de origen natural (Multon, 2000).

Atendiendo al origen podemos clasificar los conservadores alimentarios en cuatro grupos principales: naturales, idénticos a naturales, modificados y artificiales (Tabla 1).

Tabla 1.- Clasificación de los aditivos alimentarios

Clase de Aditivo	Características	Ejemplos
Naturales	De origen animal o vegetal, obtenidos mediante procedimientos físicos, enzimáticos o microbiológicos.	Extractos ricos en carvacrol con función antimicrobiana, obtenidos a partir de aceites esenciales vegetales.
Idénticos a naturales	Reproducción por síntesis química o biológica a nivel laboratorio a efectos económicos.	Colorantes tipo carotenoides presentes de forma natural en vegetales, huevos, plumas, etc.
Modificados	Compuestos de origen natural levemente modificados en su composición o estructura, para hacerlos utilizables en la industria alimentaria.	Almidones modificados Celulosas modificadas (Metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etc)
Artificiales	Compuestos no presentes en la naturaleza, sintetizados a nivel laboratorio.	Nitratos y nitritos Sulfito sódico Bifenilo

Lück, 1981

4.1.1 Antimicrobianos Sintéticos

La adición de agentes químicos con actividad antimicrobiana es una de las técnicas más utilizadas para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables. Muchas veces estos son utilizados con una finalidad económica: un producto que resulte más atractivo para el consumidor y que se mantenga por mucho más tiempo, siempre será más

económicamente rentable para la empresa que lo comercializa. Al mismo tiempo existen sustancias de origen natural cuya actividad es idéntica a los conservadores artificiales y que ignoramos (Welti-Chanes et al, 1997).

Desde hace unos 100 años aumentaron los esfuerzos para no conservar los alimentos de cualquier manera, sino de conservar también sus características, así como sus propiedades alimenticias y gustativas.

Sin embargo la utilización de estos agentes sintéticos ha causado polémica ya que se han señalado innumerables peligros y efectos nocivos que genera su ingestión. Se admite que algunos aditivos provocan alergias, también es cierto que algunos no deben ser ingeridos por personas con ciertas alteraciones orgánicas o con intolerancias de origen alimentario (Lück, 1981).

El caso de la resistencia a los antimicrobianos es un problema que crece día a día para transformarse en una preocupación grave para la salud pública, con consecuencias. Debido a que los gérmenes patógenos desarrollan resistencia a los antimicrobianos; este proceso es un fenómeno natural, exacerbado por el abuso y mal uso de aditivos alimentarios.

El desafío actual de la industria alimentaria consiste en lograr que sea más lento el ritmo de difusión de la resistencia, utilizando así sustancias de diferente composición química y actividad antimicrobiana, además de que ésta sea de origen natural, ya que los consumidores asocian a los alimentos sanos y seguros con alimentos mínimamente procesados y sin conservadores artificiales (Welti-Chanes et al, 1997).

En la actualidad existe una creciente preocupación del consumidor por la salud y el cuidado del cuerpo; la consecuencia es que pese a los indudables avances tecnológicos producidos en la industria alimentaria y a pesar de que el consumidor comprueba día a día que la variedad y calidad de los alimentos que consume aumenta, éste es cada vez más crítico con la composición de los alimentos.

Los aditivos químicos están presentes en más de las dos terceras partes de los alimentos que consumimos por lo que se ha vuelto en un negocio rentable tanto para el fabricante de éstos como para la empresa alimentaria. El desarrollo de la industria química y la expansión del mercado de alimentos manufacturados ha propiciado que, en la actualidad, sean más de 2.500 las sustancias que se añaden a los alimentos, en su mayoría

artificiales, lo que supone un volumen de negocios de primer orden. Ya en 1980, el mercado de los aditivos en Estados Unidos superaba los 1.000 millones de dólares (Anónimo 1, 2004).

La producción de antimicrobianos genera una fuente de ingresos económicos importante a nivel mundial. Tan solo en los E.U. en 1991 se consumieron 37.5 millones de kilogramos de conservadores, y esta cifra ha aumentado año con año desde entonces. Se estima que a nivel mundial, el consumo de antimicrobianos aumenta 4.1 % anualmente, siendo los más utilizados los sorbatos, los propionatos y los benzoatos (Campomanes, 2003).

Todos los aditivos alimentarios deben tener un propósito útil demostrado y han de someterse a una valoración científica rigurosa y completa para garantizar su seguridad, antes de que se autorice su uso. Previo establecimiento de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (AESA), la evaluación de la seguridad de los aditivos en Europa actualmente, esta a cargo del Panel científico de la AESA sobre aditivos.

Los organismos oficiales correspondientes, a la hora de autorizar el uso de determinado conservador tienen en cuenta que éste sea un auxiliar del procesado correcto de los alimentos y no un agente para enmascarar unas condiciones de manipulación sanitaria o tecnológicamente deficientes, ni un sistema para defraudar al consumidor engañándole respecto a la frescura real de un alimento.

Las condiciones de uso de los conservadores están reglamentadas estrictamente en todos los países del mundo. Usualmente existen límites a la cantidad que se puede añadir de un conservante y a la de aditivos totales. En la siguiente tabla se muestra la lista de aditivos aprobada por la Unión Europea (Tabla 2), (Anónimo 2, 2005).

Tabla 2. – Lista de conservadores aprobados por la UE

CONSERVADORES		
E 200 Ácido sórbico	E 221 Sulfito sódico	E 252 Nitrato potásico
E 201 Sorbato sódico	E 222 Sulfito ácido de sodio	E 260 Ácido acético
E 202 Sorbato potásico	E 223 Metabisulfito sódico	E 261 Acetato potásico
E 203 Sorbato cálcico	E 224 Metabisulfito potásico	E 262 i Acetato sódico
E 210 Ácido benzoico	E 226 Sulfito cálcico	E 262 ii Diacetato sódico
E 211 Benzoato sódico	E 227 Sulfito ácido de calcio	E 263 Acetato cálcico
E 212 Benzoato potásico	E 228 Sulfito ácido de potasio	E 270 Ácido láctico
E 213 Benzoato cálcico		E 280 Ácido propiónico

E 214 Etil parahidroxibenzoato sódico	E 230 Bifenilo	E 281 Propionato sódico
E 215 Etil parahidroxibenzoato sódico	E 231 Ortofenilfenol	E 282 Propionato cálcico
E 216 Propil parahidroxibenzoato	E 232 Ortofenilfenato sódico	E 283 Propionato potasico
E 217 Propil parahidroxibenzoato sódico	E 233 Tiabenzol	E 284 Ácido bórico
E 218 Metil parahidroxibenzoato	E 234 Nisina	E 285 Tetraborato sódico
E 219 Metil parahidroxibenzoato sódico	E 235 Natamicina	E 290 Anhídrido carbónico
E 220 Anhídrido sulfuroso	E 239 Hexameten tetramina	E 296 Ácido málico
	E 240 Formaldehido	E 297 Ácido fumárico
	E 242 Dimetil dicarbonato	E-249 Nitrito potásico
	E 249 Nitrito potásico	E-250 Nitrito sódico
	E 250 Nitrito sódico	E-251 Nitrato sódico
	E 251 Nitrato sódico	E-252 Nitrato potásico

Anónimo 2, 2005

4.1.2 Antimicrobianos Naturales

Muchos de los compuestos producidos por síntesis y utilizados actualmente como antimicrobianos están también presentes como antimicrobianos naturales en ciertos alimentos, plantas y animales, o producidos por microorganismos (Tabla 3).

Los alimentos además de aportar nutrientes, contienen una serie de sustancias no nutritivas que intervienen en el metabolismo secundario de los vegetales: sustancias colorantes (pigmentos), aromáticas, reguladoras del crecimiento, protectores naturales frente a parásitos y otros, que no tienen una función nutricional clásica definida. (Board y Gould, 1991).

Tabla 3 Sistemas antimicrobianos naturales de uso en alimentos

Fuente	Sistema	Aplicaciones
Microbiana	Bacteriocinas	Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> y de patógenos en alimentos en general
	Ácidos orgánicos	Inhibición de mohos y levaduras.
	Antibióticos	Diversos efectos dependiendo del tipo de antibiótico y tipo de microorganismo.
Animal	Lisozima	Inhibición de bacterias en queso.
	Lactoferrina	Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> en leche.

Lactoperoxidasa		Preservación de leche sin procesar.
		Preservación de queso cottage.
		Inhibición de <i>Salmonella</i> en formulas lácteas infantiles.
		Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> in vitro y quesos frescos.
		Inhibición de <i>Campylobacter</i> in vitro.
Vegetales	Aceites esenciales	Estudios de actividad.
	Puré de plátano	Inhibición de bacterias formadoras de esporas.
	Extracto de ajo	Inhibición de <i>Candida albicans</i> .
	Aceitunas	Inhibición de la germinación de esporas de <i>Bacillus cereus</i>

Board y Gould, (1991)

Se sabe que las sustancias activas provenientes de plantas con actividad antimicrobiana son compuestos fenólicos de sus aceites esenciales (Tabla 4) siendo los mas importantes el carvacrol, el timol, el eugenol y el metil chavicol (Katayama y Nagai, 1960).

Los aceites esenciales son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa encontradas prácticamente en todos los vegetales; son muy numerosos y están ampliamente distribuidos en distintas partes del mismo vegetal en las raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Estos aceites esenciales son componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles lactonas; todos ellos fácilmente separables ya sea por métodos químicos o físicos, con la destilación, refrigeración, centrifugación, etc. El uso de los aceites esenciales de condimentos y especias tanto en la industria de alimentos como en la industria farmacéutica es cada vez más generalizado, debido a que producen compuestos antimicrobianos entre los que destacan el clavo, la cebolla, el ajo, el cilantro, el orégano, la mostaza, la vainilla y la canela (Wilkins y Board, 1989).

De interés es el orégano ya en estudios anteriores se ha demostrado que su aceite esencial presenta altas concentraciones de timol (entre 0.7 - 40.2 %) y carvacrol (entre 15.2 – 41.2 %). El campo de acción de los aceites esenciales es sumamente extenso pues son, según su composición química: antifecciosos, antibacteriales, antivirales, antimicóticos, antiparasitarios, antisépticos, antiinflamatorios, anticoagulantes, antialérgicos, neurotónicos, endocrinorreguladores, inmunoestimulantes, etc. (Silva, 2003).

Tabla 4.- 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-cimenol	Isopropil-tolueno	Tomillo
Cíñelo	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-hidroxil, 1,6-octaideno	Limón, Albahaca
Linatol	3,7-dimetil-3-hidroxil, 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

Santiesteban, 2002

4.2 Orégano.

4.2.1 Generalidades.

Con el nombre de orégano se conocen en la República Mexicana aproximadamente 40 especies de plantas herbáceas pertenecientes a cuatro familias botánicas. La característica que distingue a la mayoría de estas especies es su extraordinario poder saborizante, fácil de percibir cuando se añaden sus hojas frescas o secas, o sus extractos y concentrados acuosos, a un sinnúmero de productos alimenticios frescos, procesados y

envasados. El aroma y sabor que los diversos tipos de orégano proporcionan a los alimentos los hacen agradables al olfato y al paladar y favorecen su digestión. Se trata de 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.

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

Sin embargo, en un estudio comparativo entre el orégano proveniente de Grecia y de Turquía con el orégano mexicano (referido a las especies *Lippia graveolens* H.B.K y *Lippia berlandieri* Schauer), se pudo comprobar que la calidad del orégano mexicano es superior, referido a la composición química de sus aceites esenciales (Fig 1) (Huerta, 2005).



Fig 1.- *Lippia berlandieri*

4.2.2 Características Botánicas.

Las plantas de las diferentes familias de orégano mexicano se encuentran en estado silvestre, en regiones áridas y semiáridas de, al menos, 24 estados de la república. Sus principales habitats 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.

En México existen: seis especies de la familia *Labiatae*, tres especies de la familia de *Verbenaceae*, una especie de la familia *Compositae*, una especie de la familia *Leguminosae* (Silva, 2003).

La mayor producción de orégano para fines comerciales es la del género *Lippia*, cuyas especies más abundantes en México son *Lippia berlandieri* Schauer y *Lippia graveolens* H.B.K. Esta producción se concentra en los estados de Coahuila, Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas. Estos oréganos comerciales son arbustos que alcanzan hasta 2.5 m de alto y desarrollan en promedio 1.20 m de follaje. La planta tiene sus tallos ramificados con gran cantidad de hojas, que constituyen la parte aprovechable. Esas hojas, de 1 a 3 cm de largo y 0.5 a 1.5 cm. de ancho son opuestas, alternas y de forma ovalada con bordes dentados y tienen una textura rugosa y con ligeras vellosidades. Las flores son pequeñas, de color blanco y forman inflorescencias en racimos; los frutos son pequeñas cápsulas que contienen las semillas de color café, no mayores de 0.25 mm. Florece en verano, de julio a octubre, y su fruto es un tetraqueno con cada parte ovoidea y lisa, es seco y globoso (Huerta, 2005).

4.2.3 Clasificación taxonómica.

De acuerdo a las características morfológicas, al orégano establecido en el sur de Chihuahua le corresponde la siguiente clasificación (Tabla 5):

Tabla 5 Taxonomía del orégano mexicano

Reino	Vegetal
Categoría	<i>Metaphyta</i>
División	<i>Tracheopyta</i>
Subdivisión	<i>Pteropsida</i>
Superclase	<i>Spermathopyta</i>
Clase	<i>Angiospermas</i>
Subclase	<i>Dicotyledoneae</i>
Serie	<i>Gamopetalas</i>
Orden	<i>Lamiales</i>

Familia	<i>Verbenaceae</i>
Género	<i>Lippia</i>
Especie	<i>berlandieri</i>

Silva, 2003

4.2.4 Clima y suelo.

El cultivo del orégano tiene éxito en todos los tipos de terreno ricos en materia orgánica, sueltos, silíceos arcillosos, francos, humíferos, calcáreos, 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).

4.2.5 Usos y composición química del orégano.

El orégano (*L. 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, antidiarréico, tratamiento de infecciones cutáneas, antifúngico, tratamiento de desórdenes hepáticos, diurético, antihipertensivo, remedio de desórdenes menstruales, antimicrobiano, repelente, antimalaria, antiespasmódico, tratamiento 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 apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano (Justesen, 2001). Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen

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

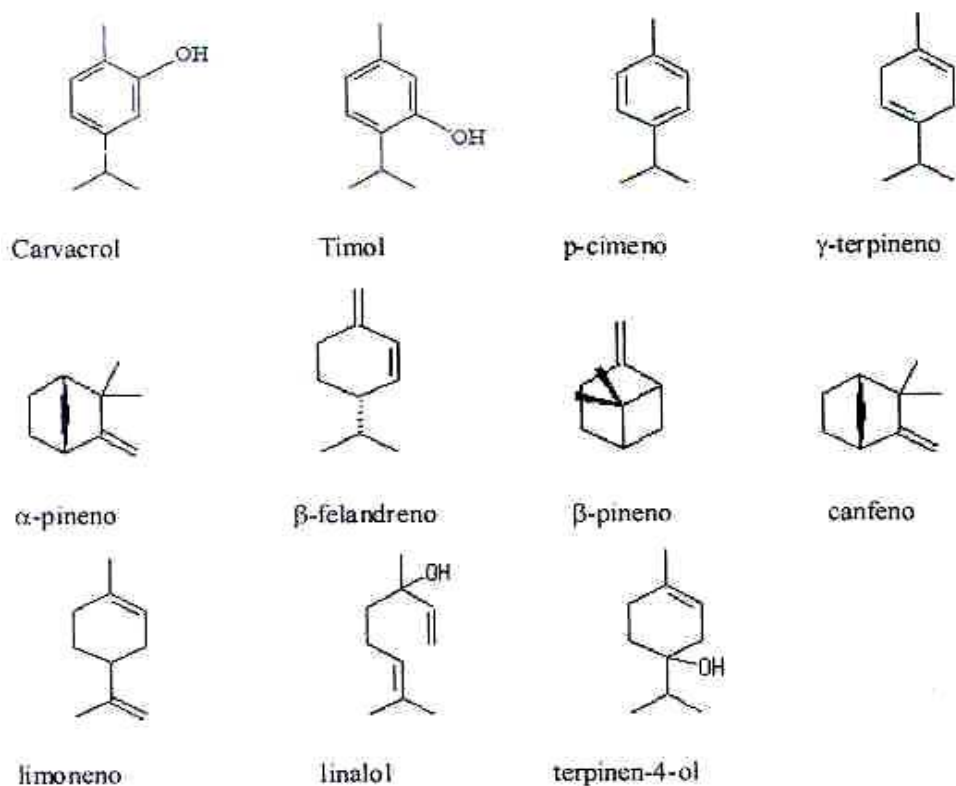


Fig. 2.- Estructura química de los principales componentes en orégano

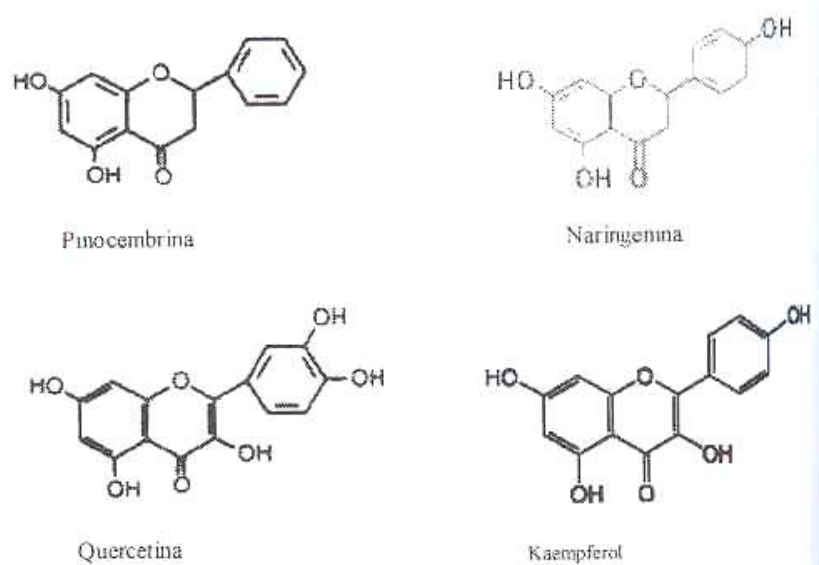


Fig. 3.- Estructura química de los principios flavonoides en orégano

Tabla 6.- 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. gracile</i>
Aceite esencial	6.4%	1.5%	1.5%
Timol	10.4%	23.9%	15.1%
Carvacrol	43.7%	12.2%	9.9%
p-cimeno	6.4%	15.9%	8.1%

Huerta, 2005

4.2.6 Método de extracción.

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas por lo que un metabolismo más activo puede asociarse con una mayor producción de aceites (Wilkins, 1998). En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes se derivan del ácido mevalónico

y se les clasifica en monoterpenoides y sesquiterpenoides. 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 utilizados para la extracción de aceites esenciales son la destilación con arrastre de vapor (Fig 4) 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.* 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).



Fig 4 Cámara de arrastre por vapor

4.2.7 Actividad biológica de los componentes del orégano.

En la tabla 7 se menciona que una de las principales actividades biológicas del orégano es su capacidad antioxidante, especialmente en especies del género *Origanum* y *Lippia*. 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. 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 . (Anónimo 3 , 2004)

Tabla 7. -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>

Huerta, 2005

4.2.8 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. (Martínez-Salvador, 1997)

De las casi 4 000 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 ínfimos.

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 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 a 500 dls por litro, debido a esto la comercialización de éste se convierte en un negocio rentable, siendo los principales compradores Estados Unidos, Francia, Italia y España, además de ser utilizado como antimicrobiano en la conservación de alimentos también se utiliza en licorería, perfumería, antirreumático, pomadas contra la dermatitis, etc. (Silva, 2003).

Como se ha dicho anteriormente la conservación de los alimentos se ha citado desde tiempos remotos convirtiendo esta actividad en una necesidad, además de convertirse en un negocio con ganancias atractivas, ya que el abastecimiento de los alimentos se ve afectado por el crecimiento de la población mundial. Así podemos hacer que los alimentos básicos

en la dieta puedan traspasar fronteras sin el temor de que éstos llegarán en mal estado ya que la alimentación constituye uno de los factores para mantener una buena salud, para lograr este objetivo nuestra dieta debe contener una serie de nutrientes que encontramos en diversos alimentos (Desroisier, 1987).

4.3 Carne de Res.

4.3.1 Consumo de la carne de res.

México cuenta con un alto índice de crecimiento en población. El 50% de la población es menor a los 20 años, mientras que el 68% es menor a los 30. Además, la población está cambiando su base alimenticia basada básicamente por granos a una basada en carne.

En términos de número de productores y procesadores, la industria de la carne en México es la tercera más importante después de la industria de lácteos y la de pan, dentro del sector de la comida procesada. Para el período entre 1988-1993, la industria logró un crecimiento anual del 29% (uno de los más grandes crecimientos en el sector de comida procesada). Entre los años 1990 y 1996 la producción de res aumentó a una tasa promedio anual de 4.9%, mientras que la producción de puerco y pollo incrementó en un 2.8% y 9.5% respectivamente.

El consumo de la carne en México durante 1997 alcanzó los 3.78 millones de toneladas métricas, de las cuales 35% fueron res, 25% pollo, 25% puerco y el restante 2% correspondió a cabrito y cordero (Conagro, 2005).

4.3.2 Microbiología de la carne de res.

La carne roja es un alimento esencial para el ser humano. Los nutricionistas recomiendan en las dietas por su alto valor proteico ya que es un alimento básico durante la infancia, la juventud y los primeros años de la adultez.

La carne comestible de los animales comprende principalmente los tejidos musculares pero también incluyen órganos tales como el corazón; el hígado y los riñones. Su elevada actividad de agua y sus abundantes nutrientes hacen de la carne un medio excelente para mantener el crecimiento microbiano. En un músculo típico de mamífero el

pH descenderá desde su valor inicial alrededor de 7 hasta 5.4 -5.5. El pH más elevado también significará que el crecimiento microbiano es más rápido (Adams y Moss; 1997).

Los microorganismos psicrotrofos constituyen solo un porcentaje de la microflora inicial pero posteriormente llegan a predominar a medida que la carne es mantenida constantemente a temperaturas de refrigeración.

El almacenamiento en anaerobiosis de las carnes rojas refrigeradas, bien envueltas con películas permeables al oxígeno, origina un elevado potencial redox en la superficie de la carne apropiado para el crecimiento de aerobios psicrotrofos. Los bacilos Gram-negativos no fermentadores crecen más rápidamente en estas condiciones. El primer indicio de alteración en la carne fresca es la producción de olores desagradables que son perceptibles cuando los microorganismos existentes en la carne alcanza una cifra de 10^7 ufc cm^{-2} . En las últimas fases de alteración se observa un aumento de pH y son elaborados amoníaco y varias aminas. Cuando el número de microorganismos alcanza niveles de 10^8 ufc cm^{-2} , en la carne aparece otro indicio de alteración en forma de un evidente mucílago superficial (Mossel, 1985).

Debido a la variedad de fuentes de contaminación, los tipos de microorganismos que suelen encontrarse son muchos entre ellos los patógenos entre los que destacan *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *Staphylococcus* por lo que la industria alimentaria está enfocada a prevenir este problema de contaminación, sin ocultar malas prácticas de manufactura (Jay, 1973).

4.3.2.1 *Salmonella typhi*.

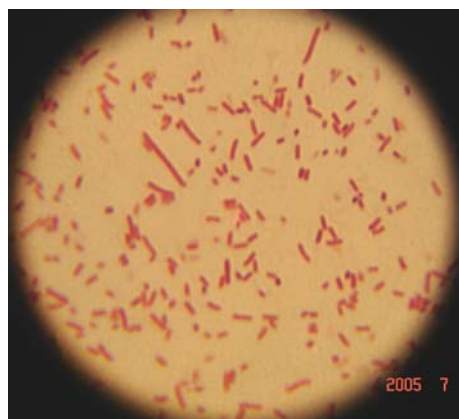


Fig. 5 Tinción de gram de *S. typhi*

Salmonella es un género de la familia Enterobacteriaceae. Los representantes de la familia se caracterizan como bacteria gram-negativas (Fig 5), anaerobias facultativas, asporógenas, de forma bacilar. Las formas móviles poseen flagelos peritricos. Producen ácido, y a veces gas de la glucosa, suelen ser catalasa-positivas y oxidasa negativas y reducen los nitrato a nitritos. La mayoría de los representantes de la familia se encuentran en el tracto intestinal del hombre y de los animales bien como patógeno, bien como comensales (ICMSF, 1997).

La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 35° C y 37° C, sin embargo la *Salmonella* pueden multiplicarse desde 5 a 45/ 47 ° C, aunque a temperaturas inferiores a 10° C el crecimiento sufre un retraso considerable. Las temperaturas de refrigeración permiten la supervivencia de *Salmonella*, en tanto que la congelación provoca un descenso considerable.

Soporta un rango de pH entre 4.5 y 9 con un óptimo de 6.5 a 7.5, se desarrollan bien a valores de a_w de 0.945 a 0.999. A valores muy bajos (del orden 0.20) correspondientes a productos deshidratados sobreviven largo tiempo y las variaciones en el potencial oxido-reducción no les afecta (Bourgeois y Mescle; 1995).

4.3.2.2 *Escherichia coli*.

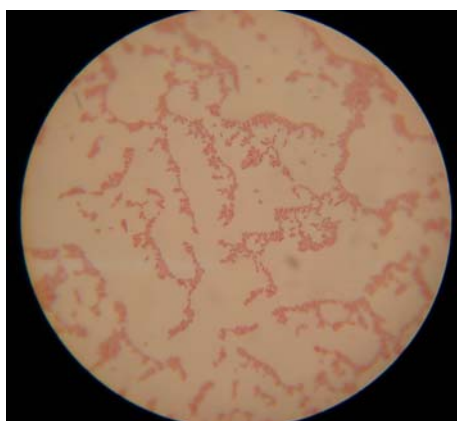


Fig. 6 Tinción de gram de *E. coli*.

Las bacterias de la especie *E. coli* son representantes de la familia Enterobacteriaceae. Como tales, los organismos son bacilos cortos Gram-negativos (Fig. 6),

no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, catalasa-positivos, oxidasa-negativos, anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anaerogenos. Típicamente la especie es rojo metilo positivo y Vogues-Prokrauer negativa y no crece en el medio citrato de Simmos, produciendo indol la mayoría de las cepas (ICMSF, 2000).

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales.

Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se les considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el agua, aire y alimentos, junto con otros similares agrupados debajo la denominación de “bacterias coliformes” (ICMSF, 1997).

Las infecciones entéricas no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas las cuales son: *E. coli* enteropatógeno, *E. coli* enterotoxigénico, *E. coli* enteroinvasor y *E. coli* enterohemorrágico (O157:H7).

E. coli es un organismo mesófilo típico que crece a temperaturas desde 7-10° C hasta 50° C, con una temperatura optima de 37 °C, aunque a habido referencias de algunas cepas ETEC que crecieron a temperaturas tan bajas como es la de 4° C y es capaz de resistir el almacenamiento en refrigeración o congelación durante tiempos prolongados. Un pH casi neutro es óptimo para su crecimiento aunque puede crecer a pH inferiores a 4.4 siendo por otra parte óptimas las demás condiciones de crecimiento. Su a_w mínima de crecimiento es 0.95 (Adams y Moss; 1997).

4.3.2.3 *Listeria monocytogenes*.

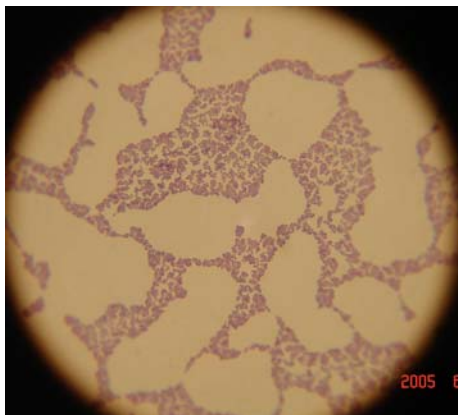


Fig. 7 Tinción de gram de *L. monocytogenes*,.

Las listerias son bacilos cortos, Gram-positivos (Fig 7), asporógenos, oxidasa negativas catalasa positivos y anaerobios facultativos. Accidentalmente originan formas cocoides o células aisladas de 10 μm de longitud. Son móviles a 25 °C, mostrando una característica movilidad de volteo, pero no son móviles a 35 °C. Las colonias tiene un aspecto característico gris-azulado, que cambia a azul-verde cuando se observa con luz oblicua (ICMSF, 1997).

Listeria monocytogenes es una bacteria aero-anaerobia que se desarrolla mejor en presencia de una tensión reducida de oxígeno. Su pH óptimo de crecimiento está próximo a la neutralidad (7.2-7.6). El pH limite está alrededor de 5.6. a pHs ácidos, *L. monocytogenes* es bastante resistente. En cuanto a las temperaturas, esta bacteria puede proliferar entre 3-45°C (temperatura optima 30-37 °C). A 4° C se multiplica mejor que otras bacterias y los cultivos permanecen viables por varios años a esta temperatura (Bourgeois y Mescle; 1995).

4.3.2.4 *Staphylococcus aureus*.

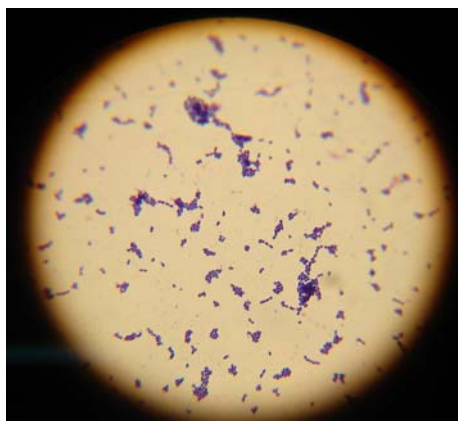


Fig. 8 Tinción de gram de *S. aureus*,

Los integrantes del género *Staphylococcus*, son cocos gram-positivos (Fig. 8), de 0.5-1.5 μm de diámetro, catalasa positivos, que se encuentran microscópicamente aislados, en pares, tétradas o formando racimos irregulares (término derivado del griego *staphylé*: racimo de uvas). Son inmóviles, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas,

generalmente no capsulados o con limitada formación de cápsula (ICMSF, 1997).

Staphylococcus aureus, especie coagulasa positiva, es un reconocido patógeno humano, siendo agente etiológico de un amplio espectro de infecciones de origen comunitario y nosocomial.

Staphylococcus aureus se multiplica más fácilmente en aerobiosis que en anaerobiosis. Necesita aminoácidos y vitaminas. Es mesófilo. Tolerancia concentraciones elevadas de NaCl y a_w baja (Tabla 8). Sobrevive durante bastante tiempo en alimentos deshidratados o congelados (Bourgeois y Mescle; 1995).

Tabla 8. Factores que influyen en el crecimiento y toxicogénesis de *S. aureus*

Factor	Crecimiento	Producción enterotoxinas
Temperatura rango	6-46° C	10-45° C
Temperatura óptima	37 ° C	40 °C
pH rango	4-9.8	5-8
pH óptimo	6-7	6.5-7 estable
NaCl	0-20 %	0-10 %
NaCl óptimo	0%	0%
a_w	0.83- >0.99	0.86 ->0.99
a_w óptimo	>0.99	>0.99

Bourgeois y Mescle, 1995

4.4 Factores que afectan el crecimiento de un microorganismo.

4.4.1 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 porque 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 a 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 de mantenimiento y, a una velocidad variable según las especies, se produce la muerte celular.

Dentro de las bacterias patógenas, los microorganismos de los generos *Vibrio* y *Clostridium* son mas sensibles a las variaciones de pH que la mayor parte de las demás bacterias, mientras que *E. coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus* son mas resistentes (Adams y Moss; 1997).

4.4.2 Temperatura.

Este es uno de los valores mas importantes que actúan sobre el crecimiento de los microorganismos y que tiene una 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:

➤ *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 se multiplican a temperaturas entre 20 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 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, suelo (Adams y Moss; 1997).

4.4.3 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:

- Los anaerobios 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 cadena respiratoria, las enzimas necesarias para la fermentación y son catalasa positivos.

- Los anaerobios estrictos y los microerofilos poseen obligatoriamente un metabolismo fermentativo, son catalasa negativos e inactivados de forma variable por la presencia de oxígeno (Adams y Moss; 1997).

4.4.4 Actividad de Agua.

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) las alteraciones microbianas más frecuentes son producidas por mohos. Las bacterias se ven inhibidas a estos valores.

Toda disminución de la a_w 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 a_w baja a 0.90 (ICMSF, 2000).

4.4.5 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 medida su potencial de oxidoreducción. 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, por lo menos en parte, de la riqueza de los factores de crecimiento indispensable (Jay, 1973).

CAPÍTULO V

METODOLOGÍA

El trabajo consta de dos etapas las cuales se describen a continuación con el fin de establecer las condiciones de la experimentación.

5.1 ETAPA 1. Evaluación de la actividad antimicrobiana en mesófilos aerobios.

5.1.1 Obtención del aceite esencial de orégano.

El aceite esencial de orégano consta de cinco fracciones, extraídas mediante el método de arrastre por vapor, consistente en exponer el producto a un flujo de vapor de agua que extrae los compuestos de interés. Obteniendo así, cinco fracciones, como anteriormente se citó, con diferentes concentraciones de timol y carvacrol (Tabla 9), el cual fue proporcionado por el Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA)

ubicado en Salaices, Chihuahua.

Tabla 9. Concentraciones de timol-carvacrol en cada fracción.

Fracción	Concentración (%)	
	Carvacrol	Timol
1	81 %	3 %
2	82 %	4 %
3	6 %	77 %
4	23 %	48 %
5	26 %	58 %

5.1.2 Valoración de la actividad antimicrobiana.

A fin de evaluar la capacidad inhibitoria de las cinco fracciones del aceite esencial obtenidas, se procedió a la aplicación de las mismas en carnes frescas para su posterior almacenamiento en diferentes condiciones y evaluación en función al tiempo del desarrollo microbiano siguiendo los procedimientos que a continuación se describen:

5.1.2.1 Preparación de las muestras de carne y conteo de mesófilos aerobios.

Se evaluaron muestras de carne de res, las cuales fueron adquiridas bajo condiciones controladas en establecimientos de la ciudad de Saltillo, Coahuila. Dicha carne fue pesada y adicionada con concentraciones de 0, 0.05, 0.10 y 0.15 % de las fracciones obtenidas con diferentes proporciones de timol y carvacrol, componentes activos, usando como vehículo aceite vegetal. Posteriormente fueron almacenadas bajo condiciones de

refrigeración (4° C) y temperatura ambiente (30° C) para su evaluación en función al contenido de flora contaminante, a intervalos e 0, 24, 72 y 120 hrs de almacenamiento. El método utilizado para la cuenta total de mesófilos fue el propuesto por la AOAC 1993.

Los resultados arrojados 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 como la concentración a la cual se presenta la mayor inhibición del desarrollo microbiano.

5.2 ETAPA 2. Evaluación de la actividad antimicrobiana en patógenos.

5.2.1 Viabilización de cepas patógenas.

Las cepas empleadas fueron cultivos puros, proporcionados por el laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Coahuila la cual donó cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella typhi* ATCC 25147 y *Staphylococcus aureus* ATCC 36987; así mismo la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través del CIRENA, facilitó la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 51724 .

Las cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* se viabilizaron mediante preenriqueciéndose en caldo TSB, en tanto que para *S. typhi* se utilizó caldo de tetratiónato, para el mismo fin; posteriormente fueron incubadas a 35 °C durante 24 hrs. para después ser sembradas en el agar selectivo correspondiente, donde se llevó a cabo un estudio de su morfología colonial macroscópico y se tomó muestra para frotis y observación microscópica, mediante tinción de gram.

5.2.2 Inoculación de la carne con *E. coli*, *S. typhi*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*

Después de determinada la fracción con mayor actividad antimicrobiana se prosiguió a la inoculación de las cepas patógenas, sobre la carne de res por duplicado siendo el inóculo promedio de 6×10^2 ufc/ml, previamente adicionadas con la fracción de interés cuyas concentraciones fueron de 0, 0.05, 0.10 y 0.15%. Almacenándose en refrigeración (4 °C), para su posterior monitoreo en función al desarrollo microbiano a las 0, 24, 72 y 120 hrs. Mediante las técnicas propuestas por el AOAC 1993 para los casos de

E. coli, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes* en tanto que para *Staphylococcus aureus* se siguió el método propuesto por 3M “Petrifilm” aceptado por AOAC 2003.

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

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en investigación se muestran a continuación:

6.1 ETAPA 1 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

6.1.1 Determinación de la fracción timol carvacrol con mejor actividad antimicrobiana en carne.

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

Los resultados obtenidos en la cuenta de mesófilos aerobios bajo condiciones de refrigeración se muestran en la tabla 10 y en la figura 9 donde es posible observar el comportamiento del crecimiento microbiano en presencia de cada una de las fracciones

aplicadas reflejando el efecto inhibitorio sobre los mismos. Los resultados se presentan como las medias del análisis de varianza realizado ($p \leq 0.05\%$).

Tabla 10.- Medias de las ufc/ml bajo condiciones de refrigeración.

Fracción	Tiempo hrs.	0	24	72	120
	Concentración %				
1	0.00	2.48	2.13	2.71	3.42
1	0.05	2.48	2.36	2.56	3.53
1	0.10	2.48	2.46	2.32	3.77
1	0.15	2.48	1.88	1.86	3.54
2	0.00	2.43	2.41	2.84	3.13
2	0.05	2.43	2.34	2.67	2.96
2	0.10	2.43	2.29	2.61	2.97
2	0.15	2.43	1.86	2.56	2.99
3	0.00	2.58	2.18	3.22	3.80
3	0.05	2.58	2.13	3.45	3.39
3	0.10	2.58	1.97	3.72	3.58

3	0.15	2.58	1.81	3.17	2.73
4	0.00	2.20	2.07	3.29	3.54
4	0.05	2.20	2.15	3.18	3.35
4	0.10	2.20	1.75	3.32	3.13
4	0.15	2.20	1.64	3.22	1.69
5	0.00	2.42	2.21	3.43	3.67
5	0.05	2.42	2.11	2.99	3.61
5	0.10	2.42	2.26	3.18	3.21
5	0.15	2.42	1.89	2.72	2.41

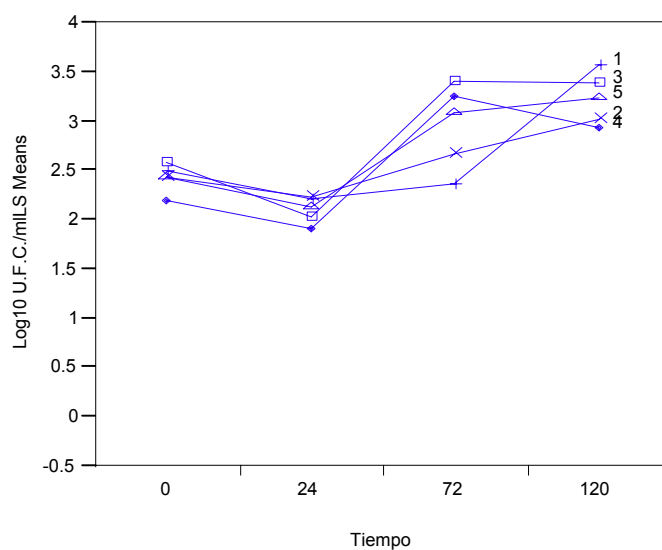


Fig.9. Gráfica del crecimiento microbiano en cada fracción (1,2, 3, 4 y 5) del aceite en refrigeración.

Donde es posible observar (Fig. 9) que a las 24 hrs. de contacto con el antimicrobiano

y la refrigeración, existe una ligera disminución en la carga microbiana presente en las carnes, la cual es mayor según se incrementa la concentración del aceite agregado, presentándose incrementos en los tiempos posteriores (72 y 120 hrs.) salvo en las fracciones 4 y 5 donde se presenta un decremento en el conteo microbiano en la concentración de 0.15%, dicho decremento disminuye el conteo a niveles por debajo del inicial (0Hrs.), encontrándose que los valores obtenidos son estadísticamente significativos para el caso de la fracción 4 a la concentración del 0.15%, así como que el valor obtenido al adicionar la fracción 5 al 0.15% es estadísticamente semejante al obtenido en el tiempo cero.

Tabla 11.- Medias de las ufc/ml bajo condiciones de ambiente.

Fracción	Tiempo hrs. Concentración %	0	24	72	120
1	0.00	2.48	3.22	6.13	7.15
1	0.05	2.48	3.19	6.07	7.09
1	0.10	2.48	3.03	6.07	7.12
1	0.15	2.48	3.05	6.16	7.04
2	0.00	2.43	3.02	6.89	11.09
2	0.05	2.43	3.88	6.89	10.78
2	0.10	2.43	3.79	6.44	10.72
2	0.15	2.43	3.65	6.71	10.43
3	0.00	2.58	3.17	7.06	9.00
3	0.05	2.58	3.15	6.90	8.81
3	0.10	2.58	3.01	7.04	8.28

3	0.15	2.58	3.04	6.10	7.41
4	0.00	2.20	3.55	5.88	5.92
4	0.05	2.20	3.39	5.53	5.79
4	0.10	2.20	3.31	5.74	0.00
4	0.15	2.20	3.55	5.63	0.00
5	0.00	2.42	3.51	5.19	6.60
5	0.05	2.42	2.5	4.91	5.97
5	0.10	2.42	3.01	4.65	5.74
5	0.15	2.42	3.10	4.41	2.65

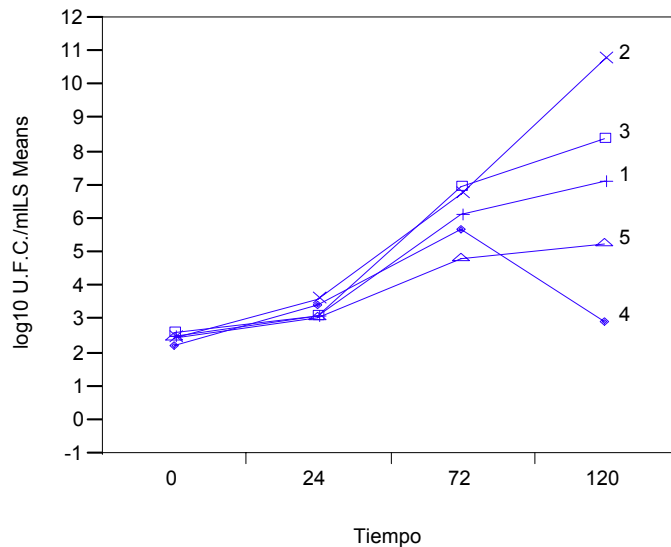


Fig.10. Gráfica del crecimiento microbiano en cada fracción (1, 2, 3, 4, y 5) del aceite en temperatura ambiente.

La cuenta de mesófilos aerobios en almacenamiento a temperatura ambiente se muestran en la tabla 11, dichos datos fueron analizados con un análisis de varianza y graficados en la figura 10, en la cual se observa que los crecimientos incrementan

normalmente conforme pasa el tiempo, las fracciones evaluadas presentan un efecto estable y ascendente en el crecimiento microbiano, siendo que para la fracción 4 se nota un descenso en la carga bacteriana, obteniéndose valores por debajo del conteo inicial, llegando a tener cargas microbianas de cero, así mismo la fracción 5 presenta un comportamiento diferente al resto de las fracciones a las 120 hrs de almacenamiento donde se presentan valores estadísticamente semejantes a los obtenidos a las 0 hrs. de almacenamiento por lo que se puede concluir que esta fracción es la de mayor actividad antimicrobiana.

Como se observa en la gráfica la fracción con mayor actividad antimicrobiana en condiciones tanto de refrigeración como de almacenamiento en condiciones ambientales es la fracción 4, la cual muestra incrementos a las 72 hrs. de contacto para posteriormente a las 120 hrs. presentar descensos significativos con respecto al resto de los tratamientos y aún contra los niveles iniciales. Teniendo a la fracción 5 como segunda mejor, ya que para este caso se presenta un comportamiento similar al indicado anteriormente, con la diferencia de que la carga microbiana se mantiene en valores similares a los iniciales como en el caso anterior.

6.1.2 Determinación de la concentración con mejor actividad antimicrobiana en carnes.

Posteriormente se procedió a analizar el efecto de la concentración en función al tiempo y tipo de almacenamiento obteniéndose la figura 11 a partir de los datos presentados en tabla 11 expresados como las medias del análisis de varianza efectuado.

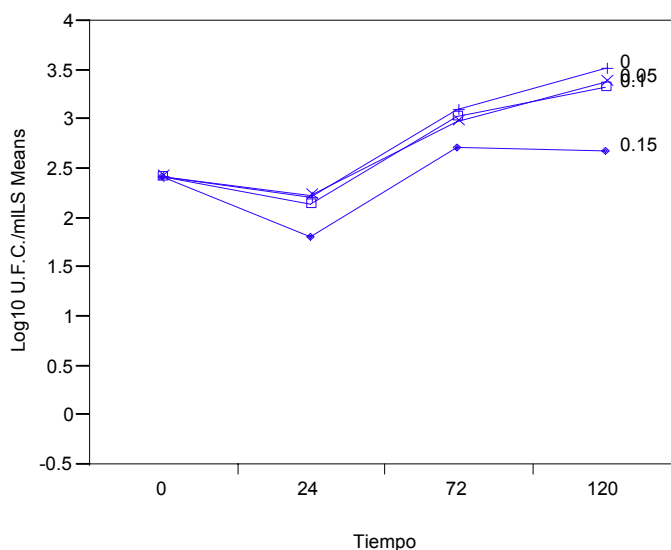


Fig. 11 Gráfica del crecimiento microbiano para cada Concentración (0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) en condiciones de refrigeración.

En la figura 11 es posible observar claramente el decremento en los niveles del conteo de mesófilos aerobios a las 24 hrs. para todas las dosis administradas, presentándose incrementos a las 72 y 120 hrs, destacándose el tiempo de 120 hrs a la concentración de 0.15% el cual resultó ser estadísticamente semejante a los valores iniciales de conteo, de acuerdo con el análisis de t-student efectuado, pudiéndose apreciar también que para las concentraciones de 0.10, 0.05 y 0.00% los datos son similares y no se aprecia decremento en la carga microbiana, mas que incremento.

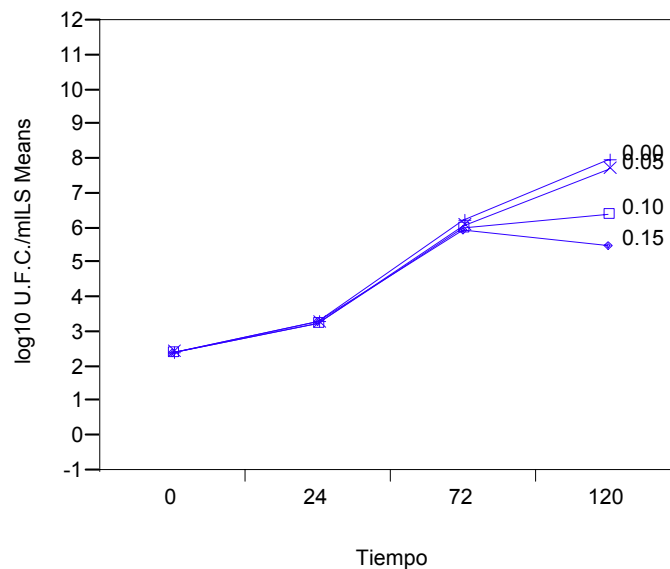


Fig. 12 Gráfica del crecimiento microbiano para cada Concentración (0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) en condiciones de ambiente.

Los datos obtenidos en el conteo de mesófilos aerobios fueron analizados mediante

un análisis de varianza ($p \leq 0.05\%$) el cual destaca los comportamientos presentados por la concentración de 0.15% donde es posible apreciar que los niveles en el conteo de flora contaminante incrementan constantemente en función al tiempo, encontrándose diferencia a esta conducta a las 120 hrs de contacto con una concentración del 0.15% donde se observa que los niveles microbianos empiezan a decaer (Fig. 12), dicho comportamiento es seguido por la concentración de 0.10% y siendo finalmente que a concentraciones del 0 y 0.05% no se presentan diferencias significativas entre estos, como se muestra en el análisis t-student.

6.2 ETAPA 2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente patógenos.

6.2.1 *Salmonella typhi*.

El crecimiento microbiano de *Salmonella* es normal en el transcurso de las horas (Fig. 13), se puede observar que las carnes tratadas con la fracción cuatro presentan un menor crecimiento con respecto a la muestra testigo, en cuanto respecta a la concentración de 0.15% se nota un decremento en la carga microbiana estadísticamente significativo, lo cual muestra la sensibilidad de *Salmonella* por el aceite esencial de orégano siendo que las demás concentraciones mantuvieron crecimientos constantes e inferiores a los presentados en la muestra sin tratamiento. Siendo las concentraciones de 0.05 y 0.10% estadísticamente iguales e inferiores a la testigo 0%.

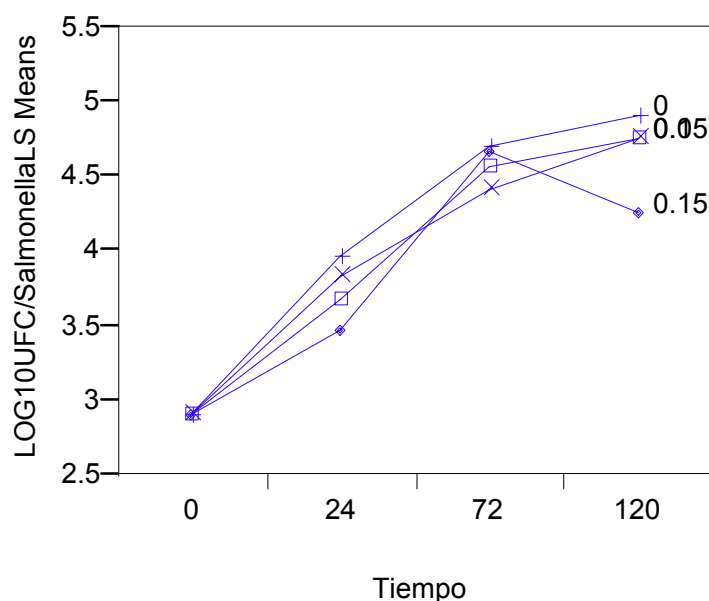


Fig. 13. Gráfica del crecimiento de Salmonella en función a la concentración F4 (0, 0.05, 0.10 y 0.15%).

6.2.2 *Escherichia coli*

El crecimiento de *E. coli* se presenta en forma típica para las cuatro concentraciones de la fracción 4 no encontrando diferencias significativas entre las concentraciones aplicadas y el testigo (Fig. 14), donde se observa que las muestras tratadas con la concentración de 0.15% son ligeramente inferiores al resto, pero sin presentar diferencias significativas con respecto al resto por lo que es posible apreciar que la susceptibilidad ante el antimicrobiano por este microorganismo es muy baja.

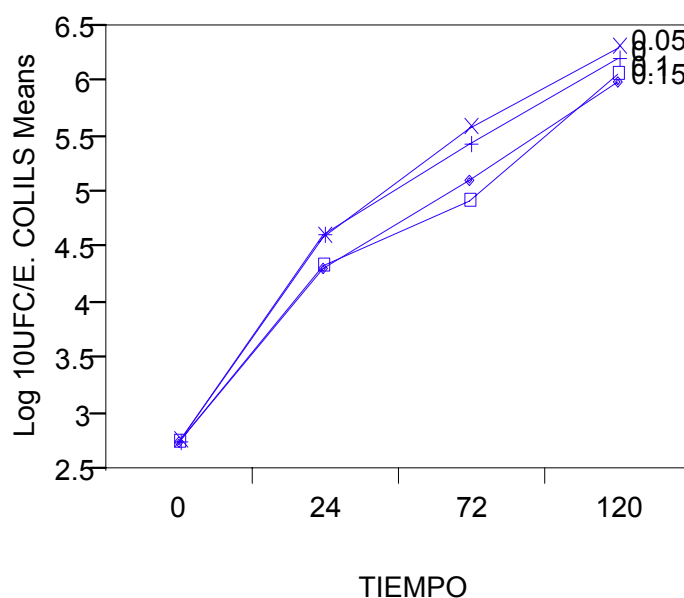


Fig.- 14 Gráfica del crecimiento de *E. coli* en función a la concentración de F4 (0, 0.05, 0.10 y 0.15%).

6.2.3 *Listeria monocytogenes*

Como se puede observar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* es en aumento conforme pasan las horas (Fig. 15), la inhibición del patógenos a las concentraciones aplicadas del aceite esencial no es estadísticamente significativo entre ellas además de ser igual a la carne testigo. Por lo que este microorganismo muestra una baja sensibilidad a la aplicación de las concentraciones aquí estudiadas, siendo la concentración del 0.10% la que presentó las cuentas mas bajas sin ser estadísticamente significativas.

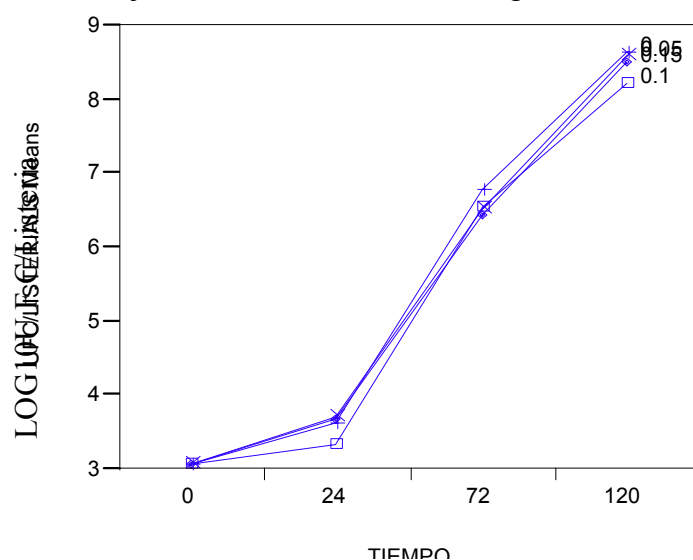


Fig. 15 Gráfica de crecimiento de *Listeria* en función a la concentración F4.

6.2.4 *Staphylococcus aureus*

El crecimiento de *S. aureus* es normal para la carne testigo (Fig. 16), incrementándose en función al tiempo, no siendo así para las muestras tratadas con la fracción 4 donde existen diferencias significativas entre los tratamientos con las tres concentraciones en cuestión principalmente a las 120 hrs. de contacto donde se aprecia que la carga microbiana se mantiene e incluso tiende a reducirse en comparación con el monitoreo previo, presentándose en la concentración de 0.15% los valores más bajos.

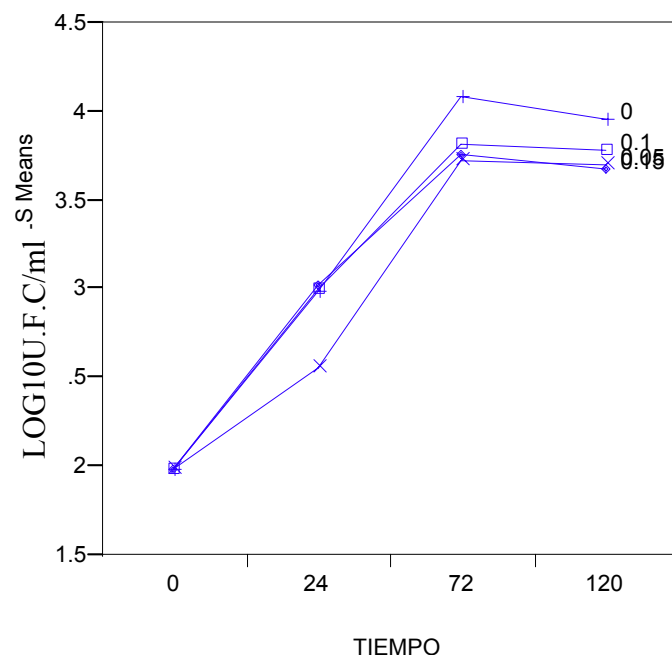


Fig. 16 Gráfica de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en función a la concentración F4 (0, 0.05, 0.10 y 0.15%).

CAPITULO VII

DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento realizado con carne de res adicionada con diferentes fracciones de aceite de orégano, bajo condiciones de almacenamiento de ambiente y refrigeración, se encontró que el aceite esencial de orégano es efectivo para la inhibición de flora contaminante típica en la carne de res, siendo la fracción 4 la que tuvo un mayor efecto antimicrobiano reduciendo la carga hasta cero a las 120 hrs tanto en ambiente como en refrigeración, siguiendo este comportamiento pero en

menor actividad es la fracción 5 en la cual presentan reducciones microbianas importantes en ambas condiciones de almacenamiento. Dichas fracciones reducen la carga microbiana de la carne y la mantiene constante, no siendo así para las fracciones 1, 2 y 3 las cuales mantienen el conteo microbiano por debajo del control pero sin reducciones significativas.

Esto es debido a las proporciones en las que se encuentra el timol y carvacrol ya que causa efectos sinergistas, lo cual concuerda con los estudios realizados en la UDLA donde se evaluaron mezclas ternarias y cuaternarias con estos compuestos, además de que se usaron antimicrobianos sintéticos y su actividad antimicrobiana se comportó similar. (Campomanes, 2003). Así mismo la dosis en la cual el efecto inhibitorio fue mayor es en el de 0.15% ya que estas reducen la carga considerablemente presentando este comportamiento para todas las fracciones usadas, seguida de 0.10 y 0.05 %, en algunos casos esta última concentración no tuvo ningún efecto antimicrobiano.

Los patógenos estudiados en el trabajo fueron *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*, de las cuales la que tuvo una mayor resistencia a las concentraciones usadas fue *Escherichia coli* donde no se observaron diferencias significativas entre los controles sin adición de aceite esencial de orégano y los tratamientos con diferentes concentraciones, observándose ligeros decrementos al tratar con una concentración de 0.15%, dichos resultados concuerdan con los datos obtenidos por la Universidad Autónoma de Chihuahua en un estudio in vitro donde se probaron cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *B. Cereus* siendo las cepas de *E. coli* las menos sensibles al antimicrobiano en cuestión (Maguregui; et al 2004), además estudios realizados in vitro por la Universidad de Oklahoma (Dunford, 2003) muestran que *E. coli* O157:H7 es sensible a concentraciones de 0.15%. En este caso se encuentra *Listeria monocytogenes* en la cual no hubo diferencias significativas en las dosis aplicadas, lo cual concuerda con el experimento realizado por la Universidad de Oklahoma (Dunford, 2003) que en concentraciones de 0.20% se puede apreciar la disminución de la carga microbiana en tanto para la del 0.15% no se ve un efecto significativo.

En contraste está la *Salmonella typhi* ya que tuvo una mayor sensibilidad al aceite de orégano en la concentración de 0.15% reduciendo la carga bacteriana, 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 por 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. Así mismo sucede para *Staphylococcus aureus* el cual presenta una disminución importante en el contenido microbiano para las tres concentraciones usadas siendo estas significativamente iguales pero la que tuvo mayor inhibición fue la de 0.15%, lo cual corresponde con los estudios realizados por la Universidad Autónoma de Chihuahua, en el cual dicho experimento manejaron CMI (Concentración mínima inhibitoria) y CMB (Concentración mínima bactericida) para los patógenos anteriormente mencionados y de los cuales *S. aureus* muestra las más bajas concentraciones tanto inhibitorias como bactericidas (Maguregui; et al 2004).

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

Como se ha mencionado anteriormente el aceite de orégano tiene una actividad antimicrobiana, inhibiendo así la proliferación microbiana encontrada normalmente en los alimentos.

Por lo que en el trabajo se encontró que esta afirmación es correcta, al ser tratada

carne de res con diferentes fracciones de aceite de orégano, las cuales todas tuvieron efectos inhibitorios, pero la que tuvo mayor actividad antimicrobiana fue la fracción 4, en la cual las cuentas de mesófilos aerobios se reducen a 0 en ambas condiciones de almacenamiento, comportándose similar la fracción 5 en la que hubo disminuciones importantes en la carga microbiana. No siendo así para las fracciones restantes, sin embargo estas mantienen bajas las cuentas bacterianas con respecto al testigo.

Podemos concluir que los compuestos activos del aceite esencial de orégano son sinergistas al estar presentes en la fracción 4 en concentraciones de 23 y 48% respectivamente de carvacrol-timol, en las mismas condiciones está la fracción 5 que contiene 26% carvacrol y 58% timol presentando una segunda mejor inhibición microbiana, lo que no podemos observar en las otras fracciones ya que su composición es casi en su totalidad de un solo componente activo, sin embargo estas fracciones mantienen la carga microbiana por debajo del conteo sin tratamiento.

En cuanto a las dosis aplicadas la que tuvo mayor influencia en los microorganismos fue la de 0.15% bajando la carga bacteriana a niveles de 0, seguida está por las dosis de 0.10 y 0.05, siendo estas dos significativamente iguales. Por lo anterior se recomienda la aplicación de dosis de 0.15% para reducción de mesófilos aerobios.

Una vez determinada la mejor fracción se aplicó en carne de res inoculada con diferentes patógenos a las diferentes dosis establecidas, el comportamiento de cada microorganismo fue diferente, siendo la *E. coli* y *Listeria monocytogenes* las que tuvieron una mayor resistencia frente al aceite esencial de orégano sin embargo hubo reducciones no significativas con respecto al testigo, lo que se recomienda es que para posteriores investigaciones se aumente la dosis y el tiempo de exposición.

En contra parte está *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus* que redujeron sus cargas significativamente en concentraciones de 0.15%, lo que las hace más sensibles a la fracción 4 del aceite de orégano.

LITERATURA CITADA

Adams, M.R. Moss, M.O. 1997. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 141-148.

Alzamora, S.M., CerruttiP., Guerrero, S. Y Lopez-Malo A. 1995. Minimally Processed Fruits by Combined Methods. En: Food preservation by moisture control. Fundamentals and Applications. Barbosa-Canovas G.V. y Welton-CahnesJ. (Eds.) Technomic Publishing Co., Inc. E.U.A. pp 463-492.

- Anónimo 1.** 2004. <http://www.geocities.com/hurtadopons/conservacion.htm>
- Anónimo 2.** 2005. http://www.eufic.org/sp/quickfacts/aditivos_alimentarios.htm
- Anónimo 3.** 2004. <http://librys.com/problemasdequimica/aditivos.html>
- Board, R.G.** y Gould, G. W. 1991. Feature prospects in food Preservatives. Blackie Academic and Professional 267-283.
- Bourgeois, C.M.** Mescle, J.F. 1995 Microbiología Alimentaria. Vol. 1. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 253-260.
- Branen, A. L.** 1993. Introduction tu Use of Antimicrobials. Cap 1. En: *Antimicrobials in Foods*. 2da Ed. PM. Davidson y AL. Branen (Eds). Marcel Dekker, Inc, New York. Pp.1-9.
- Campomanes M. J. P.** 2003. Evaluación del efecto de mezclas ternarias y cuaternarias de antimicrobianos sobre *Aspergillus parasiticus*. Tesis de Licenciatura en ingeniería de Alimentos. Universidad de Las Américas, Puebla.
- http://140.148.3.250/u_dl_a/servlet/mx.udlap.ict.tales.html.Block?Thesis=1111&Type=O
- Campos, M.** 2004. Orégano. Dirección de Mercados Agroalimentarios. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Republica Argentina.
- <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/agricultura/otros/aromaticas/Oregano/index.php>
- Conagro.** 2005. <http://www.conagro.com/novedades/ganaderia.html>
- Desroisier, W.N.** 1987. Conservación de los Alimentos. 2ª edición, Editorial CECSA México, D.F. pp. 40-56.
- Dunford, N.** 2003. Influence of Oregano oil on Growth of Foodborne Pathogens. Food & Agricultural Products Center. Oklahoma State University.
- Furia, T.E.** 1975. Handbook of Food Additives. 2da Edición. CRCPress. Cleveland, Ohio. Pp 57-63.
- Huerta, C.** 2005. Orégano Mexicano: Oro Vegetal. Conabio.
- http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/indice15.html
- ICMSF.** 1997. Microbiología de los Alimentos. Características de los Microorganismos Patógenos. 1era Ed. Internacional Comision on Microbilical Specifications 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. Pp.3-14.

Jay, J.M. 1973. Microbiología Moderna de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 103-115.

Justesen U. Knuthsen P. 2001. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. Food Chemistry. Pp. 245-250.
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_isorefpid=s0004-6222004000100015Ing=es

Lück, E. 1981. Conservación química de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 25-27.

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.

Martínez-Salvador M. 1997. Caracterización y evaluación del potencial productivo de orégano (*Lippia berlandieri* Shauer) en el municipio de Mapimi, Durango. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Mex.. Departamento de Zonas Áridas. Chapingo, México. Tesis de Licenciatura. Pp. 62 –67.

McGimpsey, J. 1993. Oregano. *Origanum vulgare*. Crop & Food research.
<http://www.crop.cri.nz/psp/broadshe/oregano.htm>

Mossel, D.A.A. 1985. Microbiología de los alimentos. Ed Acribia. Zaragoza, España. Pp. 196-217.

Multon, J.L. 2000. Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las Industrias Agroalimentarias. 2da. Edición. Ed. Acribia, Zaragoza, España. Pp 14-19.

Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. J. Ethnopharmacol. Pp. 76, 201-214.
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_isorefpid=s0004-6222004000100015Ing=es

Putievsky, E. 1996. Cultivation, selection and conservation of orégano species in Israel. Ed. Padulosi.
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_isorefpid=s0004-6222004000100015Ing=es

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

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_isorefpid=s0004-6222004000100015Ing=es

Rota, C. 2004. Actividad Antiumicrobiana de Aceites Esenciales Obtenidos de Plantas Aromaticas. Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

<http://www.sri.ua.es/congresos/sem/aLIMENTOS>

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

Silva, 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. Salaiques, Chihuahua.

Welti-Chanes, J. Vergara, F. Y Lopez-Malo, A. 1997. Minimally Processed Foods, State of the art and future. En: Food Engineering 2000. Fito, P., Ortega, E. Y Barbosa, G. (Eds.) Chapman.

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

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_isorefpid=s0004-6222004000100015Ing=es