

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA**  
**“ ANTONIO NARRO “**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS**



**Aplicación de aceite esencial del orégano ( *Lippia berlandieri*  
*Schauer*) en carne de cerdo para su conservación.**

***TESIS POR:***

***Alvaro Catonga Casbis***

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

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Enero del 2006**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA**

**“ ANTONIO NARRO “**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS**

**Aplicación de aceite esencial del orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) en carne de cerdo para su conservación.**

***TESIS POR:***

***Alvaro Catonga Casbis***

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

**Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**APROBADA**

---

**M. C. Maria Hernández González.**  
**Presidente**

---

**M.C. Ramón Silva Vázquez**  
**Vocal**

---

**M.C. Oscar Noe Reboloso P.**  
**Vocal**

---

**M. C. Xochitl Ruelas Chacón**  
**Vocal Suplente**

---

**Dr. Ramón F. García Castillo**  
**Coordinador de la División de Ciencia Animal.**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Enero del 2006.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A **la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por haberme brindado la oportunidad de culminar una carrera y cumplir con uno de mis anhelos y ser hombre de provecho ante la sociedad.

Al **Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECyT)**, por el apoyo brindado a través de su programa de becas, y sobretodo por la confianza depositada en mí para la realización de esta investigación.

Al **Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA)**, por la confianza para la realización de este trabajo y con el apoyo de material brindado para tal causa, en especial al **M.C. Ramón Silva Vázquez**, por su apoyo en la presentación del trabajo de investigación.

Al **la M.C. Maria Hernández González**, por darme la oportunidad de ser participe para la realización de esta investigación y sobre todo agradecerle la confianza brindada en todo momento.

Al **M.C. Oscar Noe Reboloso Padilla**, por los conocimientos brindados en la formación como profesionista, la confianza, los consejos, pero sobre todo por su amistad y la sencillez que lo caracteriza.

A la **M.C. Xochitl Ruelas Cachón**, por compartir sus conocimientos para mi formación, su sencillez y sobre todos por aquellos consejos y apoyo brindado en toda etapa de la carrera, gracias por todo.

A la **Lic. Laura Olivia Fuentes Lara**, por ser participe en mi formación como profesionista, su apoyo y confianza en los diferentes momentos.

A la **Dra. Lourdes Morales Caballero**, por sus consejos brindados, enseñanzas y sobretodo por compartir sus conocimientos para mi formación en la carrera.

A mis **Amigos** de la generación de alimentos, por haberme soportado en todo momento, por su grandiosa amistad y por todo los momentos que compartimos juntos éxito a todos.

En especial a mis grandes amigos, **Julio J. Melchor R.**, **Pilar Espitia H.**, y **José Ambrosio R.**, por su amistad, su apoyo en las buenas y en las malas, y sobre todo por la confianza que siempre existió entre nosotros y los momentos inolvidables compartidos.

:

## DEDICATORIAS

A **DIOS** por darme la fortaleza de afrontar las dificultades en todo momento, por otorgarme la vida y por ser un guía en las decisiones a tomar, así como su participación en las meta alcanzadas.

A la memoria de mi padre **† Antonio Catonga Hernández**, quien a pesar de todo me enseñó a conocer y guiarme en la vida con sus experiencias. Que Dios lo tenga en su gloria.

A mi madre **Marina Casbis Jiménez** que a pesar de las carencias siempre estuvo presente con su apoyo desde la infancia, por su cariño, su confianza a pesar de las diferencias y la distancia, por su comprensión ante mis debilidades, mi mas sincera admiración y respeto.

A mis **Hermanos y Hermanas**, por esos ánimos y cariño que siempre me impulsaron a luchar, para obtener lo que uno se propone en la vida y alcanzar una meta mas a pesar del tiempo y la distancia.

A **Tina Tecla Ch.**, que a pesar de las circunstancias, tiempo, y distancia su apoyo cariño, amor y comprensión estuvieron presentes sin importar las trabas de la vida y el destino. Te quiero mucho.

A **Angélica García C.**, por soportarme tanto, por todos esos momentos tan hermosos que hemos compartido, en las buenas y en las malas y sobretodo ese amor que me has demostrado. Te quiero mucho.

A las bendiciones de **Dios**; Mis **Hijos, Bere, Dany, Jaíro** que han sido motivo importante en la culminación de mi formación profesional y luchar a pesar de los obstáculos así como motivo para disfrutar la vida. Los adoro y los quiero mucho. Que Dios me los proteja.

## INDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
<b>DEDICATORIAS</b> .....	iii
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	vii
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>I INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II JUSTIFICACIÓN</b> .....	3
<b>III RESUMEN</b> .....	5
<b>IV OBJETIVOS</b> .....	7
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	7
4.1.1 Objetivos específicos.....	7
<b>4.2 Hipótesis</b> .....	7
<b>V REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	9
<b>5.1 Antimicrobianos</b> .....	9
5.1.1 Antimicrobianos sintéticos.....	10
5.1.2 Antimicrobianos naturales.....	12
<b>5.2 Orégano</b> .....	18
5.2.1 Generalidades.....	16
5.2.2 Características botánicas.....	17
5.2.3 Clasificación taxonómica.....	18
5.2.4 Clima y suelo.....	19
5.2.5 Usos y composición química.....	19
5.2.6 Método de extracción.....	21
5.2.7 Actividad biológica de los compuestos .....	22
5.2.8 Importancia económica del orégano.....	23

5.3	<b>Carne de cerdo</b> .....	24
5.3.1	Producción y consumo .....	25
5.3.2	Microbiología de carne de cerdo.....	27
5.4	<b>Factores que afectan el desarrollo de los microorganismos</b> .....	28
5.4.1	pH.....	28
5.4.2	Temperatura.....	29
5.4.3	Potencial de oxido reducción.....	30
5.4.4	Actividad de agua .....	30
5.4.5	Composición general del medio.....	31
5.5	<b>Microorganismos patógenas en la carne de cerdo</b> .....	31
5.5.1	<i>Escherichia coli</i> .....	31
5.5.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
VI	<b>METODOLOGÍA</b> .....	34
6.1	<b>ETAPA 1: Evaluación de la actividad antimicrobiana en mesófilos aerobios</b> .....	34
6.1.1	Obtención del aceite esencial de orégano.....	34
6.1.2	Valoración de la actividad antimicrobiana.....	35
6.1.2.1	Preparación de las muestras de carne y conteo de mesófilos aerobios.....	35
6.2	<b>ETAPA 2: Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a patógenos</b> .....	36
6.2.1	Viabilización de cepas patógenas.....	36
6.2.2	Inoculación de la carne con <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ,.....	37

<b>VII</b>	<b>RESULTADO Y DISCUSIONES</b>	<b>38</b>
7.1	<b>ETAPA 1 Evaluación de la actividad antimicrobiana contra mesófilos aerobios</b>	<b>38</b>
7.1.1	Determinación de la fracción y concentración con mejor actividad antimicrobiana en la carne en condiciones de refrigeración	38
7.1.2	Determinación de la fracción y concentración con mejor actividad antimicrobiana en la carne en condiciones de ambiente	38
7.1.3	Determinación de la fracción y concentración del aceite esencial con mejor actividad antimicrobiana en la carne en condiciones de ambiente	43
7.2	<b>ETAPA 2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente patógenos</b>	<b>48</b>
7.2.1	Determinación de la concentración óptima del aceite esencial ante <i>Escherichia coli</i> en la carne en condiciones de refrigeración	48
7.2.2	Determinación de la concentración óptima del aceite esencial ante <i>Staphylococcus aureus</i> en la carne en condiciones de refrigeración	52
<b>VIII</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>57</b>
<b>IX</b>	<b>CITAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>58</b>
<b>X</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>62</b>

## INDICE DE CUADROS

Titulo	Cuadros	Página
1	Clasificación de los antimicrobianos alimentarios.....	10
2	Conservadores químicos GRAS (generalmente reconocidos como seguros.....	11
3	Tipo de antimicrobianos naturales de uso en los alimentos.....	13
4	Lista de especias aromatizantes y saborizantes naturales tipo GRAS.....	15
5	Sustancias provenientes de plantas con actividad antimicrobiana.....	16
6	Taxonomía del orégano mexicano.....	18
7	Componentes químicos del orégano que determina su calidad.....	20
8	Actividades biológicas del orégano .....	23
9	Estadísticas a nivel mundiales sobre la carne.....	26
10	Características de <i>Escherichia coli</i> .....	32
11	Características de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
12	Composición de las fracciones de timol-carvacrol.....	34
13	Medias de las $\Delta * 10^3$ ufc/ml bajo condiciones de refrigeración.....	39
14	Medias de $\log_{10} \Delta * 10^4$ ufc/ml bajo condiciones de ambiente.....	44
15	Medias de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> .....	49
16	Tabla de Medias de crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> .....	53

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Titulo</b>	<b>Pagina</b>
1	Orégano silvestre <i>Lippia berlandieri</i> .....	17
2	Estructura química del timol y carvacrol.....	20
3	Sistema de arrastre por vapor.....	22
4	Muestras de tinción de gram de patógenos inoculadas.....	36
5	Crecimiento microbiano de las fracción en función a la concentración bajo condiciones de refrigeración .....	40
6	Crecimiento microbiano de la fracción en función al tiempo bajo condiciones de refrigeración.....	41
7	Crecimiento microbiano de la concentración en función al tiempo en condiciones de refrigeración.....	42
8	Crecimiento microbiano de la fracción en función a la concentración bajo condiciones de ambiente.....	45
9	Crecimiento microbiano de la fracción en función al tiempo en condiciones de ambiente.....	46
10	Crecimiento microbiano de la concentración en función al tiempo en condiciones de ambiente.....	47
11	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> , en base a la fracción en función al tiempo.....	50
12	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> , concentración en función al tiempo.....	51
13	Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> , en base a la fracción en función al tiempo.....	54
14	Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> , en base a la concentración en función al tiempo.....	55

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

Desde tiempos prehistóricos, el ser humano ha buscado la manera de conservar los alimentos. Tradicionalmente, éstos han sido conservados, con el uso del frío, calor, deshidratación y fermentación. En algunos casos, los aditivos químicos fueron empleados, pero fue hasta las últimas décadas el uso de éstos se ha hecho extensivo (Bramen, 1993).

La conservación de los alimentos puede definirse como todo método o tratamiento que prolonga su vida útil, de forma que mantenga en grado aceptable, su calidad, incluyendo color, textura y aroma. Comprende métodos que van de la cocción, refrigeración y enlatado, hasta la deshidratación (Holdsworth, 1988). La conservación de alimentos, se basa en la inactivación ó retardado del crecimiento de microorganismos patógenos o deteriorativos (López et al,1995). Por ello la conservación, constituye el núcleo central de la ciencia y tecnología de los alimentos y es el principal objeto del procesado de alimentos (Raman, 2003).

El procesado y almacenamiento de alimentos es vital para el suministro continuo de los mismos durante su producción estacional, así como el uso posterior ya que permite aumentar la vida útil mediante el uso de diversas técnicas. Los productos con cierto valor agregado, proporcionan alimentos de mejor calidad en cuanto a propiedades nutricionales, funcionales y sensoriales.

Una cualidad importante de los antimicrobianos sintéticos, es su efectividad a bajas concentraciones en el alimento, estos no debe interferir con las características del mismo. En algunas ocasiones, los compuestos antimicrobianos no cumplen con estas características deseables, por lo que recientemente, se ha incrementado la necesidad de encontrar alternativas de origen natural que sean seguros para el consumidor.

Se confía cada vez mas en técnicas de conservación que resulten mas viables para cumplir con las demandas de alimentos mas naturales y con menos contenido en compuestos químicos. Las tendencias actuales se orientan hacia alimentos procesados de manera mínima.

Se ha encontrado que los componentes esenciales de algunas plantas, hierbas, especias y frutas, contienen sustancias como ácidos grasos, aceites esenciales, compuestos fenólicos que muestran una actividad inhibitoria contra microorganismos como levaduras, mohos y bacterias. Por lo anterior, es necesario la investigación de los efectos antimicrobianos de estas sustancias. El uso de los antimicrobianos de origen natural esta sujeto a ciertos requerimientos de la ley, que pueden ser bastantes diferentes alrededor del mundo (Smid et. al., 1999).

El orégano es un cultivo con amplio potencial de aprovechamiento en los campos alimenticios (hoja desecada), aplicado en los alimentos frescos ó procesados y el farmacológico (aceite esencial), esta última de importancia, ya que el 98% se aplica en perfumería, licorería y refresquera, como fijador de color, olor y sabor, pero en estudios recientes se ha encontrado actividad microbiana (contra hongos, bacterias, insectos y virus). Por sus características y propiedades el de origen mexicano se perfila para ser el favorito en el consumo mundial. Su importancia económica crece debido a su uso tradicional y por las recientemente descubiertos, por lo que su mercado es creciente y su precio rentable en la mayoría de los casos.

## **CAPITULO II**

### **JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad son varias las enfermedades de origen alimentario es por eso que surge la necesidad de conservar los alimentos. Las exigencias del consumidor citan, que los alimentos deben ser mas naturales y menos procesados, de lo cual surge la necesidad de obtener alternativas en la aplicación de productos antimicrobianos naturales que cumplan con mayor eficiencia que los de origen sintéticos, ya que estos al consumirlos con frecuencia resultan ser dañinos. Teniendo también el problema de que los microorganismos poco a poco se van haciendo resistentes a la aplicación de antimicrobianos sintéticos. Se sabe que las sustancias activas provenientes de plantas con actividad antimicrobiana son compuestos fenólicos de sus aceites esenciales, siendo los mas importantes el carvacrol, el timol, el eugenol y el metil chavicol (Katayama et. Al.,1960).

El orégano de interés de acuerdo a los estudios realizados 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: antifécciosos, antibacteriales, antivirales, antimicóticos, antiparasitarios, antisépticos, antiinflamatorios, anticoagulantes, antialérgicos, neurotónicos, endocrinoreguladores, inmunoestimulantes, etc. (Silva, 2003).

La importancia que ha tomado la explotación del orégano ha sido muy amplia, en los países como: Egipto, Israel, Francia, Marruecos, Albania, Republica Dominicana, Canadá, Chile, Perú, Argentina, España, entre otros (CONABIO, 2005), así como nuestro país, por los altos ingresos que se obtienen de ello y los usos múltiple.

El principal importador en el ámbito mundial, es Estados Unidos, con un promedio total de 6, 500 toneladas al año de orégano crudo o manufacturado; con un promedio de 14 millones de dólares y en producto seco o manufacturado; alcanza los 700 mil dólares. En segundo lugar tenemos el mercado de Europa que importa 4,400 toneladas anuales con un valor superior a los 8 millones de euros, siendo Alemania el principal comprador de la Unión Europea, con un 25% seguido de Italia(19.6%),Grecia (13.4%) y España (8.4%).

Las cotizaciones del aceite esencial en los distintos mercados son de US \$100 a US \$130/litro en el mercado Norteamericano, E130/litro en el Europeo, y hasta US\$ 180 en el mercado Asiático. Debido a la creciente importancia de este cultivo en México y el mundo, es importante el apego a la normatividad internacional: CODEX, FDA, USDA y NOM's.

## CAPITULO III

### RESUMEN

En la actualidad se destaca un crecimiento en la población mundial donde es urgente los incrementos en la conservación y procesado de los alimentos. La alteración de los alimentos y la contaminación por parte de los microorganismos, constituye un problema que aun no esta bajo control a pesar de las diferentes formas y técnicas utilizadas.

Se busca en la actualidad alimentos que respondan 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 del orégano sobre la principal flora contaminante y patógena de la carne de cerdo mediante análisis microbiológicos en laboratorio. Ya que este aceite contiene compuestos activos como el timol y carvacrol a concentraciones diferentes en cada una de las cinco fracciones.

Los análisis microbiológicos se realizaron mediante estrictas condiciones de asepsia para prevenir posibles contaminaciones en los tratamientos efectuados. Se realizaron tratamientos bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente (30° C) y de refrigeración (4° C) para el caso de mesófilos aerobios aplicando a las carnes en cuestión las cinco fracciones a evaluar, en concentraciones de 0.00, 0.05, 0.10 y 0.15% respectivamente para ser monitoriadas a tiempos de 0, 24, 72, y 120 hrs. sembrando en cajas petri por duplicado a fin de determinar tanto la fracción como la concentración a la cual se ejerce el mayor efecto inhibitorio, resultando que tanto las fracciones 3 y 4, como las concentraciones de 0.10 y 0.15% fueron las que mostraron mayor efecto inhibitorio de acuerdo al conteo de mesófilos aerobios, donde los niveles alcanzados por las carnes sometidas a estos tratamientos resultaron ser inferiores, siendo esas diferencias estadísticamente significativas, al someterse al análisis de varianza ( $P \leq 0.05\%$ ).

Una vez determinadas tanto la fracción (fracciones 4 y 3) como la concentración óptima (0.10 Y 0.15%), estos fueron aplicados sobre carnes previamente inoculados con patógenos contaminantes de carnes de cerdo (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*).

Las carnes una vez inoculadas fueron almacenadas en condiciones de refrigeración, con concentraciones de 0.0, 0.10, 0.15, 0.20 % de aceite esencial de orégano fracciones 3 y 4 monitorizándose a tiempos de 0, 24, 72 y 120 hrs respectivamente, sembrados en cajas petri en agar selectivo, para el posterior conteo de UFC una vez obtenidas las cuentas de los diferentes tratamientos, estos se sometieron a un análisis de varianza de ( $p \leq 0.05$ ) donde los valores que se tomaron en cuenta para los análisis estadísticos fueron: fracción en función concentración y al tiempo en  $\Delta$  de crecimiento para conocer a fondo el comportamiento de todos los valores en función al efecto antimicrobiano o inhibitorio y así determinar la fracción y concentración óptima para la carne de cerdo. Obteniendo que no hay diferencias significativas en el uso de las fracciones 3 y 4 y que la mejor concentración resultó ser la 0.15 %, en donde fue posible observar inhibición total en cuanto a las carnes tratadas con *Staphylococcus aureus* teniendo cuantías finales de cero, seguida por la de 0.20 %.

## CAPITULO IV

### OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antimicrobiana de las diferentes fracciones, extraídas del aceite esencial del orégano (*Lippia berlandieri*), sobre la flora contaminante de carne de cerdo.

##### 4.1.1 Objetivos Específicos

- Valorar la actividad antimicrobiana de las cinco fracciones timol-carvacrol obtenidas a partir de orégano (*Lippia berlandieri*) en carne fresca variando dosis y condiciones de almacenamiento.
- Determinar de la concentración óptima de la fracción timol-carvacrol para la conservación de carne de cerdo.
- Evaluar la efectividad antimicrobiana de la fracción timol-carvacrol en carnes inoculadas con agentes patógenos: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

#### 4.2 Hipótesis

El aceite esencial extraído del orégano tiene efecto antimicrobiano ante flora contaminante y patógena, propia de la carne de cerdo.

## **CAPITULO V**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **5.1 Los antimicrobianos**

Son compuestos sintéticos o naturales dependiendo de su extracción, adicionados de manera intencional, con capacidad de inhibir o retardar reacciones de alteración biológicas en los alimentos y bebidas los cuales pueden ser comercializadas como aditivos para la conservación de los alimentos (Jean et. Al., 1990).

La aplicación de estos agentes para la conservación, en la actualidad presenta muchas ventajas pero, pueden resultar obsoletas ya que la sociedad demanda, alimentos con menos conservadores y consideran sospechosos de poseer cierto grado de toxicidad y por esta razón, son rechazadas. Es así como la industria alimentaria ha sido forzada a remover y adoptar alternativas para el mantenimiento o extensión de la vida útil de los productos que la población consume (Multon, 2000).

Considerando que lejos de las ventaja o desventajas que los conservadores poseen, según su origen podemos clasificarlos en cuatro grupos: naturales, idénticos a los naturales, modificados y artificiales cuadro No.1 (Morales, 2000).

**Cuadro No. 1.-** Clasificación de los antimicrobianos alimentarios.

<b>Clase de Aditivo</b>	<b>Características</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>1. Naturales</b>	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.
<b>2. Idénticos A naturales</b>	Reproducción por síntesis química o biológica a nivel laboratorio.	Colorantes tipo carotenoides presentes de forma natural en vegetales, huevos, plumas, etc.
<b>3. Modificados</b>	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)
<b>4. Artificiales</b>	Compuestos no presentes en la naturaleza, sintetizados a nivel laboratorio.	Nitratos y nitritos Sulfito sódico Bifenilo

(Morales, 2005).

### 5.1.1 Antimicrobianos Sintéticos

En la actualidad la adición de compuestos químicos comerciales con efecto antimicrobiano en la industria alimentaria, es con la finalidad de alargar le vida útil de los alimentos ante el deterioro biológico indeseable.

El empleo de conservadores químicos es una práctica muy antigua pero, sin embargo, los alimentos conservados con ellos no son imperecederos, tan sólo se mantienen inalterados por un período de tiempo limitado, ya que el crecimiento de los microorganismos se ve retardado pero no inhibido totalmente. El grado de inhibición final va a depender del tipo de sustancia y de la concentración como lo demuestra el cuadro 2, (Catalina 2002 ).

**Cuadro No. 2.-** Conservadores químicos GRAS (generalmente reconocidos como seguros).

<b>Conservadores</b>	<b>Tolerancia máxima (ppm)</b>	<b>Organismos afectados</b>	<b>Alimentos</b>
<b>Ácido propiónico/ Propionatos</b>	300	Mohos	Productos de panadería y algunos quesos
<b>Ácido sórbico/ Sorbatos</b>	2000	Mohos	Quesos, jarabes, aderezos y gelatinas.
<b>Ácido benzoico/ Benzoatos</b>	1000	Levaduras y mohos	Jugo de frutas, sidra de manzana y jugo de tomate.
<b>Sulfitos</b>	500	Insectos y microorganismos	Melazas y frutas secas
<b>Oxido de etileno y propileno</b>	700	Levaduras, mohos y parásitos	Espicias y frutas
<b>Nisina</b>	10000	Bacterias lácticas y clostridios	Lácteos, Carnes, cerveza y enlatados
<b>Nitrito sódico</b>	120	Clostridios	Carnes curadas

(González, 2005)

Los conservadores son sustancias que, en algunos casos, se consideran fundamentales y que difícilmente pueden ser substituidos, como por ejemplo de los nitratos y nitritos. Se trata de sales que se añaden a los productos crudos curados, como jamones, embutidos, entre otros. Su empleo es muy importante, puesto que impide, entre otros, la formación de toxina botulínica. Además, se describe como eficaz para limitar el crecimiento de patógenos en los productos. En estos casos se regula su empleo y se limitan las concentraciones máximas admisibles.

Estas generalmente son de utilidad por la rentabilidad económica que les resulta comercializar productos con un periodo de vida mas prolongada. Pero se sabe que así como los agentes sintéticos existen también otros de origen naturales que presentan la misma actividad y que se desconoce aun (Welti et. Al., 1997). En la actualidad el uso de los conservadores sintéticos causaron polémica, ya que se han señalado innumerables peligros y efectos nocivos que generan si se consumen con frecuencia con los alimentos. Se admite que algunos aditivos provocan alergias, también es cierto que algunos no deben ser ingeridos por personas con ciertas alteraciones orgánicas ó con intolerancias de origen alimentario (Lück, 1981).

Por este motivo, el uso de conservadores debe ser cuidadosamente examinado de manera que los productos inocuos, fisiológica y toxicológicamente, se pueden emplear remarcando que, su uso no mejora la calidad de un producto que esté alterado o contaminado, además los aditivos conservadores han de ser empleados sólo cuando no haya otro proceso tecnológico que haga innecesario su empleo (Catalina, 2002).

Desde 1958, la FDA y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos vigilan el uso de las substancias no permitidas en la adición de los alimentos así también las GRAS (generalmente reconocidos como seguros). Si la nueva evidencia sugiere que una sustancia, GRAS u otra previamente sancionadas puede ser insegura, las autoridades federales prohíben su uso ó exige estudios adicionales para determinar su nivel de seguridad (Anónimo<sup>1</sup>, 2001).

### 5.1.2 Antimicrobianos naturales

Existen diversos compuestos antimicrobianos que se obtienen por síntesis, también se pueden encontrar en diversos alimentos, plantas y animales, así mismo producidas por microorganismos, con la misma función cuadro 3.

**Cuadro No. 3.-** Tipos de antimicrobianos naturales de uso en alimentos.

Fuente	Sistema	Aplicaciones
<b>Microbiana</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bacteriocinas</li> </ul>	- Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> y de patógenos en alimentos en general
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos orgánicos</li> <li>• Antibióticos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibición de mohos y levaduras.</li> <li>- Diversos efectos dependiendo del tipo de antibiótico y tipo de microorganismo.</li> </ul>
<b>Animal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lisozima</li> <li>• Lactoferrina</li> <li>• Lactoperoxidasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibición de bacterias en queso.</li> <li>- Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> en leche.</li> <li>- Preservación de leche sin procesar.</li> <li>- Preservación de queso cottage.</li> <li>- Inhibición de <i>Salmonella</i> en formulas lácteas infantiles.</li> <li>- Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> in vitro y quesos frescos.</li> <li>- Inhibición de <i>Campylobacter</i> in vitro.</li> </ul>
<b>Vegetales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aceites esenciales</li> <li>• Puré de plátano</li> <li>• Extracto de ajo</li> <li>• Aceitunas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudios de actividad.</li> <li>- Inhibición de bacterias formadoras de esporas.</li> <li>- Inhibición de <i>Candida albicans</i>.</li> <li>- Inhibición de la germinación de esporas de <i>Bacillus cereus</i>.</li> </ul>

(Morales, 2005).

Se ha encontrado que las plantas, hierbas y especias, así como sus aceites esenciales, contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras (Wilkins et. Al.,1989), reportando mas de 1340 plantas como potenciales fuentes de antimicrobianos que se encuentra generalmente en el aceite esencial obtenida a partir de las diferentes partes de estas.

Los compuestos que poseen pueden ser letales para las células microbianas o únicamente como inhibidores de la producción de metabolitos, ya que están conformados por fenoles, terpenos, alcoholes, alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos, e isoflavonoides.

Los componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que esta puede verse afectada por variables como genotipo de las plantas, método de extracción, la geografía condiciones ambientales y agronómicas ( Smit et. Al., 1999).

El timol y carvacrol contenidos en el extracto del orégano tienen un efecto favorable en la inhibición de crecimiento de los mohos, en presencia de otros componentes no fenólicos, ya que se han realizado numerosas investigaciones acerca del poder de los antimicrobianos de especias y sus aceites esenciales (Hefnowy et. al.,1993).

La FDA (Foods and Drug Administration) considera a los agentes antimicrobianos, como sustancias tipo GRAS presentadas en el cuadro 4, productos vegetales de los que se obtiene aceite esenciales, oleoresinas y extractos naturales, incluyendo a sus destilados, para su uso como agentes antimicrobianos.

**Cuadro No. 4.-** Especies, aromatizantes y saborizantes naturales considerados GRAS (generalmente reconocidos como seguros).

Ajo	Canela	Jengibre	Pimienta de Cayena
Ajonjolí	Cardamomo	Manzanilla	Pimienta de Jamaica
Albahaca	Cebolla	Mejorana	Pimiento
Alcaparra	Cilantro	Menta inglesa.	Rábano
Alfalfa	Clavo	Mostaza	Romero
Angélica	Comino.	Nuez moscada	Tilo
Anís	Cúrcuma	<b>Orégano</b>	Vainilla
Apio	Geranio	Perejil	
Azafrán	Gliciriza	Pimentón	
Caléndula	Hinojo	Pimienta	

De interés encontramos el orégano (Cuadro 4) ya que la FDA lo clasifica como un productos seguros. En estudios realizados demuestran que el aceite esencial presentan altas concentraciones de timol: valores que van de 0.7 - 40.2% y de carvacrol entre 15.2 – 41.2 % . El campo de estos aceites es muy amplio ya que son agentes antifecciosos, antivirales, antimicóticos, antiparasitarios, antisépticos, antiinflamatorios anticoagulantes, antialérgicos, neurotónicos, endocrinoreguladores e inmunoestimuladores ( Silva 2003 ).

Los principios activos que poseen los aceites esenciales con la actividad antimicrobiana antes mencionados; son compuestos fenólicos, resaltando los de mayor importancia como el timol, el eugenol y el metil chavicol presentada en el cuadro 5 (Katayama y Nagai, 1996 ).

**Cuadro 5.- Sustancias provenientes de plantas con actividad antimicrobiana.**

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

( Morales, 2005).

## **5.2 Generalidades del orégano**

En la República Mexicana aproximadamente 40 especies de plantas herbáceas pertenecientes a cuatro familias botánicas se le conocen con el nombre de orégano. Hablando de la última especie de orégano, el orégano mexicano, la mayor parte es obtenido en forma silvestre, que en su mayoría crece en zonas semiáridas del norte de México (Durango, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, San Luis Potosí etc..) aunque hoy en día organizaciones gubernamentales mexicanas promueven su cultivo y es obtenido por productores.

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 (Huerta, 2005).

### 5.2.1 Características Botánicas

Las plantas de orégano mexicano se encuentran en estado silvestre (figura 1), en regiones áridas y semiáridas de, al menos, 24 estados de la república. Sus principales habitantes (plantas) 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 familias Labiatae, tres especies de la familia de Verbenácea, una especie de la familia Compositae, una especie de la familia Leguminoseae (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.



**Fig. No. 1.-** *Lippia berlandieri*.

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 tetraquenio con cada parte ovoidea y lisa, es seco y globoso (Huerta, 2005).

### 5.1.3 Clasificación taxonómica

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

**Cuadro No. 6.-** Taxonomía del orégano mexicano.

<b>Reino</b>	<b>Vegetal</b>
Categoría	<i>Metaphyta</i>
División	<i>Tracheopyta</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>
Género	<i>Lippia</i>
Especie	<i>Berlandieri</i>

(Silva, 2003).

### 5.2.3 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 ms/nm, 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).

### 5.2.4 Usos y composición química del orégano

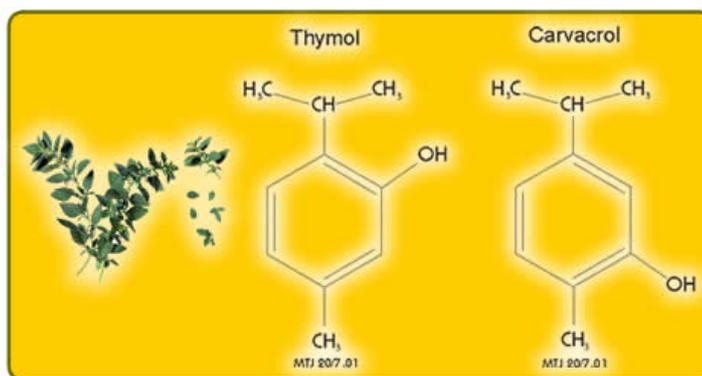
El orégano (*Lippia berlandieri*) tiene usos medicinales, culinarios y cosméticos. Es utilizado en forma fresca y seca en la cocina mediterránea y de América Latina.

Las especies de *Lippia* tiene usos tradicionales y farmacológicos tales como culinarios, analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, sedantes, 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, r-cimeno, canfor, linalol, a-pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo (Cuadro 7).

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. La Figura 1 presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano. (Rastrelli, 1998).



**Figura No. 2.-** Estructura química del timol y carvacrol.

**Cuadro No.7.-** Componentes químicos del orégano que determinan su calidad comercial. Análisis comparativo con dos especies extranjeras.

<b>Componentes</b>	<b>Orégano mexicano <i>Lippia berlandieri</i></b>	<b>Orégano griego <i>Origanum vulgare, subsp. Hirtum</i></b>	<b>Orégano turco <i>Origanum vulgare Subsp. gracite</i></b>
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).

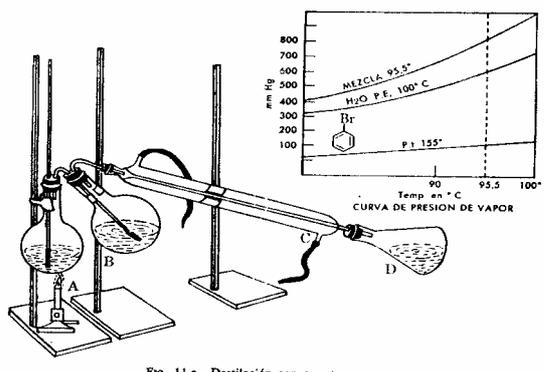
### 5.2.5 Método de extracción

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 de la ruta 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 3) 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% (Mc Gimpsey, 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 t-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%).



**Figura No. 3.-** sistema de arrastre por vapor convencional.

### 5.2.6 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*. 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 procesados. En algunos estudios de especias se han aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos.

**Cuadro No 8.-** Actividades biológicas de orégano.

<b>Actividad</b>	<b>Genero</b>
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).

### **5.2.7 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 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.

En la actualidad, se calcula que la producción anual de orégano en México es de 4,000 toneladas. 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 especie. 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 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).

## **5.2 La carne de cerdo**

La carne de cerdo proviene del animal de la familia *Suida*, (Desrosier 1997). La domesticación para la alimentación data desde cerca del año 7000 A.C. en el Medio Oriente, sin embargo, existen evidencia de que el hombre de la Edad de Piedra comía carne de jabalí, el antepasado de los cerdos de hoy, y la receta de cocina, para carne de cerdo, más antigua que se ha preservado hasta la actualidad proviene de la China y tiene por lo menos 2,000 años de existencia (Anonimo<sup>2</sup>, 2003).

### **5.3.1 Producción y consumo**

La carne de cerdo es la más versátil, ya que aparecen en muchas formas como: carne fresca, curada, enlatada y en una gran variedad de subproductos. La parte magra del cerdo es buena fuente de proteínas de alta calidad, fósforo y hierro, (Desrosier, 1997). En la dieta humana es esencial el consumo de las carnes, esto por su alto valor proteico ( a.a. esenciales que componen la proteína) para la formación y reparación de tejido, principalmente en la adolescencia hasta la etapa adulta, (Mórales 2005).

Según las estimaciones de la FAO, la producción mundial de la carne de cerdo aumentó en 2004 en un 2,4 por ciento, a poco más de 100 millones de toneladas, sostenida por el alza de sus precios y el retroceso de los precios de los piensos en la última parte del año.

Aunque los países en desarrollo representaron más del 60 por ciento de la producción mundial de carne de cerdo en 2004, un 53 por ciento más que hace un decenio, se estima que el consumo anual por habitante se mantendrá en un nivel bajo de 12,3 kg comparado con una media de 30 kg de los países desarrollados (Cuadro 9), (Rome, 2004 ).

**Cuadro No. 9.-** Estadística mundial sobre la carne de cerdo.

	<b>2003</b>	<b>2004 Estim.</b>	<b>2005 prelim.</b>
	(millones de toneladas)		
<b>PRODUCCIÓN</b>	<b>253,1</b>	<b>257,9</b>	<b>264,3</b>
Carne de ave	76,0	77,2	79,9
Carne de cerdo	98,6	100,9	103,6
Carne bovina	61,4	62,2	63,0
Carne ovina y caprina	12,3	12,6	12,9
Otras carnes	4,9	5,0	5,0
<b>EXPORTACIONES</b>	<b>19,5</b>	<b>19,1</b>	<b>19,7</b>
Carne de ave	8,2	7,9	8,2
Carne de cerdo	4,3	4,5	4,6
Carne bovina	6,1	5,7	6,0
Carne ovina y caprina	0,7	0,7	0,8
Otras carnes	0,3	0,3	0,3
	(kg/per capita)		
<b>CONSUMO PER CAPITA</b>	<b>40,3</b>	<b>40,6</b>	<b>41,6</b>
Carne de ave	12,1	12,1	12,6
Carne de cerdo	15,7	15,9	16,3
Carne bovina	9,8	9,8	9,9
Carne ovina y caprina	1,9	2,0	2,0
Otras carnes	0,8	0,8	0,8

(Rome, 2004 ).

Las exportaciones y consumo per cápita, Incluyen la carne fresca, refrigerada, congelada preparada enlatada, equivalente del peso en canal; excluye los animales vivos, las menudencias y el comercio.

### 5.3.2 Microbiología de la carne de cerdo

Después del sacrificio y evisceración del animal, la carne conserva las características microbianas que posee antes del sacrificio. La superficie del animal está contaminada por microorganismos procedentes del agua, suelo, aire, etc; mientras que el músculo esquelético normalmente carece de microorganismos. En el intestino, sin embargo, existe un número extraordinariamente grande de microorganismos y es de esperar que alguno de ellos alcance la superficie a tratar.

Por otra parte algunos animales aparentemente sanos, pueden albergar ciertos microorganismos en el vaso, hígado, riñones, etc, l que pueden llegar al músculo por el sistema circulatorio. El destino de los microorganismos depende de diversos factores ambientales, como su capacidad de utilizar a bajas temperaturas el sustrato carne, rico en proteínas y pobre en hidratos de carbono. Además la elevada tensión de oxígeno y gran humedad existentes en la superficie de la carne que imponen condiciones para que se desarrollen determinados microorganismos. Por estas razones los géneros *Pseudomonas* y *Achromobacter* son los que comúnmente se encuentran en la carne.

La mayoría de las bacterias, incluyendo las perjudiciales para la carne, poseen necesidades nutritivas. La carne constituye una fuente rica en la variedad de nutrientes, y por lo tanto un excelente medio de cultivo para el desarrollo para una gran cantidad de bacterias, entre ellas en la carne de cerdo algunos patógenos, como: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocitógenes*, (Anonimo<sup>2</sup>, 2003).

El primer indicio que se percibe en la carne fresca cuando existe alteración, es la presencia de olores desagradables, perceptibles a concentraciones de  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> de microorganismos seguido de la alteración del pH, producción de amoniaco, aminos, así como el aumento de la ufc y la aparición de mucílago en la parte de la superficie de la carne (Mossel, 1985).

## 5.4 Factores que favorecen el desarrollo microbiano

### 5.4.1 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 porque es más fácil su difusión a través de la membrana celular en su forma no dissociada (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 et. al., 1997).

### 5.4.2 La 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 y suelo (Adams et. al., 1997).

### 5.4.3 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 et. al., 1997).

### 5.4.4 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).

#### **5.4.5 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 oxidación-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, por lo menos en parte de la riqueza de los factores de crecimiento indispensable (Jay, 1973).

### **5.5 Patógenos presentes en la carne de cerdo**

#### **5.5.1 *Escherichia coli***

Este organismo patógeno es un bacilo corto flagelado con movimiento, Gram. negativo, catalasa-positivo, oxidasa-negativo anaerobio facultativo, no esporógeno (cuadro 10),. Patógeno relacionado con enfermedades transmitidas por alimento cuatro tipos principales dentro de las cuales se encuentra *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), la enterohemorrágica presenta un rango óptimo de crecimiento un poco menor que las demás especies, siendo esta la más dañina. Bacteria de fácil crecimiento y se encuentra distribuida en los animales, así como en vegetales y el agua.

**Cuadro No. 10.-** Características de *Escherichia coli*.

<b>Reino</b>	Procariotae
<b>Orden</b>	Eubacteriales
<b>Familia</b>	Enterobacrobacteriaceae
<b>Genero</b>	Escherichia

Generalmente este microorganismo lo podemos encontrar en la flora normal del hombre como de la mayoría de los alimentos, por eso es considerado “germen indicador de contaminación fecal” al encontrarse, ya sea en el agua, alimentos o en el aire. Las condiciones que requiere este microorganismo son temperaturas de 7 – 10 °C; con una temperatura óptima de 37 °C, un pH de 4.4 – 9; con una óptima de 6.7 con una actividad mínima de agua de 0.95 y óptima de 0.995 (I.C.M.S.F., 1996).

### 5.5.2 *Staphylococcus aureus*

Microorganismo, Gram.- positivo y catalasa-positivo, oxidasa negativa, y anaerobios facultativo (Cuadro 11). La forma de cocos tiende a ser de tamaño mucho más uniforme que los otros tipos morfológicos de Bacterias tienen un diámetro aproximado de 1 μm típicamente son casi perfectos en su forma esférica. bacterias no motiles, no forman esporas, pilis ni flagelos, no parecen tener cápsulas excepto en el caso de variedades mucoides raras son aerobios y anaerobios (Lucero 1997).

**Cuadro No. 11.-** Características de *Staphylococcus aureus*.

<b>Reino</b>	Procariotae
<b>Orden</b>	Micrococcales
<b>Familia</b>	Micrococcaceae
<b>Genero</b>	<i>Staphylococcus</i> ó <i>Micrococcus</i>

Este microorganismo tiene la capacidad para fermentar la glucosa se puede utilizar para diferenciarlos del género micrococcus que es estrictamente respiratorio, microorganismo oportunista omnipresente, encontrándose en la mucosa y en la piel de la mayoría de los animales de sangre caliente. Tiene una multiplicación eficiente en aerobiosis, tolerante a bajas concentraciones de actividad de agua.

Los síntomas predominantes son vómito, dolor de estomago, deshidratación y en algunos casos postración, la intoxicación estafilococcica tiene un período de curación de 1 a 2 días.

Las condicione que requiere este microorganismo para su metabolismo es una temperatura de 6-46 °C, con una optima de 37°C, un pH de 4-9.8; con el optimo de 6-7, Na Cl de 6-7 %; con el optimo de 0 %, actividad de agua de 0.83 -> 0.99; optimo de 0.99 ( Bourgeois et. al., 1995).

## CAPÍTULO VI

### METODOLOGÍA

La metodología utilizada en el presente trabajo fue realizada mediante la estructuración de dos etapas, con la finalidad de obtener resultados preliminares en la primera y posteriormente aplicarlo en la segunda, utilizando condiciones optimas de laboratorio para la experimentación realizada como a continuación se desarrolla.

#### 6.1 ETAPA 1. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra mesófilos aerobios

##### 6.1.1 Obtención del aceite esencial de orégano

El aceite esencial de orégano utilizado, se compone de cinco 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, cinco fracciones, con diferentes concentraciones de timol y carvacrol (Cuadro No. 12), el cual fue proporcionado por el Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENA) ubicado en Salaices, Chihuahua.

**Cuadro No. 12.-** Composición de las fracciones de timol-carvacrol .

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

### **6.1.2 Valoración de la actividad antimicrobiana**

A fin de evaluar la capacidad inhibitoria de las cinco fracciones de aceite esencial obtenidas, se procedió a la aplicación en carne fresca para su posterior almacenamiento bajo condiciones de ambiente y de refrigeración. La evaluación se dio en función al tiempo de desarrollo microbiano siguiendo los procedimientos que a continuación se describen:

#### **6.1.2.1 Preparación de las muestras de carne y conteo de mesófilos aerobios**

Se evaluaron muestras de carne de cerdo, 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 0.05, 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 de 0, 24, 72 y 120 hrs de almacenamiento. El método utilizado para la cuenta total de mesófilos fue el propuesto por la AOAC 1993.

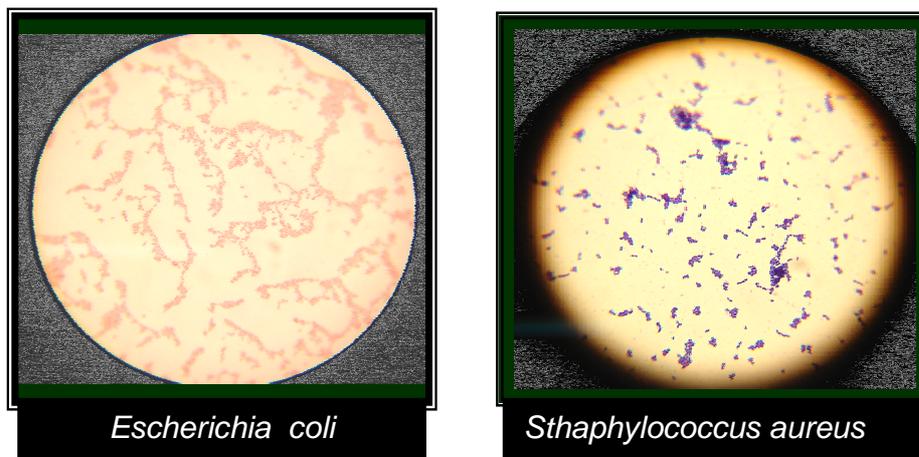
Los resultados arrojados del conteo de mesófilos aerobios fueron analizados estadísticamente a través de un análisis de varianza y de t- student a fin de establecer tanto la fracción como la concentración a la cual se presenta la mayor inhibición del desarrollo microbiano.

## 6.2 ETAPA 2. Evaluación de la actividad antimicrobiana en patógenos

### 6.2.1 Viabilización de cepas patógenas

Las cepas empleadas fueron cultivos puros, con los que se trabajaron en investigaciones anteriores en la misma Universidad, dichas cepas fueron proporcionados por el laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Las cepas de *E. Coli* y *Sthapylococcus aureus*. se viabilizaron mediante caldos de enriquecimiento (TSB), posteriormente fueron incubadas a 35° C durante 24 hrs. para después sembrarse en agar selectivos, Mac CONKEY-agar para *Escherichia coli* y CHAPMAN-Agar para *Sthapylococcus aureus*. Posteriormente se llevó a cabo un estudio de su morfología colonial macroscópica y se tomó muestra para frotis y observación microscópica, mediante tinción de gram presentada en la figura 4.



**Figura No. 4.-** Muestras de tinción de gram de patógenos inoculadas.

### **6.2.2 Inoculación de la carne con *E. coli*, y *S. aureus***

Una vez determinado la fracción del aceite esencial; con la mayor actividad antimicrobiana se continua con la inoculación de las cepas patógenas, sobre las muestras de carne de cerdo por duplicado, siendo el inóculo promedio de  $6 \times 10^2$  ufc/ml, previamente adicionadas con la fracciones 3 y 4 a concentraciones de 0.10, 0.15 y 20 % cada una, almacenándose en refrigeración ( $4^{\circ}$  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*, y a *Staphylococcus aureus*.

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 VII**

### **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

#### **7.1 ETAPA 1 Evaluación de la actividad antimicrobiana.**

##### **7.1.1 Determinación de la fracción timol carvacrol con mejor actividad antimicrobiana en carne del cerdo**

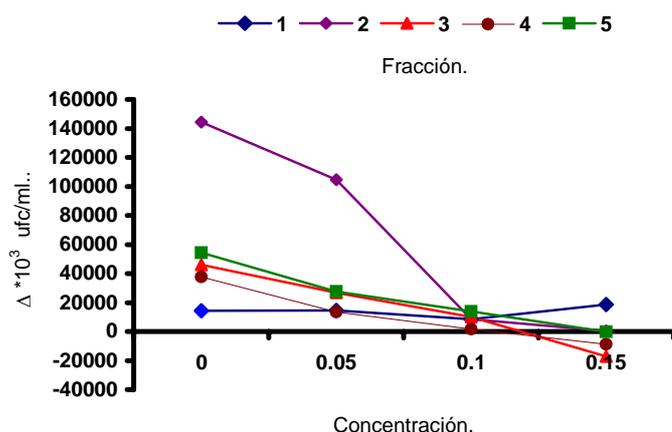
Se aplicaron las cinco fracciones del aceite esencial, conteniendo diferentes proporciones timol-carvacrol en la carne de cerdo a fin de probar su actividad antimicrobiana contra mesófilos aerobios contaminantes de la misma carne. Los resultados obtenidos en la cuenta de mesófilos aerobios bajo condiciones de refrigeración muestran; el cambio en el conteo inicial, tomado al conteo en el tiempo cero, como punto de partida mostrado en el Cuadro 13 donde es posible observar los incrementos y decrementos en el conteo 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 ( $p \leq 0.05\%$ ).

##### **7.1.2 Determinación de la fracción y concentración del aceite esencial con mejor actividad antimicrobiana en la carne en condiciones de refrigeración.**

A fin de determinar la óptima fracción y concentración del aceite esencial de orégano que produzca la mayor inhibición del crecimiento poblacional de flora aerobia contaminante en carnes de cerdo, bajo condiciones de refrigeración, se procedió a calcular el cambio en función a dicho parámetro, el cual es presentado en la tabla 13 como el ANOVA de las medias del  $\Delta$  de crecimiento microbiano  $\times 10^3$  ( $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro No. 13** .- Medias del  $\Delta$  del crecimiento microbiano  $\cdot 10^3$  ufc/ml bajo condiciones de refrigeración.

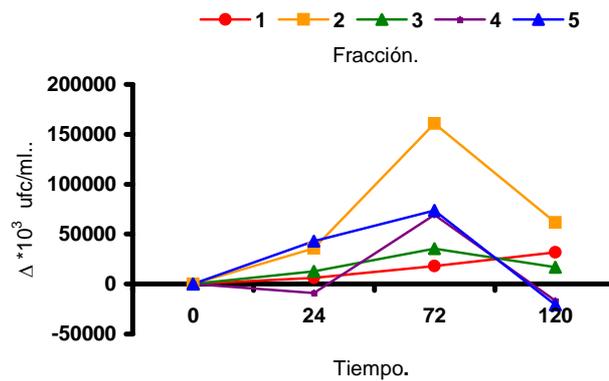
Fracción	Concentración %	Tiempo ( hrs).			
		0	24	72	120
1	0.00	0.0	3.35	8.95	45.05
1	0.05	0.0	21.30	12.45	24.65
1	0.10	0.0	-3.95	15.95	22.35
1	0.15	0.0	4.55	35.15	34.85
2	0.00	0.0	106.50	382.60	88.60
2	0.05	0.0	64.35	279.05	75.10
2	0.10	0.0	-6.40	-12.20	52.60
2	0.15	0.0	-21.60	-6.50	30.10
3	0.00	0.0	30.50	105.60	47.60
3	0.05	0.0	35.10	18.95	52.60
3	0.10	0.0	12.80	31.30	-4.20
3	0.15	0.0	-26.60	-13.80	-28.20
4	0.00	0.0	12.10	138.90	-0.70
4	0.05	0.0	-1.65	70.20	-14.40
4	0.10	0.0	-17.55	47.85	-23.80
4	0.15	0.0	-28.20	20.65	-27.50
5	0.00	0.0	123.55	107.05	-130.00
5	0.05	0.0	42.05	86.95	-18.90
5	0.10	0.0	15.80	63.00	-22.90
5	0.15	0.0	-9.75	37.85	-33.60



**Fig. 5** Crecimiento microbiano de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 en función concentración (0.0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) aplicadas.

En base al estudio del efecto de la fracción por concentración se puede observar que las muestras tratadas con la fracción uno no presentaron diferencias entre sí a las diferentes concentraciones de 0.0, 0.05, 0.15, presentando niveles estadísticamente menores para el tratamiento al 10%.

Por otro lado para las fracciones restantes se puede apreciar que a mayor concentración el crecimiento microbiano es menor, teniendo que para los conteos para las muestras al 0.00% son siempre superiores al resto de los tratamientos y que las muestras adicionadas al 15% son en las que se observa un menor conteo de flora aerobia teniendo que para las fracciones tres, cuatro y cinco, los niveles de u.f.c. detectados son negativos, lo que indica que la carga microbiana decreció a niveles por debajo de las iniciales y que es la fracción tres la que presenta la máxima inhibición de acuerdo a los resultados arrojados por el análisis de varianza realizado ( $p \leq 0.05$ ), seguida de la fracción cuatro que es similar a esta y posteriormente por la cinco que es similar a la cuatro, pero mayor que la tres.



**Fig. 6** Crecimiento microbiano de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 en función al tiempo (0, 24, 72, y 120 hrs) de almacenamiento.

La figura 6 muestra el efecto inhibitorio de cada una de las fracciones aplicadas a las carnes en función al tiempo. Donde es posible observar que la muestra con la fracción dos es la que tiene el mayor incremento en el conteo de la flora aerobia a las 72 hrs., siendo este un dato estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ) así mismo los tiempos de 24 y 120 hrs. presentan cuentas microbianas estadísticamente más elevadas que los respectivos correspondientes a las demás fracciones, por tanto es posible citar que esta fracción es la que resulta de menor utilidad para los fines pretendidos.

En contraste se encuentra la fracción 4 en donde es posible apreciar que los niveles alcanzados las 24 hrs. de contacto son menores que el conteo inicial, sin tener significancia estadística, así como a las 120 hrs. donde los niveles alcanzados son inferiores al conteo en el tiempo 0, presentando significancia ( $p \leq 0.05$ ) a los observados por las muestras tratadas con las fracciones restantes ( $p \leq 0.05$ ), salvo la fracción 1, la cual a dicho tiempo es estadísticamente inferior, presentando un incremento continuo desde el tiempo 0 hasta las 120 hrs., en contraste con la fracción en cuestión la cual continua en decremento a las 120 hrs., superando únicamente por las fracciones cuatro y cinco, anteriormente analizadas que presenta el mínimo conteo de todos los tratamientos a este tiempo, pero que muestra elevados conteos a las 24 y 72 hrs. de tratamiento.

En función a lo anterior es posible citar a la fracción tres y cuatro como las óptimas ya que no solamente disminuyen significativamente el conteo microbiano sino también lo hacen de una manera uniforme.

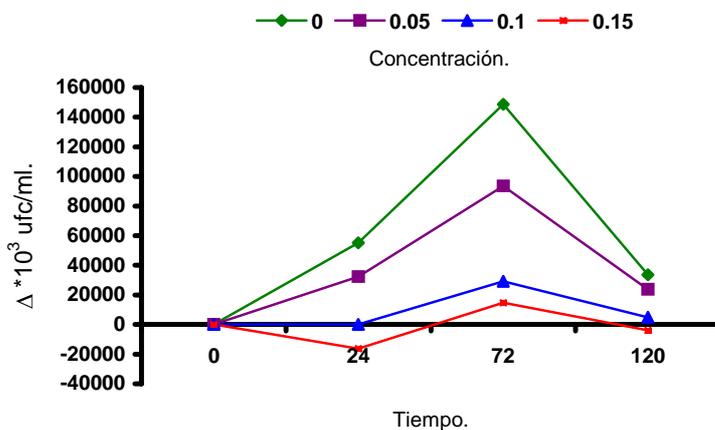


Fig. 7 Crecimiento microbiano de las concentraciones (0.0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) en función al tiempo (0, 24, 72, y 120 hrs) de almacenamiento.

En la figura 7 es posible apreciar el efecto ejercido por la concentración sobre el conteo microbiano en función al tiempo, donde muestra que el testigo tuvo un incremento continuo en el conteo microbiano para luego tener un decaimiento en a las 120 hrs. teniendo que el valor obtenido es estadísticamente mayor al tiempo 0, para la concentración de 0.05% Se muestra un comportamiento similar al de la muestra testigo, pero con conteos microbianos estadísticamente inferiores a los observados en el testigo.

Por otro lado sobresalen los conteos obtenidos con las concentraciones de 0.10 y 0.15%, los cuales al ser analizados estadísticamente no presentan diferencia entre si desde el tiempo 0, hasta las 120 hrs. salvo el tratado al 0.15% el cual es estadísticamente inferior al nivel presentado en el tiempo cero.

### **7.1.3 Determinación de la fracción y concentración del aceite esencial con mejor actividad antimicrobiana en la carne en condiciones de ambiente.**

Con el fin de obtener la fracción y concentración óptima de aceite esencial de orégano que alcance una mayor actividad inhibitoria en el crecimiento poblacional de flora aerobia contaminante en la carne de cerdo, bajo condiciones de ambiente, se procedió a calcular el cambio de la flora contaminante en función a dicho parámetro, el cual es presentado en el cuadro 14 como el ANOVA de las medias del  $\Delta$  de crecimiento microbiano  $\cdot 10^4$  ( $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 14** .- Medias del log 10 del  $\Delta$  del crecimiento microbiano  $\cdot 10^4$  ufc/ml bajo condiciones ambientales.

Fracción	Concentración %	Tiempo( hrs)			
		0	24	72	120
1	0.00	0.00	5.67	5.71	5.81
1	0.05	0.00	5.41	5.12	5.56
1	0.10	0.00	5.33	5.40	5.59
1	0.15	0.00	4.98	5.37	5.28
2	0.00	0.00	7.79	9.79	9.23
2	0.05	0.00	7.77	9.57	9.14
2	0.10	0.00	7.75	9.53	9.18
2	0.15	0.00	7.78	9.46	9.23
3	0.00	0.00	7.79	9.25	9.75
3	0.05	0.00	7.63	9.23	9.07
3	0.10	0.00	7.51	9.34	9.07
3	0.15	0.00	7.58	9.01	9.27
4	0.00	0.00	6.77	6.82	8.36
4	0.05	0.00	6.45	6.41	8.21
4	0.10	0.00	6.42	6.09	8.22
4	0.15	0.00	6.17	5.96	8.00
5	0.00	0.0	6.38	6.48	8.51
5	0.05	0.00	6.25	6.20	8.25
5	0.10	0.00	6.22	6.03	7.84
5	0.15	0.00	5.80	5.88	7.74

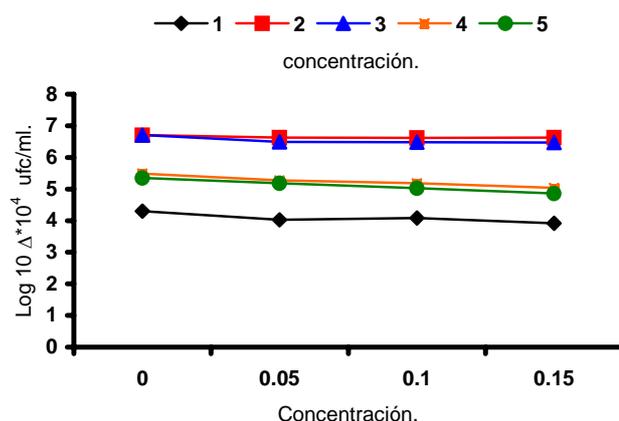


Fig. 8 Crecimiento microbiano de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 en función al concentración (0.0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) aplicada.

En la figura 8 se aprecia de acuerdo al análisis de la t-student que se presenta en anexos el efecto que ejerce cada una de las fracciones en función a la concentración aplicadas en las muestras de carne.

Las fracciones tres y dos respectivamente son estadísticamente similares, sin tener significancia para este caso por ser los que presentan los niveles mas altos en ufc aerobias contaminantes, con ligeras diferencias a la concentración de 0.05, 0.10, y 0.15 %. sin tener significancia para tal propósito. Por otro lado en las fracciones cuatro y cinco se aprecia estadísticamente similitud en el comportamiento en las diferentes concentraciones, con mínima diferencia estadística a la concentración de 0.10 y 0.15 % que demuestran constancia en la inhibición en las muestras aplicadas con aceite esencial y los mas bajos índices de crecimiento son inferiores a la cuenta a las concentraciones de 0.00 y 0.05 con significancia estadística ( $p \leq 0.05$ ), ya que como se observa los índices de la flora son inferiores a las fracciones antes mencionadas, siendo las fracciones mas favorable para este caso la fracción uno que presenta una los valores en ufc mas bajos, en concentraciones de 0.15 % inferiores al resto de las concentraciones, presentando una significancia estadística de ( $p \leq 0.05$ ), se puede especificar por lo anterior que la fracción optima para condiciones de ambiente la fracción uno a la concentración de 15% es la mas adecuada para este fin de acuerdo al análisis estadístico a que fueron sometidos los datos.

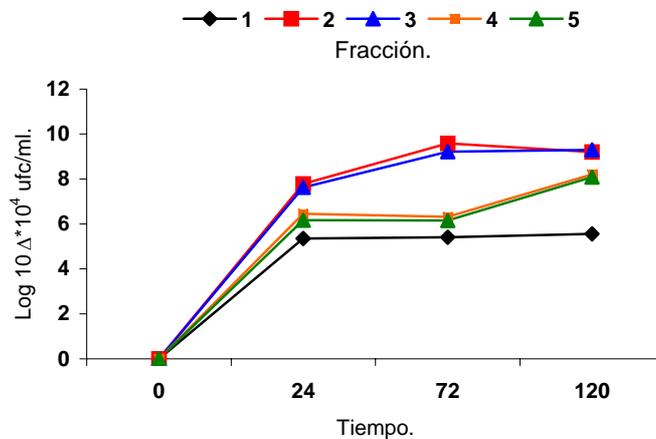


Fig. 9 Grafica de crecimiento microbiano de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 en función al tiempo (0, 24, 72, y 120 hrs) de almacenamiento.

En la figura 9 es posible apreciar que las fracciones dos y tres presentan un comportamiento similar en cuanto al conteo de flora aerobia, teniendo que los máximos se presentan a las 72 hrs. de contacto con la fracción dos seguido por las 120 hr. 120 hrs. con la fracción 3.

Las fracciones 4 y 5 presentan conteos similares entre si ( $p \leq 0.05$ ), observándose un marcado incremento a las 24 hrs. seguido por las 72 hrs. de contacto donde el incremento no es significativo para la fracción 5, alcanzar su máximo a las 120 hrs. en donde se alcanza el máximo nivel pero este es estadísticamente menor que los alcanzados por las fracciones dos y tres.

En contraste, la fracción uno representa niveles mas bajos de todos los tratamientos aun a las 72 y 120 hrs. de contacto.

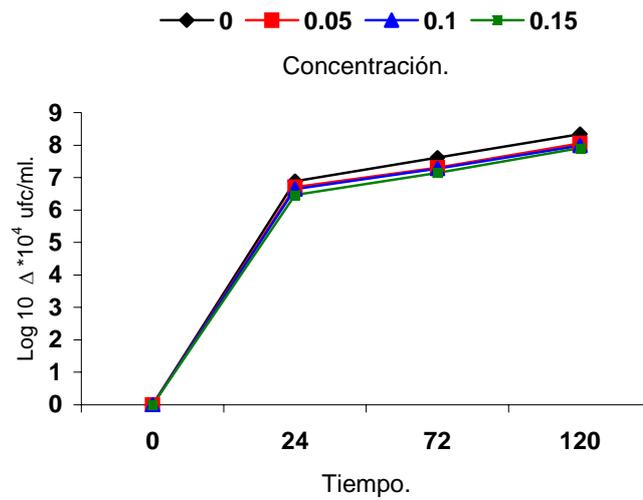


Fig. 10 Crecimiento microbiano de las concentraciones (0.0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) en función al tiempo (0, 24, 72, y 120 hrs) de almacenamiento.

En la figura 10 se presenta el efecto de la concentración en función al tiempo observándose una relación directamente proporcional en los incrementos de la cuenta de mesófilos aerobios con respecto al tiempo e inversamente proporcional con respecto a la concentración del inhibidor, teniendo así que al 0.15% se obtienen los menores conteos, para todos los tiempos en cuestión ( $p \leq 0.05$ ). como lo muestran las tablas del análisis de t-student que se expone en la sección de anexos.

## **7.2 Etapa 2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a las bacterias patógenas**

### **7.2.1 Determinación de la concentración óptima del aceite esencial con mejor actividad antimicrobiana ante *Escherichia coli* en la carne de cerdo en condiciones de refrigeración**

Con la finalidad de probar el efecto inhibitorio ejercido por las fracciones 3 y 4, detectadas como mejores en el estudio anterior, se procedió a valorar el efecto ejercido por las mismas a diferentes concentraciones sobre carnes de cerdo inoculadas con una cepa de *E. coli* manteniendo las muestras en condiciones de refrigeración (4°C), a fin de realizar el conteo de la flora contaminante en función al tiempo en medios selectivos para dicho fin, reportando los resultados como las medias del  $\Delta$  de crecimiento microbiano  $\times 10^4$  ( $p \leq 0.05$ ), presentadas en el cuadro 15.

**Cuadro No.15.-** Medias de  $\Delta$  del crecimiento microbiano de *Escherichia coli*.

Sobre carnes de cerdo con y sin adición de antimicrobiano natural

Fracción.	Concentración.	Tiempo.	Mo. de UFC	Mo. De $\Delta$
3	0.00	0	231000	-0.00
3	0.00	24	252800	2.18
3	0.00	72	284750	5.37
3	0.00	120	314850	8.38
3	0.10	0	231000	0.00
3	0.10	24	151500	-7.95
3	0.10	72	120000	-11.10
3	0.10	120	402000	-2.80
3	0.15	0	231000	-0.00
3	0.15	24	47150	-18.38
3	0.15	72	166500	-6.45
3	0.15	120	111000	-12.00
3	0.20	0	231000	0.00
3	0.20	24	72000	-15.90
3	0.20	72	163500	-6.75
3	0.20	120	148500	-8.25
4	0.00	0	231000	0.00
4	0.00	24	252800	2.18
4	0.00	72	284750	5.37
4	0.00	120	314850	8.38
4	0.10	0	231000	0.00
4	0.10	24	137000	-9.40
4	0.10	72	223500	-2.10
4	0.10	120	149000	-8.20
4	0.15	0	231000	-0.00
4	0.15	24	85500	-14.55
4	0.15	72	132000	-9.90
4	0.15	120	111000	-12.00
4	0.20	0	231000	0.00
4	0.20	24	93000	-13.80
4	0.20	72	213000	-3.10
4	0.20	120	175500	-5.55

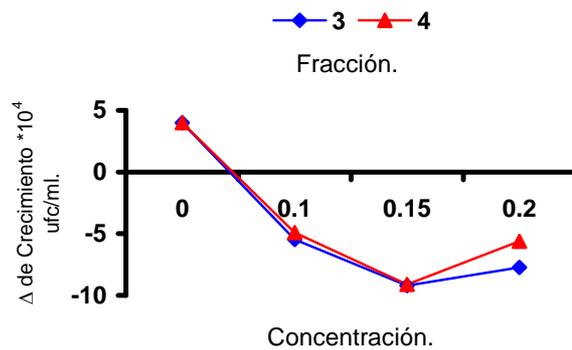


Fig. 11 Crecimiento de *Escherichia coli* en Función a las fracciones ( 3 y 4) y concentraciones (0.0, 0.10, 0.15 y 0.20 %).

Como se puede apreciar en la figura 11 y de acuerdo al análisis estadísticos t-student ( $p \leq 0.05$ ) realizado, es posible apreciar el decremento en el conteo de E.coli en función a la concentración aplicada, sin presentar diferencias significativas entre las fracciones en cuestión, sin ser así para las concentraciones, presentándose que el máximo nivel alcanzado, fue al aplicar la concentración de 0.15%, observándose que estos resultados son estadísticamente similares a los obtenidos al aplicar concentraciones de 0.20%, y el menor efecto inhibitorio fue el presentado por la concentración de 0.10%, el cual es también similar a lo presentado al 0.20%. Es posible citar también que los conteos presentados después del contacto con los inhibidores se encuentran por debajo de los niveles iniciales.

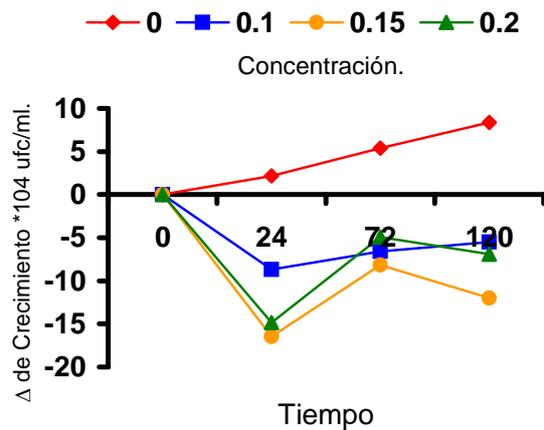


Fig. 12 Crecimiento de *E coli* en función a las concentraciones (0.0, 0.10, 0.15, 0.20) y tiempos.

En la figura 12 se aprecia que el mayor efecto inhibitorio se presenta con las concentraciones de 0.15 y 0.20% a las 24 hrs, estadísticamente superior ( $t - student p \leq 0.05$ ) al efecto alcanzado por las mismas concentraciones a las 72 y 120 hrs, y mayor también al efecto de la concentración de 0.10% en los tres tiempos referidos. Como era de esperarse, los mayores incrementos positivos en la población del microorganismo evaluado se presentan en los tres tiempos evaluados con una concentración del 0%, como lo muestra el cuadro respectivo que se localiza en la sección de anexos.

Los resultados obtenidos muestran lo contrario a la investigación realizada en la carne de res, que de acuerdo a los datos estadísticos, presenta una mínima susceptibilidad ante el patógeno a las diferentes concentraciones del aceite esencial.

### **7.2.2 Determinación de la concentración óptima del aceite esencial con mejor actividad antimicrobiana ante *Staphylococcus aureus* en la carne de cerdo en condiciones de refrigeración**

Con la finalidad de definir la concentración óptima de las fracciones 3 y 4 de aceite esencial de orégano que alcanzara mayor actividad inhibitoria en el crecimiento poblacional de flora patógena contaminante (*Staphylococcus aureus*) en la carne de cerdo, bajo condiciones de refrigeración, se procedió a la determinación de los cambios en la población de la flora contaminante patógena en función a dicho parámetro, el cual es presentado en el cuadro 16 como el resultado del ANOVA de las medias del  $\Delta$  de crecimiento microbiano  $\cdot 10^2$  ( $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro No. 16.-** Medias del  $\Delta$  del crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus* en carnes de cerdo con y sin adición de antimicrobianos.

Fracción.	Concentración.	Tiempo.	Mo. de UFC	Mo. de $\Delta$
3	0.00	0	4300	0.0000
3	0.00	24	7800	35.0000
3	0.00	72	16200	119.0000
3	0.00	120	24450	201.5000
3	0.10	0	4300	-0.0000
3	0.10	24	2300	-20.0000
3	0.10	72	2700	-16.0000
3	0.10	120	2600	-17.0000
3	0.15	0	4300	0.0000
3	0.15	24	650	-36.5000
3	0.15	72	2350	-19.5000
3	0.15	120	1950	-23.5000
3	0.20	0	4300	0.0000
3	0.20	24	1900	-24.0000
3	0.20	72	3600	-7.0000
3	0.20	120	2400	-19.0000
4	0.00	0	5000	-0.0000
4	0.00	24	9250	35.0000
4	0.00	72	18050	119.0000
4	0.00	120	25900	201.5000
4	0.10	0	4300	-0.0000
4	0.10	24	2150	-21.5000
4	0.10	72	4050	-2.5000
4	0.10	120	0	-43.0000
4	0.15	0	4300	0.0000
4	0.15	24	2050	-22.5000
4	0.15	72	3550	-7.5000
4	0.15	120	0	-43.0000
4	0.20	0	4300	0.0000
4	0.20	24	2550	-17.5000
4	0.20	72	5250	-0.5000
4	0.20	120	0	-42.9950

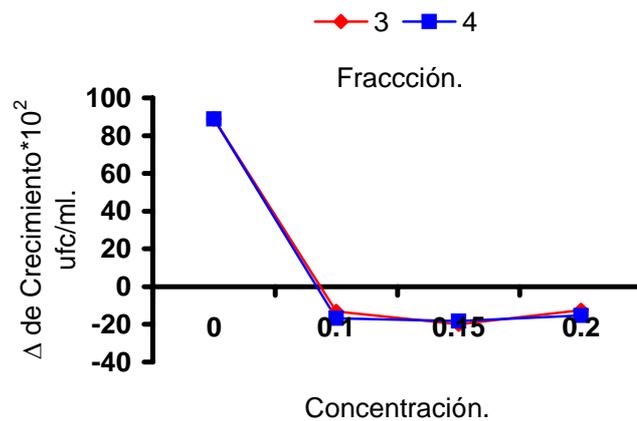


Fig. 13 Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en función a las fracciones ( 3 y 4) y concentraciones (0.0, 0.10, 0.15 y 0.20 %).

En la figura 13, se observa que el efecto del agente antimicrobiano aplicado en los tratamientos para ambas fracciones y para todas las concentraciones no presentan diferencia significativa entre sí ( $p \leq 0.05$ ), pero existe una gran diferencia significativa al compararse con los testigos ( $p \leq 0.05$ ), lo que dilucida la existencia de inhibición a concentraciones de 0.10, 0.15 y 0.20 % para ambas fracciones, representada por los bajos niveles de proliferación de la flora patógena interpretada como  $\Delta$  de crecimiento por  $10^2$  ufc/ml. Se determina entonces que, para las dos fracciones, el efecto inhibitor para el caso de *Staphylococcus* resulta positivo en los tratamientos probados en condiciones de refrigeración.

Cabe resaltar que en investigaciones ya realizadas para estos patógenos, los datos obtenidos resaltan un dato estadístico interesante, ya que, en comparación con el crecimiento de la flora patógena en la carne de cerdo donde existe disminución constante, en la carne de res se incrementa constantemente mostrando una actividad inhibitoria decreciente.

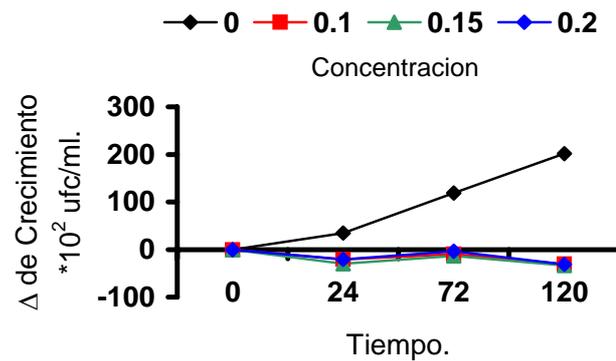


Fig. 14 Crecimiento *Staphylococcus aureus* en función a las concentraciones (0.0, 0.10, 0.15 y 0.20) y tiempos (0, 24, 72 y 120 hrs.).

La figura 14 presenta resultados de la inhibición del crecimiento de *St. aureus* en función a la concentración de inhibidor a través del tiempo. Se puede observar que la mejor inhibición se consiguió a las 120 horas en todas las concentraciones, sin que se presentara entre estas diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ). El siguiente mejor tiempo de inhibición fue el de 24 hrs, pero no presenta diferencias muy grandes ( $p \leq 0.05$ ) al contrastarlo con el de 72 hrs, y el estadístico con el que se evaluaron lo prueba. Para el tiempo 0hrs, donde no se presentó ni reducción ni aumento poblacional, no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) para las concentraciones entre si, pero la diferencia es estadísticamente marcada ( $p \leq 0.05$ ) con los demás tiempos de contacto. Para los testigos, el crecimiento poblacional fue directamente proporcional al tiempo en sentido positivo, presentando alta diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) contra todos los tratamientos.

Se aprecia que los cultivos de *St. aureus* tratados con antimicrobiano a las diferentes concentraciones (0.10, 0.15, 0.20%) demuestran un resultado muy positivo, demostrando inhibición de acuerdo a los  $\Delta$  crecimiento observados, evidenciando que *St. aureus* no es resistente ante las concentraciones empleadas.

Los resultados aquí obtenidos resultan contrastantes con lo respecto a los obtenidos en investigaciones con carne de res, donde no se encontraron diferencias significativas pues los niveles de UFC presentados en los tratamientos son superiores a los de los tiempos cero; y con la carne de cerdo llegaron a niveles muy inferiores a los de las cuentas iniciales.

## CAPITULO VIII

### CONCLUSIONES

Con el presente trabajo y las investigaciones previas a lo elaborado, se puede decir que el extracto vegetal extraída de la hoja del orégano (*Lippia berlandieri*) posee un poder antimicrobiano, ya que el comportamiento de la flora contaminante ( *Mesófilos aerobios* ) y patógena (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), que se obtuvieron muy buenos resultados, pero lo mas importante es que inhibe el crecimiento de patógenos, por lo cual podemos determinar que las fracciones optimas para este caso resultaron ser, la “ cuatro” como la mejor seguida de la “tres” respectivamente, ya que en la cuenta de mesófilos aerobios fueron las que resultaron optimas, a una concentración del 0.15%, seguida de la concentración de 0.10 %. Estos aplicados en la flora patógena de la carne de cerdo, ya mencionada con un aumento en uno de los tratamientos de a una concentración de 0.20%, de acuerdo a las recomendaciones realizadas en investigaciones anteriores, aplicado en la carne de res .

La dosis mínima inhibitoria optima resulto ser la concentración de 0.15 %, para las dos fracciones seguida de la concentración de 0.20%, y la fracción optima resulto ser la cuatro seguida de la tres, para la flora contaminante patógena, demostrado en los resultados obtenidos mediante el análisis estadísticos a que se sometieron los tratamientos de carne de cerdo, obteniendo resultados estadísticamente significativos para la investigación realizada. Por tal motivo se puede decir que el aceite esencial se encuentra dentro de un área de oportunidad, tanto por su uso tradicional como su uso en el área industrial, esto debido a la actitud que están tomando los consumidores en la adquisición de alimentos que contienen agentes antimicrobianos de origen natural. Por lo anterior se puede contemplar que las tendencias en la industria de alimentos se centra en técnicas que sean mas viables para la conservación de los alimentos y aceptado por los consumidores.

## CAPITULO IX

### CITAS BIBLIOGRAFICAS

**Anónimo<sup>1</sup>**: Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos Febrero 1993 Disponible e : <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/sfoodadd.html>

**Anonimo<sup>2</sup>**: Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture, febrero, 2003. Disponible en: [http://www.fsis.usda.gov/oa/pubs/pork\\_sp.htm](http://www.fsis.usda.gov/oa/pubs/pork_sp.htm)

**Bourgeois, C.M.** Mesclé, J.F. 1995 Microbiología Alimentaria. Vol. 1. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 253-260

**Bramen, A. L.** 1993. Introduction to use of antimicrobials. Capitulo I En antimicrobials in foods. 2º Edición. New York. Pp 1- 9

**CONABIO** .2005 (Comisión Nacional de Biodiversidad ) Orégano Mexicano: Oro Vegetal. 28 de Enero 2005. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/biodiversitas.hym>.

**Desroisier, W.N.** 1997. Elementos de Tecnología de alimentos. Décima Segunda Edición, Editorial CECOSA México, D.F. Pp. 332-334

**Ecfnowy , y A. Moustafa, S. I. Y Marth, E. H.** 1993. Sensitivity of *Listeria monocytógenes* to Selected Spices. J. Food. 56 (10): 876 – 878.

**González Paulino H.** Tesis como requisito para optar al Título de licenciatura, en ing. En Ciencia y Tecnología de Alimentos. Profesor guía: M.C. Maria Hernández González. Saltillo, Coahuila, México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 2005. 51 Pag.

**Holdsworth, S.** Conservación de Frutas y Hortalizas. 1988. 2º Edición. ACRIBIA España.

**Huerta, C.** 2005. Orégano Mexicano: Oro Vegetal. CONABIO. Disponible en: [http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio\\_espanol/doctos/indice15.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/indice15.html).

**ICMSF** 1996. Microbiología de los Alimentos. Características de los Microorganismos Patógenos. 1era Ed. Editorial Acribia. Zaragoza España Pp. 147-163 y 349-385.

**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.

**Jean A. y Frange R.,** 1990. La Ciencia de los Alimentos de la A - Z. Editorial Acribia., Zaragoza, España. Pag.71

**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.

**Lopez – Malo, Alzamora, S. y S. Gerrero.** 1995. Natural Antimicrobials From Plants.

**Lucero S. M. A.** Publicaciones. Monografías .com. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos16/estafilococosis/estafilococosis.shtml>

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

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

**Morales Ángeles G.** Tesis como requisito para optar al Título de Licenciatura en Ing. En Ciencia y tecnología de Alimentos. Profesor guía: M. C. Maria Hernández González, Saltillo, Coahuila, México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 2005. 53 Pag.

**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.

**Putievsky, E.** 1996 **Universidad de Zaragoza.** Cultivation, selection and conservation of orégano species in Israel. Ed. Padulosi.

[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_isorefpid=s0004-6222004000100015Ing=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_isorefpid=s0004-6222004000100015Ing=es)

[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_isorefpid=s0004-6222004000100015Ing=es](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.

**Rome,** 2004. (publicación #4 ) FAO, Departamento Económico y Social. Diciembre, Disponible en:

[http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/docrep/007/j3877s/j3877s08.htm](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007/j3877s/j3877s08.htm)

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

**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.

**Smid, E. J. y Gorris, L.G.** 1999, natural antimicrobials for food, Preservation. Capitulo IV en Handbook of food Preservation. M. Shaiur Rahman. Marcel Dekker. New York.

**Walti-Chanes, J. Vergara, F. Y López-Malo, A.** 1997. Minimally Processed Foods, State of the art and future. En: Food Engineering 2000.

**Wilkins, K. M y Board, R. G.** 1989. Natural Antimicrobials. Systems. En: Mechanisms of action on food Preservation Procedures. Guld. Gw, Ed. Elsevier Science New York

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

## ANEXOS

### Respuesta del log10 D \*10 4 Crecimiento Ambiente FRACCION\*CONCENTRACION t-student

Nivel		Cuadrado de las Mo.
2,0	A	6.7067466
3,0	A	6.7013959
2,0.05	B	6.6244195
2,0.15	B	6.6223882
2,0.1	B	6.6183818
3,0.05	C	6.4861284
3,0.1	C	6.4826347
3,0.15	C	6.4685906
4,0	D	5.4898890
5,0	E	5.3464343
4,0.05	F	5.2720357
4,0.1	G	5.1847820
5,0.05	G	5.1792609
4,0.15	H	5.0366784
5,0.1	H	5.0250369
5,0.15	I	4.8573706
1,0	J	4.3018306
1,0.1	K	4.0823961
1,0.05	K	4.0250806
1,0.15	L	3.9126291

### FRACCION\*TIEMPO t-Student

Nivel.		Cuadrado de las Mo.
2,72	A	9.5924071
3,120	B	9.2960071
3,72	C	9.2100432
2,120	C	9.2007333
4,120	D	8.2015731
5,120	E	8.0874658
2,24	F	7.7787957
3,24	G	7.6326994
4,24	H	6.4578116
4,72	I	6.3240004
5,24	J	6.1663748
5,72	J	6.1542621
1,120	K	5.5642439
1,72	L	5.4055784
1,24	L	5.3521142
1,0	M	0.0000000
4,0	M	0.0000000
2,0	M	0.0000000
5,0	M	0.0000000
3,0	M	0.0000000

**CONCENTRACION\*TIEMPO t-student**

Nivel		Cuadrado de las Mo.
0,120	A	8.3371239
0.05,120	B	8.0497708
0.1,120	C	7.9830835
0.15,120	D	7.9100403
0,72	E	7.6143207
0.05,72	F	7.3116439
0.1,72	F	7.2815996
0.15,72	G	7.1414688
0,24	H	6.8855925
0.05,24	I	6.7081255
0.1,24	J	6.6499021
0.15,24	K	6.4666164
0.15,0	L	0.0000000
0.1,0	L	0.0000000
0,0	L	0.0000000
0.05,0	L	0.0000000

**Respuesta del  $\Delta * 10^3$  Crecimiento Refrigeración.**

**FRACCION\*CONCENTRACION t-student**

Nivel.		Lcuadrado de las Mo.
2,0	A	144425.0
2,0.05	B	104625.0
5,0	C	54400.0
3,0	C D	45925.0
4,0	D E	37575.0
5,0.05	E F	27525.0
3,0.05	E F	26662.5
1,0.15	F G	18637.5
1,0.05	G	14600.0
1,0	G	14337.5
5,0.1	G	13975.0
4,0.05	G	13537.5
3,0.1	G H	9975.0
1,0.1	G H	8587.5
2,0.1	G H	8500.0
4,0.1	H I	1625.0
2,0.15	H I	500.0
5,0.15	H I	-1375.0
4,0.15	I J	-8762.5
3,0.15	J	-17150.0

**FRACCION\*TIEMPO t-student**

Nivel		Cuadrado de las Mo.
2,72	A	160737.5
5,72	B	73712.5
4,72	B C	69400.0
2,120	C	61600.0
5,24	D	42912.5
2,24	D	35712.5
3,72	D	35512.5
1,120	D	31725.0
1,72	E	18125.0
3,120	E F	16950.0
3,24	E F	12950.0
1,24	F G	6312.5
1,0	G H	0.0
3,0	G H	0.0
5,0	G H	0.0
4,0	G H	-0.0
2,0	G H	-0.0
4,24	H I	-8825.0
4,120	I J	-16600.0
5,120	J	-22100.0

**CONCENTRACION\*TIEMPO t-student**

Nivel.		Cuadrados de las Mo.
0,72	A	148620.0
0.05,72	B	93520.0
0,24	C	55200.0
0,120	D	33510.0
0.05,24	D	32230.0
0.1,72	D	29180.0
0.05,120	D E	23810.0
0.15,72	E F	14670.0
0.1,120	F G	4810.0
0.1,24	G	140.0
0,0	G	0.0
0.15,0	G	0.0
0.05,0	G	-0.0
0.1,0	G	-0.0
0.15,120	G	-4870.0
0.15,24	H	-16320.0

**Escherichia Coli.**

**Resultados del Δ. Crecimiento \*10<sup>4</sup>**

**FRACCION\*CONCENTRACION  
t-student**

Nivel		Cuadrado de las Mo.
4,0.00	A	3.985000
3,0.00	A	3.985000
4,0.10	B	-4.925000
3,0.10	B C	-5.462500
4,0.20	B C	-5.612500
3,0.20	B C	-7.725000
4,0.15	C	-9.112500
3,0.15	C	-9.208750

**Resultados del Δ. Crecimiento \*10<sup>4</sup>**

**CONCENTRACION\*TIEMPO  
t-student**

Level			Least Sq Mean
0.00,120	A		8.38500
0.00,72	A	B	5.37500
0.00,24		B	2.18000
0.20,0		B C	0.00000
0.10,0		B C	0.00000
0.00,0		B C	-0.00000
0.15,0		B C	-0.00000
0.20,72		C D	-4.92500
0.10,120		C D	-5.50000
0.10,72		D E	-6.60000
0.20,120		D E	-6.90000
0.15,72		D E	-8.17500
0.10,24		D E	-8.67500
0.15,120		E F	-12.00000
0.20,24		F	-14.85000
0.15,24		F	-16.46750

Los niveles no conectados por la misma letra son diferentes significativamente

***Sthaphylococcus aureus.***

**Respuesta del  $\Delta$ . Crecimiento microbiano \*  $10^2$**

**FRACCION\*CONCENTRACION  
t-student**

Nivel		Cuadrado de las Mo.
3,0.00	A	88.87500
4,0.00	A	88.87500
3,0.20	B	-12.50000
3,0.10	B	-13.25000
4,0.20	B	-15.24875
4,0.10	B	-16.75000
4,0.15	B	-18.25000
3,0.15	B	-19.87500

**Respuesta del  $\Delta$ . Crecimiento \*  $10^2$**

**CONCENTRACION\*TIEMPO  
t-student.**

Nivel		Cuadrados de las Mo.
0.00,120	A	201.5000
0.00,72	B	119.0000
0.00,24	C	35.0000
0.20,0	D	0.0000
0.15,0	D	0.0000
0.00,0	D	0.0000
0.10,0	D	-0.0000
0.20,72	D E	-3.7500
0.10,72	D E F	-9.2500
0.15,72	D E F G	-13.5000
0.20,24	E F G	-20.7500
0.10,24	E F G	-20.7500
0.15,24	F G	-29.5000
0.10,120	G	-30.0000
0.20,120	G	-30.9975
0.15,120	G	-33.2500

Los niveles no conectados por la misma letra son diferentes significativamente.