

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS ESPECIAS
EN RAMA, TOMILLO (*Thymus*), OREGANO (*Origanum vulgare*), CLAVO DE OLOR
(*Syzygium*) UTILIZADAS EN UN PRODUCTO CÁRNICO MADURADO FERMENTADO
FRENTE A MICROORGANISMOS CRITERIO MICROBIOLÓGICO SEGÚN LA NORMA NTC
1325**

**ISABEL CRISTINA SÁNCHEZ GIRALDO.
VALENTINA MARTÍNEZ MEJÍA.**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGIA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2017**

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS ESPECIAS
EN RAMA, TOMILLO (*Thymus*), OREGANO (*Origanum vulgare*), CLAVO DE OLOR
(*Syzygium*) UTILIZADAS EN UN PRODUCTO CÁRNICO MADURADO FERMENTADO
FRENTE A MICROORGANISMOS CRITERIO MICROBIOLÓGICO SEGÚN LA NORMA NTC
1325**

**ISABEL CRISTINA SÁNCHEZ GIRALDO.
VALENTINA MARTÍNEZ MEJÍA.**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Bacterióloga**

**Directora:
Magister. JENNIFER GAVIRIA GIRALDO**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGIA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2017**

Nota de aceptación

Firma de Director del Trabajo de Grado

Firma del presidente del Comité de Programa

Firma de integrante del Comité de Programa

Manizales, 15 de diciembre de 2017

DEDICATORIA

Nuestro proyecto de grado va dedicado con todo nuestro amor y cariño a nuestras familias, quienes confiaron en nosotras y nos apoyaron en cada momento. Fueron nuestra fuente de motivación para así poder luchar por alcanzar nuestras metas y sacar adelante cada uno de nuestros sueños.

“Los grandes éxitos no son hechos por una sola persona, son hechos por un equipo de personas” Steve Jobs.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a:

Dios por habernos permitido llegar hasta este punto y habernos dado fuerza y salud para superar obstáculos y dificultades que nos impedían lograr nuestros objetivos.

Nuestros padres por ser el pilar fundamental en todo lo que somos, en toda nuestra educación, tanto académica, como de la vida, por su amor y su apoyo incondicional. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que nos han infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y lograr todo lo que nos proponemos.

A la Magister Jennifer Gaviria Giraldo, por el apoyo, orientación y experiencia que nos brindó día a día para poder realizar este proyecto.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCION.....	10
2.	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo General	15
2.2	Objetivos Específicos.....	15
3.	MARCO TEORICO.....	16
3.1	Aditivos en derivados cárnicos:.....	16
3.2	Aditivos naturales:.....	16
3.3	Actividad antimicrobiana de los aditivos naturales:.....	17
3.4	Microorganismos Gram Negativos:	17
3.5	<i>Escherichia coli</i> , patógeno intestinal:	18
3.6	Salmonelas	23
3.7	<i>Klebsiella</i> spp	24
3.8	<i>Yersinia</i>	25
3.9	<i>Enterobacter cloacae</i>	26
3.10	Microorganismos Gram Positivos:	26
3.11	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.12	<i>Listeria monocytogenes</i>	28
3.13	<i>Clostridium perfringens</i> (Esporas sulfito reductor)	28
3.14	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	30
3.15	<i>Bacillus subtilis</i>	30
3.16	Componentes del tomillo y Acción antimicrobiana del tomillo (<i>Thymus</i>).....	32
3.17	Componentes del orégano y acción antimicrobiana del orégano (<i>Origanum vulgare</i>) 33	32
3.18	Componentes del clavo de olor (<i>Zyngium</i>).....	33
3.19	Clasificación de los productos cárnicos	35
3.20	Concentración inhibitoria mínima (CMI).....	37
4	MATERIALES Y METODOS	38
5	RESULTADOS Y DISCUSION	41
6.	CONCLUSIONES.....	51
7.	RECOMENDACIONES	52
8.	BIBLIOGRAFÍA	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 <i>E. coli</i> patógeno intestinal, signos y síntomas de la enfermedad.	18
Tabla 2 Patogenicidad de <i>E.coli</i> :	20
Tabla 3 Condiciones de crecimiento de <i>Yersinia</i>	25
Tabla 4 Límites del crecimiento y de la producción de enterotoxinas estafilocócicas.	27
Tabla 5 Clasificación de los embutidos en seis categorías Kinsman (1980)	35
Tabla 6 Resultados Concentración mínima inhibitoria especia Tomillo en rama.....	41
Tabla 7 Resultados Concentración mínima inhibitoria especia Clavo de olor en rama	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Aumento en el consumo de embutidos en Colombia entre 1998-2005 (Mora, 2005).	12
Figura 2 Grandes consumidores de productos carnicos embutidos. Fuente: Periodico el Pais.	12
Figura 3 Aspectos generales del género Salmonella. (ICMSF, 1998).	24
Figura 4 Aspectos importantes de Staphylococcus aureus (ICMSF, 1998).	27
Figura 5 Generalidades de <i>Listeria Monocytogenes</i> (ICMSF, 1998).	28
Figura 6 Aspectos relevantes <i>Clostridium perfringens</i> (ICMSF, 1998)	29
Figura 7 Propiedades del <i>Staphylococcus epidermidis</i> . (Republica, 2013)	30
Figura 8 Concentraciones mínimas inhibitorias (Rodríguez y Saucedo, 2011).	34
Figura 9 Caja de petri con los sensidiscos previamente sumergidos en la concentración de la especia.	39
Figura 10 Controles positivos y negativos de la prueba	40
Figura 11 Halos de inhibición en mm de la especia tomillo frente a <i>Salmonella</i> ATCC 14028	42
Figura 12 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de la especia Orégano en rama	44
Figura 13 Halos de inhibición en mm de la especia clavo de olor frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	47
Figura 14 Halos de inhibición en mm de la especia clavo de olor frente a <i>Salmonella</i> ATCC 14028.	48
Figura 15 Halos de inhibición en mm de la especia clavo de olor frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	48

RESUMEN

Existen productos carnicos embutidos que requieren un sin numero de aditivos y conservantes con la finalidad de prolongar su vida util y asi evitar el crecimiento de microorganismos patógenos en estos. Actualmente, se ha demostrado que estos aditivos y conservantes como los sulfitos, ácidos sórbicos y cítricos, sales de nitrito o nitratos son altamente perjudiciales para la salud de los consumidores; por lo que se ve la necesidad de sustituir o disminuir las sales de curado en estos productos por especias, como el Tomillo (*Thymus vulgaris*), Orégano (*Origanum vulgare*) y Clavos de olor (*Syzygium*), quienes generan menor riesgo para la salud e igualmente le aportan a los productos cárnicos características organolépticas y palatables diferentes a los tradicionales, adicionalmente se reporta su capacidad bacteriostática, por contener antimicrobianos naturales entre los cuales se encuentran Carvacrol y Timol. Con este proyecto no solo se busca crear un producto derivado carnico inocuo, sino tambien un producto sin riesgos ni efectos secundarios sobre la salud tras su consumo, por lo que tiene como objetivo determinar la concentración mínima inhibitoria de las especias Tomillo (*Thymus*), Oregano (*Origanum vulgare*) y Clavo de olor (*Zyzygium*) en rama utilizadas en un producto carnico madurado fermentado frente a cepas que son criterios microbiologicos según norma NTC 1325. Para esto, se trabajaron dos metodologias: Difusion en disco y prueba de capacidad de especias; con el fin de determinar cuál de las dos permitía tener mejores resultados en la medición de la concentración mínima inhibitoria de las especias a evaluar en rama. En cuanto a los resultados obtenidos, se demuestra que la especia Clavo de olor (*Zyzygium*) en rama fue la especia que mejores resultados presento, evidenciando que esta tiene una mayor capacidad inhibitoria frente a los microorganismos estudiados, puesto que mostro halos de inhibicion de gran tamaño comparados con los obtenidos de las otras especias.

Palabras clave: Conservantes, especias en rama, Oregano (*Origanum vulgare*), Tomillo (*Thymus*), Clavo de olor (*Zyzygium*), producto cárnico, riesgo para la salud.

1. INTRODUCCION

Los derivados cárnicos son productos alimenticios que han sido total o parcialmente preparados a base de carnes, despojos o grasas, así como subproductos comestibles, ya sean procedentes de animales de abasto o bien de otras especies, pudiendo llevar además en su composición ingredientes de origen vegetal o animal, condimentos, especias y aditivos autorizados (Rodríguez, 2005)

Existen productos carnicos embutidos que requieren un sin numero de aditivos y conservantes con la finalidad de prolongar su vida util y asi evitar el crecimiento de microorganismos patógenos en estos (Rodríguez S. , 2011)

A nivel industrial, los productos derivados cárnicos requieren por necesidad y exigencia de los consumidores una estabilizacion del color, logrando que de esta manera sea más aceptable organolepticamente (Rodríguez, 2005). Es por este motivo, que en las industrias consideran como ingrediente primordial en el proceso de conservación de los derivados cárnicos el uso de nitratos y nitritos; ya que cumplen las funciones de conservar el color rojo agradable de la carne al reaccionar con los componentes de la sangre de la carne y previenen la germinación y el crecimiento de las endosporas botulínicas (Gerard, Berdell, & Case, 2007)

Sin embargo, innumerables estudios revelan los problemas en salud que ocasionan diferentes conservantes, como los sulfitos, ácidos sórbicos y cítricos, sales de nitrito o nitratos; los cuales son empleados principalmente con la finalidad de proporcionar el color adecuado a los productos cárnicos, retrasar el proceso de oxidación de los lípidos, con la consecuente disminución del característico olor de enranciamiento, producir una mayor firmeza en la textura, y proveer a los alimentos de un importante efecto antimicrobiano (especialmente frente a *Clostridium botulinum* y sus toxinas) (Discovery, 2015) (Cardona & Mejia, 2009)

Entre los efectos secundarios ocasionados al consumir alimentos que contengan estos conservantes adicionados se encuentran las enfermedades cardiovasculares, cataratas, deterioro y la muerte. El consumo de las sales de curados genera en el organismo problemas graves como efectos carcinogénicos que puede producirse a largo plazo, esto atribuido a la

nitrosamina formada a partir de los nitritos o nitratos; desarrollándose diferentes tipos de cáncer, el más representativo es el colorrectal (Discovery, 2015) (Cardona & Mejia, 2009). (DAM, 2015) Otra consecuencia importante es un trastorno sanguíneo llamado Metahemoglobinemia, en el cual una cantidad anormal de hemoglobina se acumula en la sangre impidiendo el transporte del oxígeno de manera efectiva hacia los tejidos corporales. Clínica DAM, especialidades medicas (DAM, 2015).

Se han realizado diversos estudios de los efectos de la carne sobre la incidencia de cáncer colon rectal (CCR) en la población, en donde se ha demostrado por diferentes investigaciones que la ingesta total de carne no se asocia a un mayor riesgo de CCR, pero sí el consumo de carne roja, así como de carne procesada. Por otro lado, los niños se encuentran involucrados en casos de intoxicación por el consumo de nitritos y nitratos desarrollando como consecuencia una grave metahemoglobinemia. Los niños menores de 5 años presentan más intoxicaciones debido a que tienen sus mecanismos de reducción de metahemoglobina (MHb) poco desarrollados, por lo que, en casos graves, puede ser fatal. Otro de los problemas que se presenta al consumir productos que contengan conservantes químicos, artificiales como sales de nitrito o nitrato, sulfitos, ácidos sorbicos y cítricos es la afectación a la biota intestinal del consumidor final, como consecuencia de esto se eliminan o retardan procesos metabólicos (Bark, Cameron y Diaz, 2015).

Actualmente se ha visto un incremento en el consumo de productos carnicos embutidos, lo cual es debido al cambio en los estilos de vida de la sociedad actual. Instituto Nacional de Asociativismo y Economía Social (INAES, 2016), esto se ve evidenciado en la figura 1 tomada de La dinamica del consumo en Colombia, donde demuestran que a partir de diciembre del año 2001 el consumo de embutidos comenzo a aumentar; pues para esta fecha estuvo por encima del 0,4000% y para finales del año 2004 el consumo de embutidos ya se encontraba alrededor del 0,4500% (Mora, 2005)

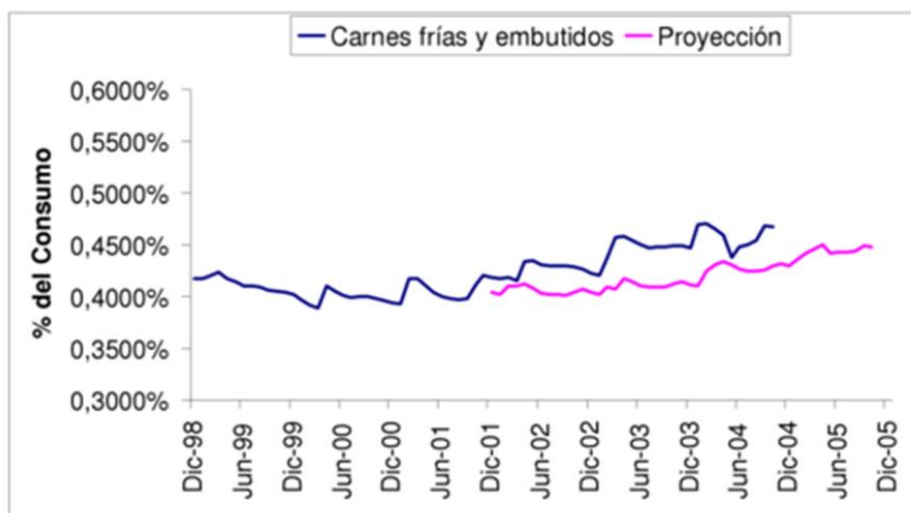


Figura 1 Aumento en el consumo de embutidos en Colombia entre 1998-2005 (Mora, 2005)

Muchos consumidores se encuentran preocupados por la alerta que lanzó la Organización Mundial de la Salud, sobre la posibilidad que el consumo excesivo de carnes procesadas generen cáncer. Sin embargo, tal y como se evidencia en la figura 2 Colombia no se encuentra entre los grandes consumidores de productos carnicos embutidos, en donde se aprecia un porcentaje de producción del 49% frente a porcentajes del 93% y 50% que se presenta en otros países (Gonzales, 2015)

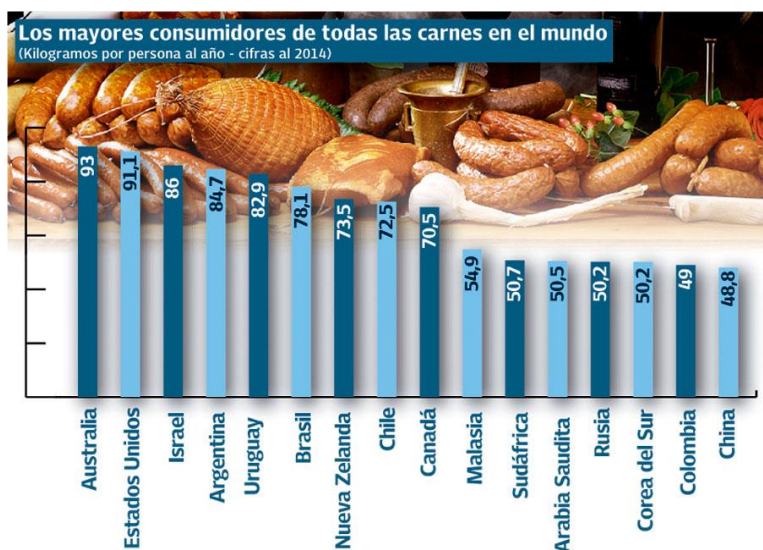


Figura 2 Grandes consumidores de productos carnicos embutidos. Fuente: Periodico el Pais.

El ministro de Salud y Protección Social, Alejandro Gaviria, aseguró que es de vital importancia tomar sin alarmismo y hacer un buen entendimiento de la noticia dada por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) para lograr realizar con la población una adecuada promoción del autocuidado y de la comunicación del riesgo, para que así la gente tenga la información precisa y pueda tomar decisiones razonables.

Por otro lado, Sandra Franco, oncóloga de la Clínica del Country, expresó que lo dicho por la (OMS,2015) ya se conocía y que no se trata de prohibir de manera absoluta el consumo de carne, además de esto menciona que 600 gramos a la semana de estos productos cárnicos procesados es una buena recomendación para no privarse de los beneficios que su consumo moderado tiene para la salud.

Frente a las preocupaciones de los consumidores de querer consumir productos más sanos se siente la necesidad de implementar un producto que sea natural o en su defecto con reducción de compuestos químicos como los conservantes, para este fin se implementa la sustitución parcial o total de sales de curado, por especias altamente antioxidantes, entre las cuales se encuentran: Clavo de olor (*Syzygium*), Orégano (*Origanum vulgare*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*); estas especias antes mencionadas, han contribuido a conservar diferentes productos cárnicos como el salami, ofreciendo a sus consumidores un producto menos artificial (Cardona & Mejia, 2009)

El sustituir o disminuir las sales de curado en estos productos por especias, como el Tomillo (*Thymus vulgaris*), Orégano (*Origanum vulgare*) y Clavos de olor (*Syzygium*), generan menor riesgo para la salud e igualmente le aportan a los productos cárnicos características organolépticas y palatables diferentes a los tradicionales, adicionalmente se reporta su capacidad bacteriostática, por contener antimicrobianos naturales entre los cuales se encuentran Carvacrol y Timol (Bastos, Damé, Souza, Almeida, & Alves, 2011)

Pese a que se presentan diversos antecedentes sobre el uso de las especias Lopez Malo en su reciente estudio sobre Agentes Antimicrobianos presentes en especias y hierbas, hace referencia a que el espectro de actividad antimicrobiana de las especias en rama y en aceite dependeran en gran medida del microorganismo a inhibir puesto que algunos presentaran mas resistencia que otros.

Con este proyecto no solo se busca crear un producto derivado carnico inocuo, sino tambien un producto sin riesgos ni efectos secundarios sobre la salud tras su consumo, mejorando asi la condicion de vida de todas aquellas personas que incluyen en su alimentacion los productos de derivados carnicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la concentración mínima inhibitoria de las especias Tomillo (*Thymus*), Oregano (*Origanum vulgare*), Clavo de olor (*Zyzzgium*) en rama utilizadas en un producto carnico madurado fermentado frente a cepas que son criterios microbiologicos según norma NTC 1325.

2.2 Objetivos Específicos

- Establecer la concentracion minima inhibitoria (MIC) de la especia en rama Tomillo (*Thymus*), a nivel *in vitro* frente a cepas que son criterios microbiologicos según norma NTC 1325 para un producto carnico madurado fermentado.
- Establecer la concentracion minima inhibitoria (MIC) de la especia en rama Oregano (*Origanum vulgare*), a nivel *in vitro* frente a cepas que son criterios microbiologicos según norma NTC 1325 para un producto carnico madurado fermentado.
- Establecer la concentracion minima inhibitoria (MIC) de la especia en rama Clavo de olor (*Zyzzgium*), a nivel *in vitro* frente a cepas que son criterios microbiologicos según norma NTC 1325 para un producto carnico madurado fermentado.

3. MARCO TEORICO

3.1 Aditivos en derivados cárnicos:

En la antigüedad las personas no prestaban atención sobre los alimentos que consumían y los componentes químicos que estos contenían, razón por la cual en el mercado no era de gran importancia conocer los efectos y consecuencias de cada uno de estos aditivos (Rodríguez S. , 2011). Actualmente se ha asociado el consumo de conservantes químicos *como son los benzoatos, nitritos y nitratos, anhídrido sulfuroso (SO₂)*, entre otros con *intoxicaciones, cáncer y otras enfermedades degenerativas*. Lo que genera la necesidad de buscar alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y compatibilidad con el alimento, es decir que permita mantener el color, la textura, el sabor y especialmente el valor nutritivo del alimento (Rodríguez S. , 2011).

3.2 Aditivos naturales:

Debido a la creciente demanda de los consumidores por productos menos industrializados, más naturales y saludables, se ha investigado mucho sobre la utilización de nuevas sustancias como los extractos de plantas y los aceites esenciales. Como proceden de plantas no tienen límites legales de utilización, pero en dosis bajas, no tienen ningún efecto conservador y en dosis muy altas, pueden aportar al alimento una serie de características organolépticas que lo hacen no apto para el consumo (Freixanet, 2010). Con el pasar de los años los consumidores han comenzado a estar más atentos de los aditivos que traen los alimentos que suelen consumir y los efectos nocivos que pueden repercutir en su salud, debido a esto en el área industrial especialmente en la sección de productos alimenticios han surgido muchos compuestos químicos y naturales con actividad antimicrobiana; tal y como lo son las especias en rama de Tomillo (*Thymus*), Oregano (*Origanum vulgare*) y Clavo de olor (*Zyzzgium*) (Rodríguez S. , 2011)

3.3 Actividad antimicrobiana de los aditivos naturales:

Según Rosa Medina y otros en los últimos 20 años la investigación de las plantas con principios aromáticos y sus aceites esenciales se ha centrado principalmente en su genuinidad, sus efectos biosidas y su actividad antioxidante y farmacológica. Los consumidores y los industriales se han interesado en la seguridad de los aditivos sintéticos, lo que ha llevado a incrementar la demanda y las investigaciones de los productos naturales que podrían tener algún efecto benéfico sobre la salud (Medina, y otros, 2003). La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos o aceites esenciales, y se ha observado que la grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Nychas, Skandamis, & Tassou, 2003). El modo de acción de estos compuestos fenólicos no ha sido determinado, sin embargo, varios autores mencionan que éstos pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético (Rodríguez S. , 2011). Por otro lado se encuentran estudios realizados donde menciona que *“los compuestos fenólicos lo que hacen es sensibilizar la membrana celular, y al saturarse los sitios de acción, la célula sufre un daño grave, provocando que se colapse la membrana”* (Raibaudi, Fortuna, & Belloso, 2006)

Se conoce que las especias son más efectivas frente a microorganismos Gram positivos que frente a los Gram negativos, lo que se sustenta en las diversas variaciones que presentan estos microorganismos en cuanto a su estructura en la pared celular. Las especias presentan diversas funciones, en donde se resalta que la función de especias como el Tomillo (*Thymus*) y el Oregano (*Origanum vulgare*) asumen una actividad intermedia; mientras que el Clavo de olor (*Zyngium*) posee un gran poder preservante (Rodríguez S. , 2011) Aunque el oregano posee una actividad intermedia es quizá el más estudiado y se ha demostrado que presenta acción frente a diferentes microorganismos tales como (Rodríguez S. , 2011).

3.4 Microorganismos Gram Negativos:

- *Salmonella typhimurium*
- *Escherichia coli*

- *Klebsiella pneumoniae*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Enterobacter cloacae*

3.5 *Escherichia coli*, patógeno intestinal:

Las bacterias de la especie *E. coli* son representativas de la familia Enterobacteriaceae. Como tales, los organismos son bacilos cortos Gram-negativos, catalasa positiva, oxidasa negativos, anaerobios facultativos. Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar serológicamente unas de otras en base a los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). (ICMSF, 1998)

Los signos y síntomas de la enfermedad dependen del tipo de *E. coli* patógeno intestinal que causa infección y que se resume en la tabla 1.

Tabla 1 *E. coli* patógeno intestinal, signos y síntomas de la enfermedad.

Tipo de <i>E. coli</i> patógeno	Tiempo para el comienzo	Duración de la enfermedad	Síntomas
Enteropatógeno (EPEC)	17-22 h (prom. 36 h)	6 h-3 d (prom. 24 h)	Diarrea, náuseas. Dolor abdominal, vómito, cefalalgia, fiebre, escalofríos; la diarrea es acuosa con abundante cantidad de moco pero no sangre.
Enterotoxigénico (ETEC)	8-44 h (prom. 26 h)	3-19 d	Diarrea acuosa, fiebre ligera, retortijones abdominales,

			malestar, náuseas; en la forma más grave se parece al cólera, con diarrea intensa parecida al agua de arroz que acaba en deshidratación.
Enteroinvasor (EIEC)	8-24 h. (prom. 11 h)	Días a semanas	Diarrea profusa o disentería, escalofríos, fiebre, cefalalgia, mialgia, retortijones abdominales; con frecuencia las deposiciones contienen moco y vetas de sangre.
Enterohemorrágico (EHEC)	3-9 d (prom. 4 d)	2-9 d	Colitis hemorrágica: diarrea muy sanguinolenta, dolor abdominal intenso, vomito, sin fiebre. Síndrome urémico hemolítico (HUS): pródromo de diarrea

			<p>sanguinolenta, nefropatía aguda, convulsiones, coma, muerte. Purpura trombótica trombocitopenica: similar al HUS, pero también fiebre y trastorno del sistema nervioso central.</p>
--	--	--	---

Fuente: (ICMSF, 1998)

Tabla 2 Patogenicidad de *E.coli*:

SEROTIPOS	CARACTERISTICAS
<i>E. coli</i> enteropatógeno	<p>La lesión implica la destrucción de las microvellosidades sin que exista otro indicio de invasión de los tejidos. La mayoría de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC) se adhieren a las células HEp-2 de una forma localizada característica. La fijación es mediada por una proteína específica de la membrana externa denominada factor de adherencia de (EPEC) (EAF). Esta proteína es codificada por un plásmido (ICMSF, 1998).</p>

<p><i>E. coli</i> enterotoxigénico</p>	<p><i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico (ETEC) son la causa principal de la diarrea infantil en los países en desarrollo y son la primera causa de diarrea del viajero en algunos países desarrollados. Los ETEC se hallan circunscritos al intestino delgado proximal. La fijación a la pared intestinal es mediada por fimbrinas, a las que se les conoce como factores de colonización.</p> <p>Los factores de colonización, la virulencia de las cepas ETEC depende de la formación de toxinas mediadas por plásmidos. Han sido descritos dos tipos principales de toxina, que son fácilmente diferenciables en base a la termoestabilidad, peso molecular y modo de acción; estos dos tipos son la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST). (ICMSF, 1998)</p>
<p><i>E. coli</i> enteroinvasor</p>	<p><i>Escherichia coli</i> enteroinvasor (EIEC) ataca de modo específico la mucosa del colon, invadiendo las células epiteliales, multiplicándose y finalmente causando la ulceración del intestino. La capacidad</p>

	invasora depende de la presencia del plásmido que codifica la producción de varios polipéptidos de la membrana externa implicados en la capacidad invasora. (ICMSF, 1998)
<i>E. coli</i> Enterohemorrágico	El mecanismo de patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico (EHEC) no ha sido esclarecido totalmente, pero han sido identificados factores de virulencia importantes (verotoxinas) (ICMSF, 1998)

Actualmente, resulta difícil determinar hasta qué punto estos organismos están implicados en la enfermedad transmitida por alimentos a nivel mundial. Probablemente, su implicación es subestimada. Han sido descritos brotes relacionados con los alimentos perfectamente comprobados documentalmente debidos a EIEC, ETEC Y a *E. coli* enterohemorrágico. La mayoría de brotes ha sido relacionada en mayor porcentaje por el consumo de carne picada de vacuno, carne de cerdo y de aves de corral insuficientemente cocida (ICMSF, 1998). Se cree que las personas portadoras, tanto sintomáticas como asintomáticas, son el reservorio principal y la fuente de las cepas EPEC, EIEC y ETEC implicadas en la enfermedad humana. Estos organismos se hallan presentes en el tracto intestinal de los portadores y, por lo tanto, son excretados en las heces. Los alimentos pueden ser contaminados por manipuladores de alimentos infectados que practican una defectuosa higiene personal o por contacto con agua contaminada con aguas residuales humanas. Las medidas importantes para prevenir la intoxicación alimentaria incluyen la formación de los operarios que manipulen alimentos en cuanto a técnicas de manipulación inocua de los alimentos y la higiene personal adecuada, calentamiento adecuado de los alimentos para destruir patógenos y mantenimiento de los alimentos en condiciones apropiadas para impedir la manipulación bacteriana (ICMSF, 1998).

Es de importancia resaltar que el tracto intestinal del ganado vacuno, y tal vez otros animales de abasto, es un reservorio importante para *E. Coli* enterohemorrágico (O157:H7). Por consiguiente, los alimentos crudos de origen animal pueden estar contaminados por el organismo por contactar con materia fecal durante operaciones del sacrificio o del ordeño. La prevención de la contaminación fecal durante la obtención y tratamiento de los alimentos procedentes de animales es de suma importancia para controlar las infecciones por *E. coli* (O157:H7) que se transmiten por medio de alimentos. La dosis infecciosa de esta es baja por lo que, después del sacrificio animal y de la elaboración de los productos cárnicos, su crecimiento en las carnes debe ser controlado mediante enfriamiento rápido hasta una temperatura inferior a 7°C (ICMSF, 1998).

3.6 Salmonelas

En la siguiente figura (Figura 3) se observan los aspectos generales del género salmonella.

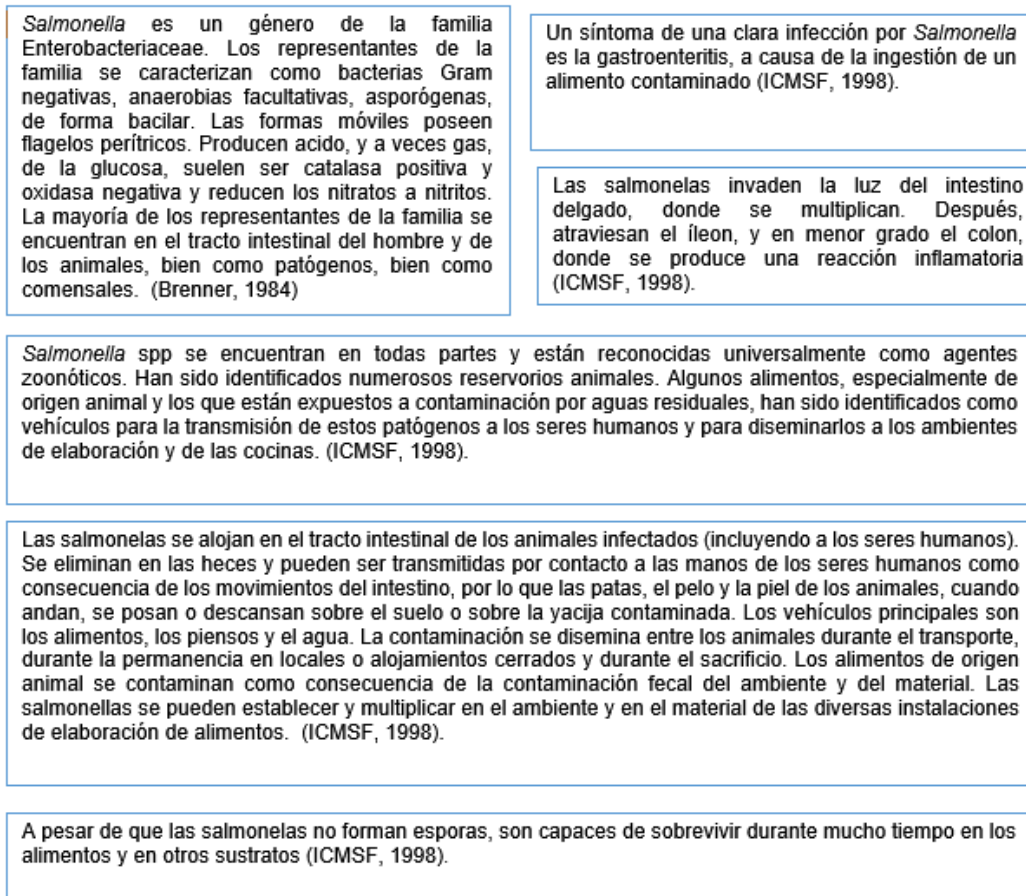


Figura 3 Aspectos generales del género *Salmonella*. (ICMSF, 1998).

3.7 *Klebsiella* spp

Son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro. Su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS). (Puerta y Mateos, 2010).

De igual forma, son indol-negativas, fermentan la lactosa y utilizan citrato como única fuente de carbono. Con excepción de la endotoxina, en *Klebsiella* no se ha hallado otro factor de virulencia constante. *K. pneumoniae* forma parte de la flora habitual intestinal y de la cavidad oral. (Puerta y Mateos, 2010).

3.8 *Yersinia*

Yersinia es un género de bacterias ampliamente distribuida en la naturaleza que pueden producir infecciones tanto en animales como en el ser humano a través de alimentos contaminados, generándoles la enfermedad denominada Yersiniosis. **(Elikagaien, segurtasunerako, & Fundazios, 2013)**

El reservorio principal de *Y. enterocolitica* es el cerdo, y, en consecuencia, se convierte en el principal vehículo de transmisión al ser humano, a través de la carne de cerdo y derivados crudos o insuficientemente cocinados. **(Elikagaien, segurtasunerako, & Fundazios, 2013)**

Condiciones de supervivencia:

Se trata de enterobacterias psicrótrofas, es decir, que crecen a temperaturas bajas de refrigeración (<4°C) y también pueden crecer en envases al vacío. Permanecen viables a temperatura de congelación, por lo que sobreviven en alimentos congelados durante largos periodos de tiempo. Estas bacterias persisten más en los alimentos cocinados y platos preparados listos para su consumo que en los alimentos crudos, debido a la mayor disponibilidad de nutrientes. **(Elikagaien, segurtasunerako, & Fundazios, 2013)**. En la tabla 3 se encuentran algunas de las condiciones de crecimiento para los microorganismos del género *Yersinia*.

Tabla 3 Condiciones de crecimiento de *Yersinia*.

	Mínimo	Optimo	Máximo
Temperatura	-1	25-32	42
pH	4	7,6	10
Actividad del agua	0,95	0,997	---

Fuente: (Elikagaien, segurtasunerako, & Fundazio, 2013)

3.9 *Enterobacter cloacae*.

Es una bacteria que pertenece al género *Enterobacter*, de la familia de las *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo Gramnegativo Oxidasa negativo y Catalasa positivo presente en el aparato digestivo humano.

Como la casi totalidad de las bacterias gram negativas disponen en su superficie de centenares de fimbrias, organelas indispensables para poder adherirse a las superficies mucosas y para la colonización bacteriana. Otro factor de virulencia es su capacidad de producir toxinas, que es una característica propia de las cepas patógenas de este grupo (*Enterobacteriaceae*), dentro de ellas está la hemolisina que potencia la acción de las fimbrias, una amplia variedad de citotoxinas (entre ellas la toxina enteropatogénica) y de enterotoxinas causantes de los diferentes síndromes diarreicos. (Elikagaien, segurtasunerako, & Fundazio, 2013)

3.10 Microorganismos Gram Positivos:

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Listeria monocytogenes*
- *Bacillus subtilis*
- *Clostridium perfringens*

3.11 *Staphylococcus aureus*

La siguiente figura (Figura 4) dispone de algunos aspectos importantes de *Staphylococcus aureus*

Se presenta en forma de cocos Gram positivos y catalasa positivos que se dividen en más de un plano para formar racimos tridimensionales de células. (ICMSF, 1998).

S. aureus produce una gama especialmente amplia de sustancias (agresinas y exotoxinas) asociadas con la infecciosidad y con la enfermedad. (ICMSF, 1998).

La aparición de los síntomas de la intoxicación alimentaria tiene lugar entre 1 y 7 horas después de la ingestión del alimento que contiene enterotoxinas estafilocócicas. Los síntomas más corrientes son náuseas, vómitos, arcadas, espasmos abdominales y diarrea. La curación es rápida, generalmente en un plazo de 2 días. (ICMSF, 1998).

Las enterotoxinas causan intoxicación alimentaria, su acción no se ha sido esclarecido del todo, se dice generalmente que 0,1-1 µg/kg causara enfermedad en una persona. (ICMSF, 1998).

Figura 4 Aspectos importantes de *Staphylococcus aureus* (ICMSF, 1998).

Los límites del crecimiento y de la producción de enterotoxinas están presentes en la siguiente (tabla 4).

Tabla 4 Límites del crecimiento y de la producción de enterotoxinas estafilocócicas.

<i>Factor</i>	<i>Crecimiento*</i>		<i>Producción de toxina*</i>	
	<i>Óptimo</i>	<i>Escala</i>	<i>Óptimo</i>	<i>Escala</i>
Temperatura (°C)	37	7-48	40-45	10-48
pH	6-7	4-10	7-8	4,5-9,6 α
Actividad en agua (aw)	0,98	0,83 → 0,99**	0,98	0,87 → 0,99αα
Eh	+200 mv	< - 200 mv - > + 200 mv	-	-

Atmosfera	Aeróbico	Anaerobico – aeróbico	Aeróbica (5-20% de O ₂ disuelto)	Anaerobica – aeróbica
-----------	----------	--------------------------	---	--------------------------

*Los límites del crecimiento y de la producción de toxina corresponden a *S. aureus* cultivado en condiciones óptimas

**Aeróbico (anaerobio una aw 0,90 -> 0,99)

▫Aeróbico (el limite inferior del pH anaerobico es 5,0)

▫▫Aeróbico (anaeróbica una aw 0,92 -> 0,99)

Fuente: (ICMSF, 1998)

3.12 *Listeria monocytogenes*

Algunas generalidades de *Listeria Monocytogenes* se pueden evidenciar en la siguiente figura (Figura 5)

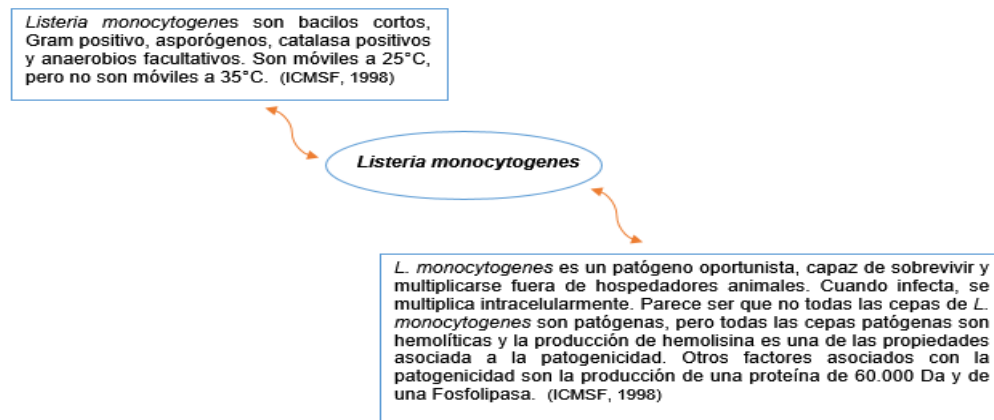


Figura 5 Generalidades de *Listeria Monocytogenes* (ICMSF, 1998).

3.13 *Clostridium perfringens* (Esporas sulfito reductor)

En la figura 6 se muestran algunos aspectos relevantes del microorganismo *Clostridium perfringens*

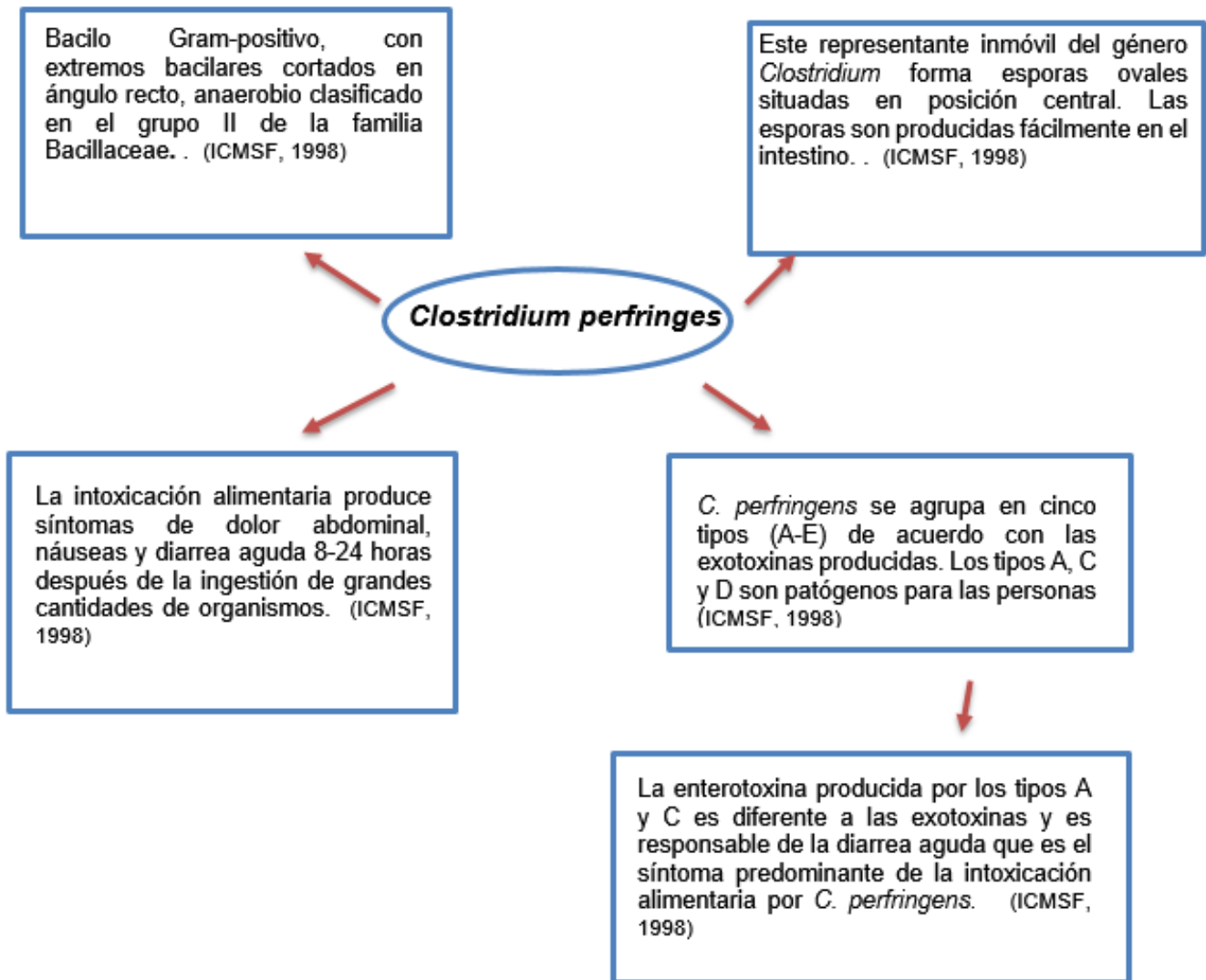


Figura 6 Aspectos relevantes *Clostridium perfringens* (ICMSF, 1998)

3.14 *Staphylococcus epidermidis*

La siguiente figura (Figura 7) destaca algunas propiedades del *Staphylococcus epidermidis*.

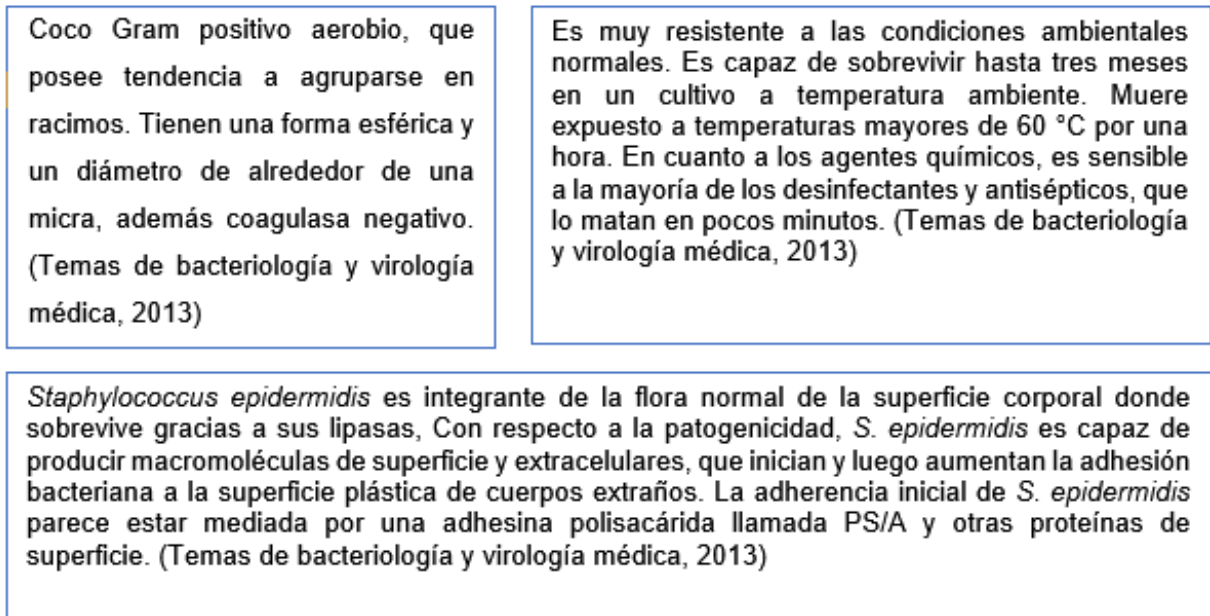


Figura 7 Propiedades del *Staphylococcus epidermidis*. (Republica, 2013)

3.15 *Bacillus subtilis*

Es una bacteria Gram positiva aerobia, un aspecto de gran interés a lo largo de los años es su capacidad para formar esporas; sus esporas son resistentes a factores ambientales como el calor, el ácido y la sal, y pueden persistir en el ambiente por largos periodos de tiempo.

Este microorganismo es altamente importante en la industria mundial, pues tiene un alto poder antifúngico, por lo que es muy útil en la agricultura para combatir algunas plagas de hongos, responsables del importante deterioro de muchos cultivos, como la vid. En relación con los alimentos, los brotes de intoxicación alimentaria han sido muy ocasionales. Se ha descrito la producción de una toxina extracelular, la subtilina de escasa toxigenicidad y únicamente

relacionada con el desarrollo de reacciones alérgicas en individuos que trabajan con cultivo industriales de esta especie. Los síntomas de la intoxicación alimentaria por *Bacillus subtilis* son muy similares a los provocados por la intoxicación por *Bacillus cereus*, provocando un cuadro diarreico y emético, el primero de ellos relacionado con el número de bacterias ingeridas, y el segundo relacionado con la cantidad de toxina emética ingerida. El comienzo de la sintomatología podría ser tan pronto como a los 10 minutos de la ingestión, y podrían durar hasta dos días. (Forbes, 2009).

Las especias en rama de Tomillo (*Thymus*), Oregano (*Origanum vulgare*) y Clavo de olor (*Zyzygium*) han reportado además una capacidad bacteriostática, la cual se atribuye a ciertos antimicrobianos naturales como el Carvacrol y Timol (Bastos, Damé, Souza, Almeida, & Alves, 2011)

De todos los agentes antimicrobianos naturales, el carvacrol es uno de los que más atención ha recibido en su mecanismo de acción, pues es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática, provocando con ello la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas y disminución de la fuerza motriz del protón. García menciona que cuando la concentración de carvacrol aumenta, mayor cantidad de este componente es acumulado en la membrana y por consiguiente el daño en la membrana es mayor (García & García, 2008)

Lambert menciona que el carvacrol daña la membrana celular de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, provocando la disipación de dos componentes de la fuerza motriz del protón: el gradiente de pH y el potencial eléctrico; pudiendo ser mayor el daño a la membrana en presencia de nutrientes, síntesis de ácidos nucleicos y actividad de las enzimas ATPasas, entre otros (García & García, 2008). Por otra parte, Burt señaló que células de *E. coli* crecen en presencia de carvacrol a una concentración 1mM sin síntesis de flagelos, provocando que el microorganismo crezca sin movilidad; al verse estresada *E. coli* utiliza su energía en otras funciones vitales en vez de sintetizar flagelos. Sin embargo, a una concentración 5 mM cesa inmediatamente la movilidad y ocurre la muerte celular (García & García, 2008).

El mecanismo de acción de timol es semejante al de carvacrol. El timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Garcia & Garcia, 2008). Lambert y Pearson señalaron que el timol cambia la permeabilidad de la membrana de las células microbianas dejando que se filtren los constituyentes químicos que son esenciales para el metabolismo, tales como iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos. Estos efectos causan un incremento de la fase log, provocando una disminución en la carga celular total (Garcia & Garcia, 2008). En estudios realizados por Chaibi en 1997 y en su colaboración con el estudio de mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos, confirmó que sobre células de *B. cereus* y *Clostridium botulinum* el timol puede inhibir algunos de los procesos involucrados en la transición de espora a célula, como la germinación, crecimiento y multiplicación celular. Por otra parte, se logró demostrar que las bacterias ácido-lácticas son más resistentes al timol que las bacterias formadoras de esporas (Garcia & Garcia, 2008)

Según Falcone en el estudio realizado en el 2005 la acción antimicrobiana y la sensibilidad al timol es dependiente de ciertos factores como el tipo de microorganismo, pH del medio y temperatura de incubación (Garcia & Garcia, 2008)

3.16 Componentes del tomillo y Acción antimicrobiana del tomillo (*Thymus*)

- Aceites esenciales, como el timol o el geraniol.
- N-triacontano, que posee propiedades antibióticas.
- Ácido clorogénico y ácido cafeico.
- Manganeso y taninos.
- Flavonoides, como flaonas, glicósidos y flavónicos.

La propiedad antimicrobiana del tomillo esta asociado a su carácter lipofílico a la acumulación en membranas y los subsecuentes eventos en la membrana como la perdida de energía. También se presume que la inhibición bacteriana por el tomillo se debe a su hidrofobicidad y a los puentes de hidrogeno de sus constituyentes fenólicos a proteínas de membrana, cambiando la permeabilidad y características de la membrana (Gallo & Manolo, 2011)

3.17 Componentes del orégano y acción antimicrobiana del orégano (*Origanum vulgare*)

- Ácidos: Rosmarínico, palmítico, esteárico, oleico, ursólico, cafeico, cáprico
- Aceite esencial rico en timol , cineol, carvacrol, borneol, beta-bisoboleno, limoneno, alfa pineno, beta pineno, mirceno, camfeno, alfa terpineno.
- Minerales: Potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, hierro
- Taninos
- Vitaminas : Niacina, beta-caroteno

La acción antimicrobiana del orégano posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, que provoca cambios en la composición de los ácidos grasos (Rodríguez S. , 2011)

3.18 Componentes del clavo de olor (*Zyzygium*)

- Aceite esencial: Rico en eugenol, cariofileno, furfural, vanillina, salicilato de metilo, pirocatecol, pineno y aldehídos valeriánicos
- Cromonas: Eugenina, isoeugenitol, isoeugenitina y eugenitina.
- Taninos
- Mucilagos
- Sitosterol
- Estigmaterol
- Resinas
- Celulosa
- Ácido oleanólico

La actividad antimicrobiana del clavo de olor se debe a los compuestos fenólicos, ya que estos compuestos pueden desnaturalizar las proteínas y al mismo tiempo reaccionan con los fosfolípidos de la membrana celular cambiando así su permeabilidad y produciendo la muerte microbiana (Aguilar & Lopez, 2016)

Como se muestra en la figura 8 algunas de las concentraciones mínimas inhibitorias de las especies son:

Planta de la cual se deriva el EO	Especie bacteriana	CMI rango aproximado(ul/ml)
Romero	<i>Escherichia coli</i>	4.5 -> 10
	<i>Salmonella typhimurium</i>	> 20
	<i>Bacillus cereus</i>	0.2
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.4 10
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.2
Oregano	<i>E. coli</i>	0.5 1.2
	<i>S. typhimurium</i>	1.2
	<i>S. aureus</i>	0.5 1.2
	<i>E. coli</i>	0.6
	<i>S. typhimurium</i>	2.5
	<i>S. aureus</i>	0.6
	<i>E. coli</i>	3.5 5
	<i>S. typhimurium</i>	10 20
	<i>S. aureus</i>	0.75 10
	<i>L. monocytogenes</i>	0.2
	<i>E. coli</i>	0.4 2.5
	<i>S. typhimurium</i>	> 20
	<i>S. aureus</i>	0.4 2.5
	<i>L. monocytogenes</i>	0.3
	<i>E. coli</i>	0.45 1.25
	<i>S. typhimurium</i>	0.450- > 20
	<i>S. aureus</i>	0.2 2.5
	<i>L. monocytogenes</i>	0.156 0.45
	<i>E. coli</i>	> 0.2
	<i>B. cereus</i>	0.2
<i>E. coli</i>	2.5 -> 80	
<i>Shigella dysenteria</i>	5 -> 80	
<i>S. aureus</i>	0.6 40	
<i>B. cereus</i>	5 10	

CMI = Concentración mínima inhibitoria

Figura 8 Concentraciones mínimas inhibitorias (Rodríguez y Saucedo, 2011).

La mayor causa del deterioro de la calidad de la carne y productos cárnicos es la oxidación lipídica. En este proceso se forman compuestos responsables del olor y sabor a rancio que, además, disminuyen la calidad nutricional. Por esto, se requieren preparar alimentos con una cantidad mínima inhibitoria aceptable que no perjudique al consumidor. Dentro de los estudios realizados en análisis sensoriales de hamburguesas de carne vacuna, el panel de catadores encontró que la concentración más palatable de estas fue de *150 mg/kg* (Medina, y otros, 2003)

Según la NTC 1325 los productos cárnicos procesados son aquellos elaborados a base de carne, grasa, vísceras u otros subproductos de origen animal comestible, proveniente de animales de abastos, con adición o no de sustancias permitidas o especias o ambas, sometido a procesos tecnológicos adecuados (ICONTEC, 2008)

3.19 Clasificación de los productos cárnicos

Las clasificaciones de los productos cárnicos son diversas y se basan en criterios tales como los tipos de materias primas que los componen, la estructura de su masa, si están o no embutidos, si se someten o no a la acción del calor o algún otro proceso característico en su tecnología de elaboración, la forma del producto terminado, su durabilidad o cualquier otro criterio o nombres derivados de usos y costumbres tradicionales (Venegas y Valladares, 1999)

Con base a la tecnología de elaboración, los productos cárnicos se clasifican así (Venegas y Valladares, 1999):

- Productos cárnicos crudos fermentados. Son aquéllos sometidos a un proceso tecnológico que no incluye un tratamiento térmico. Entre los que encontramos los productos cárnicos frescos, productos cárnicos crudos salados y los productos cárnicos crudos fermentados. Estos últimos son productos crudos elaborados con carne y grasa molidas o picadas o piezas de carne íntegras, embutidos o no que se someten a un proceso de maduración que le confiere sus características organolépticas y conservabilidad, con la adición o no de cultivos iniciadores y aditivos permitidos, pudiendo ser curados o no, secados o no y ahumados o no. Incluyen: chorizos, salamis, pastas untables, jamón crudo, salchichones y tocinetas crudos fermentados, sobreasada, pepperoni, cervelat y otros.
- Productos cárnicos tratados con calor. Son los que durante su elaboración han sido sometidos a algún tipo de tratamiento térmico. Aquí encontramos los productos cárnicos embutidos y moldeados, las piezas íntegras curadas y ahumadas, productos cárnicos semielaborados, y conservas cárnicas.

Tabla 5 Clasificación de los embutidos en seis categorías Kinsman (1980)

Tipo de embutidos	Características
Embutidos frescos	Elaborados a partir de carne picada condimentada y usualmente embutida en tripa natural. No están curados ni ahumados. Se deben someter a un tratamiento culinario antes de su consumo.
Embutidos cocidos	Fabricados a partir de carne picada, condimentada, curada y embutida en tripa. Están cocidos, pero no ahumados.
Embutidos cocidos y ahumados	Obtenido como los anteriores pero sometidos a un proceso de ahumado sin ningún tipo de tratamiento térmico.
Embutidos secos o semi-secos	Están elaborados con carne picada, condimentada y embutida en tripa. Se someten a un proceso de secado al aire bajo condiciones controladas de tiempo-temperatura-humedad. Pueden estar ahumados.
Especialidades cárnicas	Comprende una gran variedad de productos que tienen en común el hecho de estar preparados a partir de carne curada o no, picada o triturada, condimentada y normalmente cocidos más que ahumados.

Los embutidos fermentados se incluyen en la parte denominada “secos y semisecos” y pueden ser ahumados o no (Hernandez, 2013)

3.20 Concentración inhibitoria mínima (CMI)

Es la concentración del antibiótico requerida para impedir el crecimiento bacteriano a partir de la incubación de 10^5-6 bacterias en fase de crecimiento rápido, en un medio libre de proteínas con pH 7,2, aerobio, durante un periodo de incubación de una noche.

Este término es importante porque se utiliza para determinar la sensibilidad bacteriana a un agente antibiótico específico. Es importante recordar que las condiciones in vivo son distintas a las utilizadas para esta prueba que se realiza in vitro.

En un ser vivo la bacteria generalmente se encuentra un medio más ácido y anaerobio. Además, es mayor tamaño del inculo bacteriano y probablemente no está en fase rápida de crecimiento; lo cual disminuye el valor predictivo del MIC (Javeriana, 2000)

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de las especies en rama

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de las especies en rama se trabajaron dos metodologías, con el fin de determinar cuál de las dos permitía tener mejores resultados en la medición de la concentración mínima inhibitoria de las especies a evaluar en rama.

4.1.1 Metodología #1 Difusión en disco:

Las cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Salmonella spp* 14028, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva 25923, preservadas en glicerol se reactivaron al baño maria durante 5 minutos a 37 °C y posteriormente se sembraron por agotamiento en agar tripticasa soja durante 24 - 48 horas a 37°C. Para esporas de *Clostridium* sulfito reductor 13124 se utilizo la misma metodología con incubacion en anaerobiosis y *Listeria monocytogenes* 13923 con incubacion en microaerofilia.

Pasadas las 24 horas, se tomo 1 UFC de cada una de las cajas sembradas y se deposito en un tubo con 5ml de caldo tripticasa soja .

Posterior al proceso de incubacion se verifico el crecimiento y la concentracion por espectrofotometria a 600 nm en donde se obtuvo una concentracion de 10^8 UFC con un valor de 0.9 en absorbancia.

Las concentraciones que se utilizaron fueron 10%, 7.5%, 5.0% y 2.5%, las cuales se establecieron por medio de la formula %p/v que corresponde a:

$$\% \frac{p}{v} = \frac{P \text{ soluto}}{V \text{ solucion}} \times 100$$

Donde se utilizó como diluyente una solución de Tween 80 estéril al 10%. En morteros estériles se pulverizaron las especias en rama para proceder a pesarlas y realizar las concentraciones. Se tomaron discos de papel filtro de 6.5 mm de diámetro, los cuales fueron sumergidos en las concentraciones durante 20 minutos.

Se realizó una siembra masiva en agar tripticosa soja 5 cajas de cada microorganismo por cada concentración, es decir: para la concentración número 1 de clavo de olor con *Escherichia coli* ATCC 25922 se sembraron 5 cajas y a cada una se le pusieron cuatro discos previamente sumergidos en la concentración de la especia, y de esta manera se realizaron las demás concentraciones para cada uno de los microorganismos (ver figura 9). Para esporas de *Clostridium* sulfito reductor ATCC 13124 se realizó el mismo procedimiento y posterior a este se le adicionaron 8 cm de agar tripticosa soja para generar anaerobiosis.

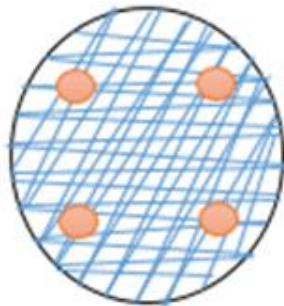


Figura 9 Caja de petri con los sensidiscos previamente sumergidos en la concentración de la especia.

Las siembras se llevaron a incubación a 37°C y se realizaron lecturas a las 24 – 48 horas.

Como control positivo se sembro el microorganismo con el sensidisco de antibiotico y como control negativo se sembro solo el microorganismo, ver Figura 10.

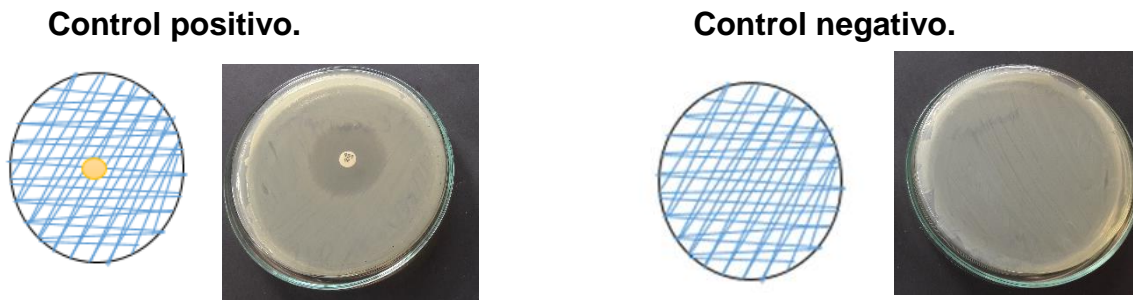


Figura 10 Controles positivos y negativos de la prueba

4.1.2 Metodología #2 prueba de capacidad de especies

Para iniciar se recuperaron las cepas ATCC según las recomendaciones del boletín técnico del INVIMA, se tomó 1 UFC en la fase estacionaria, la cual se llevó a cultivar en caldo Tripticasa soya durante 24 horas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se estandarizo el inóculo a una concentración de 10^8 microorganismos por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente en tubos estériles, uno para cada microorganismo, se adicionaron 9 ml de la concentración de especie a evaluar, inoculando 0,1 ml de la suspensión de los microorganismos de manera individual; realizando una siembra por profundidad en Agar Tripticasa Soja con 1 ml de la suspensión del microorganismo con la concentración de la especie en los tiempos 30 y 60 minutos. Se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.

5 RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Establecer la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la especia en rama Tomillo (*Thymus*), a nivel *in vitro* frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1325 para un producto carnico madurado fermentado.

Los resultados obtenidos para la evaluación de las especias en rama, frente a los microorganismos que son criterio microbiológico según la norma NTC 1325, permitió determinar resultados relevantes en la investigación como:

- Para la especia en tomillo en rama, no se obtuvo resultados de inhibición en ninguna de las 4 concentraciones evaluadas frente a microorganismos como: *Clostridium* ATCC 13124, *Listeria monocytogenes* ATCC 13923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como se evidencia en la tabla 6, sin embargo para el microorganismo *Salmonella* ATCC 14028 se obtuvo una inhibición en las concentraciones 10%, 7.5%, 5.0% y no se logró inhibición en la concentración 2.5% como se observa en la figura 11.

Tabla 6 Resultados Concentración mínima inhibitoria especia Tomillo en rama

Especia Tomillo + <i>Clostridium</i> ATCC 13124			
{}1	{}2	{}3	{}4
0	0	0	0

Especia Tomillo + <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13923			
{}1	{}2	{}3	{}4
0	0	0	0

Especia Tomillo + <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			
{}1	{}2	{}3	{}4
0	0	0	0

Especia Tomillo + <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
{}1	{}2	{}3	{}4
0	0	0	0

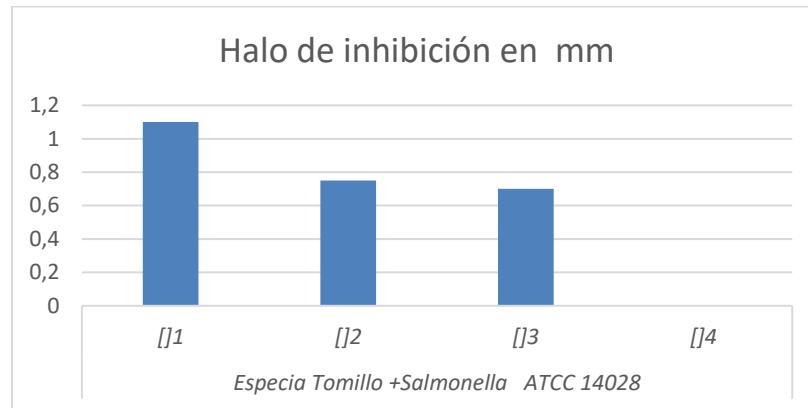


Figura 11 Halos de inhibición en mm de la especia tomillo frente a *Salmonella* ATCC 14028

El tomillo está constituido principalmente por timol, carvacrol, p-cimeno, limoneo, borneol, linalol, isoleucina, erodictol y betacarotenos; los cuales le confieren propiedades antimicrobianas frente a diferentes microorganismos; sin embargo, es importante tener en cuenta que la composición del tomillo siempre será variable y va a depender de la época y del lugar de la cosecha. (Garcia & Garcia, 2008)

Dentro de los componentes del tomillo, es el carvacrol el que más interés ha generado ya que se cree que su mecanismo de acción es el que más influye en el efecto antimicrobiano de la especia. El carvacrol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando con ello la salida del ATP, inhibición de las ATPasas y disminución de la fuerza motriz del protón. (Garcia & Garcia, 2008). Este mecanismo fue respaldado por un estudio que utiliza citometría de flujo y tintes fluorescentes específicos para detectar la fuga de componentes específicos de células que han sido expuestas a carvacrol y timol (Victor Ryu, G.Corradini, & McLandsborough, 2017).

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de la especia tomillo en rama por el método de difusión en disco y la prueba de capacidad de especias se obtuvieron como resultados que esta especia presenta un mayor efecto inhibitorio frente a *Salmonella* que frente a los otros microorganismos, lo cual se puede evidenciar con en el estudio realizado por Paola Nataly en el año 2011, en donde tenía como objetivo encontrar la CIM del tomillo y del orégano frente a

Salmonella en carne de pollo para determinar cuál tenía un mejor efecto inhibitorio frente a este microorganismo; en donde obtuvo como resultado que el mayor efecto inhibitorio contra *Salmonella* corresponde a la especia de tomillo sin diluir, es decir, el tomillo más concentrado, en el cual se obtuvo un halo de inhibición de 18mm, superando al patrón Streptomicina de 10 µg/µL que formó un halo de 17 mm y las concentraciones de 10.000, 5.000, 2.500, 1.250 mg/mL no presentaron inhibición frente a *Salmonella spp.* (Campoverde, 2011).

Pese a que solo se obtuvieron resultados de la capacidad antimicrobiana del tomillo en rama frente a *Salmonella* hay diversos estudios que demuestran que la actividad inhibitoria de la especia es más efectiva si se emplea en aceite esencial y no en rama. De hecho, hay nuevas investigaciones y nuevos estudios que emplean en los alimentos nanoemulsiones de estos aceites esenciales, demostrando que la capacidad antimicrobiana es buena e incluso más efectiva que otros tratamientos antimicrobianos convencionales. Por ejemplo, Landry en el 2014-2015 demostró que las nanoemulsiones de carvacrol son altamente efectivas para inhibir el crecimiento de *Salmonella enteritidis* o *E. coli O157: H7* en semilla de frijol mungo, semillas de alfalfa, brócoli y rábano contaminado (Victor Ryu, G.Corradini, & McLandsborough, 2017).

En el año 2006, Herrera realizó un estudio sobre la evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario, donde encontró que el extracto de tomillo presentaba un notorio efecto inhibitorio frente a *Salmonella spp.*, en donde se evidenciaban halos de inhibición de 15 mm. Estos resultados fueron coherentes con los hallados por Friedman y col en el 2002, quienes, analizando extractos de clavo, orégano, canela, mejorana, tomillo, entre otros, sobre *Salmonella enteritidis*, encontraron que el de tomillo fue uno de los más efectivos (Arias, 2006).

5.2 Establecer la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la especia en rama Oregano (*Origanum vulgare*), a nivel *in vitro* frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1325 para un producto carnicó madurado fermentado.

La especia Orégano en rama, no presentó ningún efecto antimicrobiano que se pudiera evidenciar con los halos de inhibición, en ninguna de las cuatro concentraciones evaluadas, frente a los 5 microorganismos estudiados, como se puede evidenciar el crecimiento del microorganismo sin inhibición por parte de la especia, figura 12.



Figura 12 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de la especia Orégano en rama

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de la especia Orégano en rama por el método de difusión en disco, no se obtuvo inhibición del crecimiento microbiano para ninguno de los microorganismos estudiados, indicando que los compuestos antimicrobianos presentes en el orégano utilizado no presentaron actividad antimicrobiana, lo que no concuerda con autores como, Chica, Gill y Holley los cuales mencionan que el carvacrol es quizá el compuesto más importante y más estudiado en la composición del orégano, ya que tiene una gran actividad antimicrobiana y antifúngica frente a diferentes microorganismos. En un estudio realizado en el 2006 por Gill y Holley encontraron que el carvacrol actúa sobre *Listeria monocytogenes* inhibiendo la actividad ATPasa en la membrana celular; además de esto, encontraron que este agente puede inhibir la producción de adenosina, trifosfato, dextrosa y afectar la membrana. (Perez & Prieto, 2007). Sin embargo, la variabilidad del efecto antimicrobiano del orégano se puede ver influenciado por las diferencias cualitativas y cuantitativas de los componentes individuales del orégano empleado en el estudio, es también importante mencionar que el orégano utilizado fue en forma de rama, lo cual disminuye su acción antimicrobiana como se evidencia en la investigación realizada en el 2016 por Pamphile Tawema, Jaejoon Han, Khanh

Dang Vu, Stephane Salmieri y Monique Lacroix, donde mencionan que al emplear el orégano en forma de aceite esencial combinado con ácidos orgánicos o aceites cítricos se logra un mayor efecto antimicrobiano que si se emplea el orégano en rama, pues en las investigaciones realizadas ellos encontraron que los ácidos orgánicos (OA) y los aceites esenciales (EO) son antimicrobianos naturales que se han utilizado con éxito en la industria de alimentos listos para el consumo (Tiwari et al., 2009), ya que el combinar aceites esenciales y ácidos orgánicos ha demostrado ser eficaz como una alternativa a los promotores del crecimiento antimicrobiano. Además, se ha informado la existencia de un efecto antibacteriano sinérgico significativo por la combinación de aceites cítricos contra *L. monocytogenes* (Friedly et al., 2009). En experimentos previos Tawema, Han, Salmieri, Vu y Lacroix, 2014, desarrollaron dos formulaciones antimicrobianas naturales que se componen de aceite esencial de limoncillo (para formulación asiática) y aceite esencial de orégano (para formulación mediterránea) más extracto de cítricos y ácido láctico. Estas formulaciones fueron activas contra varios patógenos transmitidos por los alimentos inoculados en diversos alimentos como la coliflor. (Tawema, Han, Vu, Salmieri, & Lacroix, 2016)

Por otra parte, el orégano en aceite esencial se ha usado para la inactivación de *Salmonella typhimurium* en lechuga (Gunduz, Gönül y Karapınar, 2010) y los extractos cítricos muestran actividades antimicrobianas contra diferentes patógenos transmitidos por los alimentos (*E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Bacillus sp.* Y *Clostridium sp.*, *Staphylococcus aureus*), (Tawema, Han, Vu, Salmieri, & Lacroix, 2016).

En el año 2007, María Alejandra Cubillo realizó un estudio de determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especias naturales sobre microorganismos asociados a alimentos empleando especias nativas y especias importadas, donde reporta que la actividad antimicrobiana de las especias importadas es mayor al de las especias nativas, lo cual es atribuido a que las especias importadas son sometidas a estrictos procesos de calidad, los cuales garantizan que el producto se encuentre libre de microorganismos antes de ser utilizado. (Arrieta, 2007)

La concentración mínima inhibitoria para la especia orégano reportada en estudios realizados por Burt, Reinder y Prudent en un salami es de 2,1 ul/ml para *Salmonella typhimurium*,

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*. Esta concentración mínima inhibitoria fue obtenida por medio de pruebas *in vitro*. Igualmente, encontraron que esto no siempre se cumple puesto que la composición de la especia es afectada por diversos factores entre los que se encuentran el origen geográfico de la planta y la estación del año de cosecha. De igual forma, indicaron que se pueden observar variaciones en la composición química, en donde los contenidos de carvacrol y timol varían entre plantas de la misma especia. (Sánchez & Malo, 2009)

5.3 Establecer la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la especia en rama Clavo de olor (*Syzygium*), a nivel *in vitro* frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1325 para un producto carnico madurado fermentado.

El clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) es una especia aromática importante. El clavo no solo contiene muchos tipos de composiciones biológicas activas, sino que también tiene funciones antibacterianas altamente efectivas y completas. La especia clavo de olor posee actividades biológicas antibacterianas antifúngicas, insecticidas y antioxidantes, atribuidas al eugenol y al aldehído cinámico, quienes son sus principales constituyentes, y se utilizan tradicionalmente como saborizantes y como antimicrobianos en los alimentos (Castaño, 2012). Su aceite esencial contiene principalmente fenilpropanoides, como eugenol, β -cariofileno y compuestos orgánicos de α -humuleno (Wanga, y otros, 2017).

Los resultados obtenidos con la especia clavo de olor, demostraron que no tiene propiedades antimicrobianas frente a los microorganismos *Clostridium* ATCC 13124 y *Listeria monocytogenes* ATCC 13923, en ninguna de las 4 concentraciones evaluadas, como se evidencia en la Tabla 7.

Tabla 7 Resultados Concentración mínima inhibitoria especia Clavo de olor en rama

Especia Clavo de olor + <i>Clostridium</i> ATCC 13124			
[]1	[]2	[]3	[]4
0	0	0	0

Especia Clavo de olor + <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13923			
[]1	[]2	[]3	[]4
0	0	0	0

Es importante resaltar la actividad antimicrobiana que presentó el clavo de olor frente a los microorganismos Gram-negativos *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* ATCC 14028 pues se obtuvo halo de inhibición en las 4 concentraciones, con una concentración mínima inhibitoria del 2.5 % como se puede evidenciar en la figura 13 y 14 respectivamente. Para los microorganismos Gram-positivos, no se obtuvo halos de inhibición como se dijo anteriormente, excepto para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en el cuál las concentraciones 10% y 7.5% tuvieron efecto antimicrobiano frente a este microorganismo figura 15.

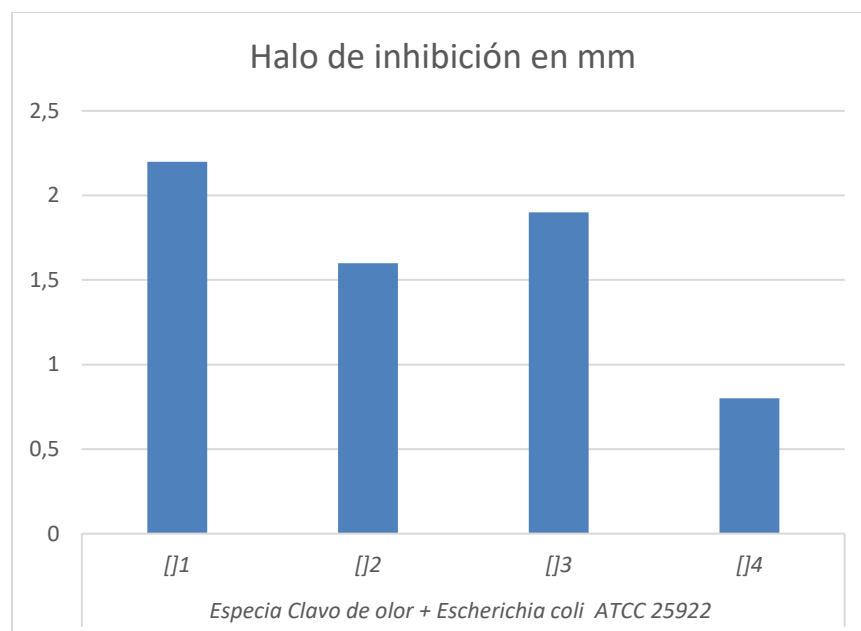


Figura 13 Halos de inhibición en mm de la especia clavo de olor frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

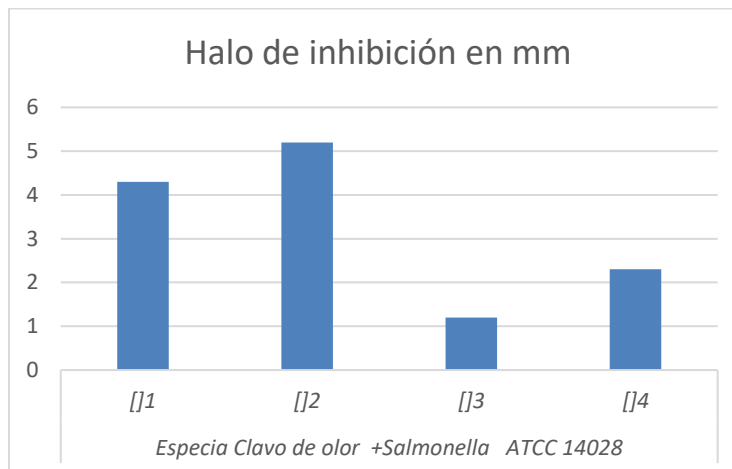


Figura 14 Halos de inhibición en mm de la especia clavo de olor frente a *Salmonella* ATCC 14028

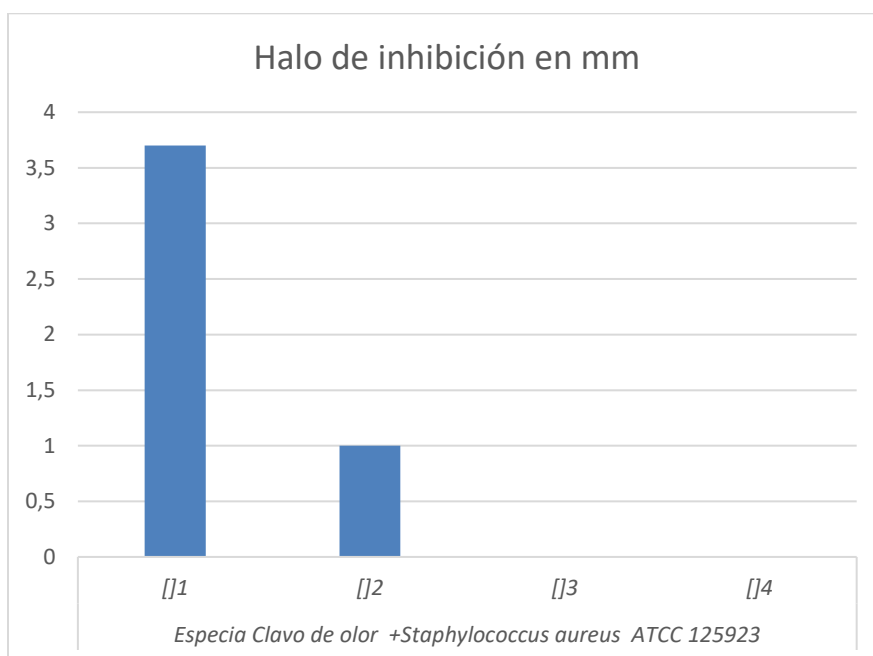


Figura 15 Halos de inhibición en mm de la especia clavo de olor frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de la especia clavo de olor en rama por el método de difusión en disco y la prueba de capacidad de especias se obtuvieron resultados muy significativos, pues se logra evidenciar la capacidad inhibitoria que presenta la especia frente a microorganismos como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC

25923 y *Salmonella* ATCC 14028, resultados que se relacionan con los obtenidos por Gupta, Carg y Uniyal quienes en el año 2009 realizaron un estudio para comparar las actividades antimicrobianas del clavo de olor frente a diferentes microorganismos, donde demostraron que la especia era efectiva contra casi la totalidad de los microorganismos estudiados, siendo *S. aureus* el más sensible pues evidenciaba un menor valor en la CIM. (Gonzalez & Malo, 2013).

Por otro lado, Yenis, Alba y Diofanor realizaron un estudio en el año 2017 donde querían estudiar el efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre los patógenos *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* utilizando el método de difusión en agar, y diluciones dobles en caldo, donde encontraron que la especia de clavo de olor no era tan exitosa frente a *Salmonella*, puesto que las concentraciones que estudiaron no obtuvieron ningún grado de inhibición que fuera considerable o aceptable. Sin embargo, frente a *E. coli* y *S. aureus*, lograron observar el efecto antimicrobiano con la mayor concentración de 150 mg/mL, lo cual es posible por la presencia de alcaloides, oxhidrilos fenólicos, y el eugenol presente en el clavo de olor. (Puche, Villadiego, & Correa, 2017)

En cuanto a *S. aureus* los resultados de nuestro estudio concuerdan con lo reportado por García Caramillo y Yenis, Alba y Diofanor, quienes demostraron que el extracto de clavo de olor presenta un efecto antibacteriano principalmente contra *S. aureus*, lo cual se debe a que el clavo de olor contiene una alta concentración de trans-cinamaldehído, que es el componente en mayor proporción, también presenta linalol, eugenol y otros compuestos fenólicos. Otros estudios, han identificado al trans-cinamaldehído como el mayor componente antibacterial de esta especia y actúa inhibiendo las amilasas y proteasas provocando el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular (Puche, Villadiego, & Correa, 2017).

Sorprendentemente, el clavo tiene fuertes actividades antimicrobianas contra una amplia gama de microorganismos patógenos; pero es importante resaltar que estas actividades antimicrobianas son más efectivas cuando se emplea la especia en aceite esencial, pues se logran obtener resultados de inhibición bacteriana más contundentes. Actualmente, se está desarrollando la tecnología de microencapsulación, la cual permite que los extractos de la especia sean protegidos contra el deterioro, las pérdidas volátiles o la interacción con otros

ingredientes, ya que dichas concentraciones de la especia son rodeadas por una pared que actúa como barrera física y evita que se pierdan los componentes necesarios para que se lleve a cabo el efecto conservante en los diferentes productos alimenticios (Wanga, y otros, 2017).

La metodología #2, denominada prueba de capacidad de especias no mostró resultados que logran evidenciar la capacidad antimicrobiana de las especias en rama frente a los microorganismos estudiados. Esto puede ser debido a que 9 ml de la suspensión de la concentración de especia a evaluar no es suficiente para lograr inhibir los microorganismos. Sumado a esto, es posible que el tiempo de contacto tampoco sea el adecuado y quizá sea necesario un mayor tiempo de exposición de la especia con el microorganismo para lograr que los componentes antimicrobianos presentes en la especia logren reaccionar y ejercer su mecanismo de acción sobre los microorganismos, logrando así un efecto antimicrobiano.

6. CONCLUSIONES

- La especia de Tomillo (*Thymus*) en rama, a nivel *in vitro* fue mas efectiva frente a la cepa de *Salmonella* ATCC 14028, en donde empleando la concentracion 1 se presentaron halos de inhibición de hasta 1 mm, pero pese a esto no mostro una buena actividad inhibitoria ya que en varios estudios realizados previamente se evidencian resultados con halos de inhibición mayores. Por otro lado, esta especia no podria ser empleada para la elaboración del producto carnico fermentado puesto que no inhibiria en su totalidad los otros microorganismos que son de importancia microbiologica y transmiten enfermedades a los consumidores.
- En cuanto a la especia del Oregano (*Origanum vulgare*) en rama se evidencia que ninguna de las concentraciones empleadas fue la indicada para inhibir el crecimiento de los microorganismos estudiados, puesto que en ninguna se logro apreciar halos de inhibicion que indicaran la negatividad de los medios de cultivo para los microorganismos en estudio. Debido a esto, es necesario que en futuras investigaciones sean utilizadas y analizadas nuevas concentraciones de la especia, las cuales sean mas eficientes y logren inhibir los microorganismos de importancia.
- La especia Clavo de olor (*Zyzygium*) en rama fue la que mejores resultados presento, evidenciando que esta especia tiene una mayor capacidad inhibitoria frente a los microorganismos estudiados puesto que mostro halos de inhibicion de hasta 2, 3 y 5 mm en 3 de los 5 microorganismos. De acuerdo a esto, se puede concluir que esta fue la especia con la que mejores resultados se obtuvieron y por lo tanto, seria la especia empleada para la elaboracion del producto; pero es importante resaltar que aunque se empleen las diferentes concentraciones de la especia no se garantizaria que el producto carnico fermentado madurado fuese totalmente inocuo, ya que microorganismos como esporas de *Clostridium* ATCC 13124 y *Listeria monocytogenes* ATCC 13923 no serían inhibidos.

7. RECOMENDACIONES

A partir del estudio realizado previamente, se pretende que el diseño experimental, sirva como ejemplo, no solo por el diseño que se propone, sino por su interés social al querer disminuir conservantes en los cuales se ha demostrado su efecto secundario en la salud del ser humano. Esto, llegando a ser posible gracias a la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de diferentes especias frente a microorganismos de interés público hacia un producto cárnico madurado fermentado.

A continuación, se describen algunas recomendaciones:

- Se sugiere realizar más investigaciones con productos de origen natural para conservación de alimentos, ya que son productos de fácil acceso sin muchos efectos secundarios.
- Es importante destacar que es necesaria la realización de futuras investigaciones en donde se involucre un mayor número de datos estadísticos con el fin de aumentar la confiabilidad de los resultados.
- Trabajar en perfeccionar el modelo que se adoptó para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de las especias en rama de tomillo (*Thymus*), orégano (*Origanum vulgare*), clavo de olor (*Syzygium*).
- Explorar otras metodologías en las cuales se analicen los extractos puros de las especias en rama de tomillo (*Thymus*), orégano (*Origanum vulgare*), clavo de olor (*Syzygium*).
- Se considera necesario indagar otra forma de obtener los extractos de las especias, de esta forma se podrá asegurar su inocuidad y su pureza.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (Vida/Salud), E. T. (27 de Octubre de 2015). *Minsalud pide tomar anuncios sobre carnes rojas sin alarmismos*. Obtenido de El Tiempo:
<http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-16414516>
- Aguilar, G., & Lopez, M. (15 de Mayo de 2016). *Extractos y aceite esencial del clavo de olor (Syzygium aromaticum) y su potencial aplicacion como agentes antimicrobianos en alimentos*. Obtenido de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Aguilar-Gonzalez-et-al-2013.pdf>
- Arias, H. (2006). Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 13-19.
- Arrieta, M. A. (Julio de 2007). *Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especias naturales sobre microorganismos asociados a alimentos*. Obtenido de Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especias naturales sobre microorganismos asociados a alimentos:
<http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/1050/1/28069.pdf>
- Bastos, O. M., Damé, S. L., Souza, P., Almeida, S., & Alves, R. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Revista cubana de plantas medicinales* .
- Campoverde, P. N. (2011). *Evaluacion de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de oregano (Origanum vulgare L.) y tomillo (Thymus vulgaris L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo*. Obtenido de Evaluacion de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de oregano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo:
<http://dspace.esepoch.edu.ec/bitstream/123456789/1992/1/56T00300.pdf>
- Cardona, & Mejia. (2009). Evaluacion del efecto antioxidante. *Biosalud*, 59-70.
- Castaño, M. V. (2012). *Evaluacion de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (Syzygium aromaticum) y canela (Cinnamomum verum), sobre la levadura (Rhodotorula mucilaginosa) en leche chocolatada*. Obtenido de Evaluacion de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*), sobre la levadura (*Rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9149/1/43013611.2012.pdf>
- DAM, C. (9 de noviembre de 2015). *Clinica DAM, Especialistas medicas*. Obtenido de Clinica DAM, Especialistas medicas: <https://www.clinicadam.com/>
- Discovery. (9 de Noviembre de 2015). *Discovery salud*. Obtenido de Discovery salud:
<http://www.ds salud.com/index.php?pagina=articulo&c=490>
- Elikagaien, N., segurtasunerako, & Fundazio, E. (2013). Fundacion vasca para la seguridad agroalimentaria . *Elika*.
- Forbes, B. A. (2009). *Diagnostico microbiologico* . panamericana .
- Freixanet, L. (2010). Aditivos e ingredientes en la fabricación de productos cárnicos cocidos de músculo entero. *Metalquimica* , 28-41.
- Gallo, R., & Manolo, L. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*). *Temas secretos de ingenieria de alimentos* , 41-50.

- Garcia, R. M., & Garcia, E. P. (2008). Mecanismos de accion antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interes en alimentos. *Temas selectos de ingenieria de alimentos 2*, 41-51.
- Garcia, R. M., & Garcia, E. P. (2008). Mecanismos de accion antimicrobiana de Timol y Carvacrol sobre microorganismos de interes en alimentos. *Temas selectos de ingenieria de alimentos 2*, 41-51.
- Gerard, T., Berdell, F., & Case, h. (2007). *Introduccion a la microbiologia*. panamericana.
- Gonzales, G. (30 de Octubre de 2015). ¿Cuántos embutidos y carnes rojas consumen los caleños? *El Pais*.
- Gonzalez, A. E., & Malo, A. (2013). Extractos y aceite esencial del clavo de olor y su potencial aplicacion como agentes antimicrobianos en alimentos. *Temas selectos de ingenieria de alimentos 7*, 35-41.
- Hernandez, A. (2013). *Microbiologia Industrial*. Editorial Universidad Estatal y a distancia .
- ICMSF. (1998). *Microbiologia de los alimentos*. España: Acribia, S.A.
- ICONTEC, I. C. (20 de Agosto de 2008). *Norma tecnica NTC Colombiana 1325*. Obtenido de Industrias alimentarias. Productos carnicos procesados no enlatados.
- INAES. (9 de Abril de 2016). *INAES*. Obtenido de INAES:
http://www.inaes.gob.mx/doctos/pdf/guia_empresa/embutidos.pdf
- Javeriana, U. (2000). *Universidad Javeriana*. Obtenido de Introducción al tema de antibióticos:
<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/cintro.htm>
- Medina, R., Dupertuis, L., Amadio, C., Espejo, C., Dip, G., & Raimondo., E. (2003). Aceite esencial de tomillo como antioxidante y conservador en hamburguesas funcionales. *FCA UNCuyo*, 13-23.
- Mora, C. (2005). *La dinamica del consumo en Colombia 1999-2005*.
- Nychas, Skandamis, & Tassou. (2003). Antimicrobials from herbs and spices. 177-199.
- Perez, D. d., & Prieto, L. M. (Octubre de 2007). *Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Minthostachys mollis combinado con inactivacion termica sobre cepas de Listeria monocytogenes y Bacillu cereus*. Obtenido de Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Minthostachys mollis combinado con inactivacion termica sobre cepas de Listeria monocytogenes y Bacillu cereus:
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis101.pdf>
- Puche, Y. I., Villadiego, A. M., & Correa, D. (2017). Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patogenos . *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 56-65.
- Raibaudi, R., Fortuna, R., & Belloso, O. (2006). Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas.
- Republica, U. d. (2013). *Temas de bacteriología y virología médica*.
- Rodríguez, A. (2010). Enterobacterias. *medicine*.
- Rodriguez, c. (2005). *Preparacion de masas y piasas carnicas* . Ideas propias editorial S.L.
- Rodriguez, S. (2011). *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservacion*.
- Sánchez, A., & Malo, A. (2009). Potencial Antimicrobiano de los aceites esenciales de óregano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, 33-45.
- Tawema, P., Han, J., Vu, K. D., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effects of combined UV-C or gamma radiation with natural antimicrobial formulations against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and total yeasts/molds in fresh cut cauliflower. *LWT - Food Science and Technology*, 451-456.

- Victor Ryu, D. J., G. Corradini, M., & McLandsborough, L. (2017). Effect of ripening inhibitor type on formation, stability, and antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsion. *Food Chemistry*, 104-111.
- Wanga, Y.-F., Jiaa, J. X., Tiana, Y. Q., Shua, X., Rena, X. J., Guana, Y., & Yanb, Z. Y. (2017). Antifungal effects of clove oil microcapsule on meat products. *Food Science and Technology*, 604-609.