

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE
LAS ESPECIAS EN ACEITE, 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**

**DIANA MARISOL FIGUEROA ARCINIEGAS
VIVIANA PATRICIA NARVAEZ ZAMBRANO**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGIA Y
BIOTECNOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2018**

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE
LAS ESPECIAS EN ACEITE, 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**

**DIANA MARISOL FIGUEROA ARCINIEGAS
VIVIANA PATRICIA NARVAEZ ZAMBRANO**

**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
2018**

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, 25 de enero de 2018

AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios por LA VIDA, fortaleza y por llenarme de bendiciones, a mis padres por el apoyo incondicional, a la Universidad Católica de Manizales por la oportunidad de ser parte de ella, y mis más sinceros agradecimientos a nuestra directora de proyecto Jennifer Gaviria Giraldo por su tiempo su interés y dedicación al ser un guía en todo este transcurso y finalmente a mi compañera de trabajo Viviana patricia Narváez por su colaboración ayuda y entrega durante todo este proceso que no fue fácil.

Diana Marisol Figueroa Arciniegas

En primer lugar doy infinitas gracias a Dios por darme la fuerza y el valor de terminar este proceso de formación, a mis padres, hermanos y mi familia por el apoyo y confianza brindado durante todo este tiempo, a mi tutora Jennifer Gaviria Giraldo por su tiempo dedicado y conocimientos brindados, a la Universidad Católica de Manizales por permitirme formar parte de ella y abrirme sus puertas al seno científico para poder estudiar mi carrera, al Programa de Bacteriología por permitirme realizar este trabajo y ser presentado a ellos, a cada docente por hacer parte de este proceso integral de formación, que deja como producto un gran conocimiento para nosotras y para aquellos que quieran seguir los procesos de investigación.

Viviana Patricia Narváez Zambrano

DEDICATORIA

Dedicado a Dios y a mis padres por su AMOR confianza y acompañamiento, en este largo, pero provechoso proceso, a mis hermanas y sobrina por su cariño y sus consejos para seguir siempre a pesar de las dificultades durante mi carrera y aquellas personas que hicieron parte de esta etapa de mi vida para lograr mi título a Bacterióloga.

Diana Marisol Figueroa Arciniegas

A Dios, por permitirme llegar hasta aquí y guiarme por el mejor camino en los momentos difíciles. A mi padre Hugo Narváez y madre Miriam Zambrano, quienes me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento, por ser unos padres ejemplares, por darme su cariño, confianza, apoyo y consejos que me han servido para culminar mi carrera profesional. A mis hermanos, por sus consejos y experiencias que me han ayudado afrontar todos los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida. A mi profesora y tutora Jennifer Gaviria Giraldo, gracias por su tiempo, apoyo, confianza y conocimiento en la realización de este trabajo y a todas aquellas personas que formaron parte de este proyecto.

Viviana Patricia Narváez Zambrano

CONTENIDO

1. INTRODUCCION	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo general.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. MARCO TEORICO.....	15
3.1 Aditivos en derivados cárnicos.....	15
3.2 Aditivos naturales	15
3.3 Actividad antimicrobiana de los aditivos naturales.....	15
3.4 Microorganismos Gram negativos.....	16
3.4.1 <i>Escherichia coli</i>	16
3.4.2 <i>Salmonella spp</i>	16
3.5 Microorganismos gram positivos	17
3.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.5.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	17
3.5.3 <i>Clostridium perfringers</i> Esporas sulfito reductor.....	17
3.6 Componentes del Oregano y Acción antimicrobiana del Oregano (<i>Origanum vulgare</i>).....	18
3.7 Componentes del Tomillo y Acción antimicrobiana del Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).....	18
3.8 Componentes del Clavo de olor y Accion antimicrobiana del Clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	18
3.9 Clasificación de los productos cárnicos.....	18
4.0 Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).....	19
4. MATERIALES Y METODOS.....	20
4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de las especies en aceite.....	20
4.1.1 Metodología de Difusión en disco.....	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21

5.1 Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la especia en aceite Orégano (<i>Origanum vulgare</i>), a nivel in vitro frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1235 para un producto cárnico madurado fermentado.....	21
5.2 Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la especia en aceite Tomillo (<i>Thymus</i>), a nivel in vitro frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1235 para un producto cárnico madurado fermentado.....	23
5.3 Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la especia en aceite Clavo de olor (<i>Zyngium</i>), a nivel in vitro frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1235 para un producto cárnico madurado fermentado.....	25
6. CONCLUSIONES.....	28
7. RECOMENDACIONES.....	30
8. BIBLIOGRAFIA.....	31

LISTA DE TABLAS

- ✓ **Tabla 1** Resultados de la concentración mínima inhibitoria de la especia Orégano en aceite esencial.....24
- ✓ **Tabla 2** Resultados de la concentración mínima inhibitoria de la especia Tomillo en aceite esencial.....27

LISTA DE FIGURAS

- ✓ **Figura 1** Halos de inhibición en mm de la especia Orégano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.....25
- ✓ **Figura 2** Halos de inhibición en mm de la especia Tomillo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.....27
- ✓ **Figura 3** Halos de inhibición en mm de la especia Tomillo frente a *Clostridium perfringers* ATCC 13124.....27
- ✓ **Figura 4** Halos de inhibición en mm de la especia Clavo de olor frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.....30
- ✓ **Figura 5** Halos de inhibición en mm de la especia Clavo de olor frente a *Salmonella spp* ATCC 14028.....30
- ✓ **Figura 6** Halos de inhibición en mm de la especia Clavo de olor frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.....31
- ✓ **Figura 7** Halos de inhibición en mm de la especia Clavo de olor frente a *Clostridium perfringers* ATCC 13124.....32

1.0 INTRODUCCION

Hoy en día los embutidos son los alimentos que se consumen en altas cantidades por parte de la población y se distinguen por su popularidad, por ser los más conocidos y fáciles de preparar (Gianina, 2014). Sin embargo, los avances tecnológicos y la globalización de la economía, que cada vez se presenta con mayor frecuencia, han impactado la industria alimentaria con el uso de distintos aditivos para la elaboración de estos productos, los cuales al hacerlos parte de la dieta habitual de las personas pueden provocar efectos negativos sobre la salud del consumidor, siendo perjudiciales para ellos (Bejarano & Suarez, 2015). En especial las sales de curado (Nitritos y Nitratos), quienes se encuentran en altas concentraciones en estos productos y se encargan de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos (Bazán, 2008).

Debido a todos los problemas y controversias que ha generado el uso de los nitratos y nitritos como conservantes en los alimentos, en la actualidad se ha pensado en la necesidad de elaborar nuevas alternativas de conservación para este tipo de productos, con el fin de que no contengan ningún tipo de aditivos químicos y sean inocuos, sin afectar la salud del consumidor (Rodríguez, 2011). Por lo tanto, se ha incrementado la investigación y se ha pensado en la elaboración de productos cárnicos con extractos naturales, es decir sin nitratos y nitritos, entre estas alternativas se ha planteado la adición de ingredientes de origen natural, incluyendo especias en aceite esencial, entre ellos están: el orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) (Bazán, 2008). Ya que han demostrado que el uso de estas especias usualmente molidas, en aceites esenciales u oleorresinas, presentan un alto poder antimicrobiano y antioxidante y las propiedades antibacterianas que presentan actúan sobre los microorganismos, desestabilizando la estructura de su pared celular y aumentando su permeabilidad, generando así la salida de iones, metabolitos y demás moléculas que conllevan a la muerte celular (Medrano, 2013). Generando un menor riesgo para la salud e igualmente aportando 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, *et al*, , 2011).

Según un estudio realizado por Kantar Worldpanel existen varios países en los cuales hay un alto consumo de estos productos en especial de salchichas, sobre todo en aquellos hogares donde hay niños y adolescentes (La Voz,

2015). Sin embargo el consumo de estos productos presenta graves riesgos para la salud de las personas, entre los cuales se encuentra el aumento de la metahemoglobinemia, causada por la toxicidad de los nitratos al ser ingeridos en estos alimentos, los cuales transforman la hemoglobina a metahemoglobinemia, produciendo una posible cianosis, además de ello pueden causar producción de carcinógenos causantes del desarrollo de cáncer nasofaríngeo, esofágico y gástrico y en los niños puede generar una mayor acidez gástrica haciéndolos más susceptibles a que haya una mayor ingesta de agua (Antón y Lizaso, 2001).

Además de ello también puede desarrollarse una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, debido a que los nitritos al añadirse como conservantes o agentes antibacterianos, son causantes de un alto estrés oxidativo en el pulmón y la sangre, impidiendo que los eritrocitos cumplan su función respiratoria (Matey, 2012). Otros problemas que pueden presentarse según lo menciona la OMS, es el desarrollo de cáncer colorectal, de páncreas y de próstata, lo que indica que el consumo de estos productos procesados debe darse en cantidades moderadas para disminuir el riesgo de adquirir estas enfermedades (Federación Hipercolesterolemia Familiar (FHF) 2015). Así como también se pueden producir problemas de insuficiencia cardíaca, cambios en la presión arterial llevando hasta la hipertensión y a nivel del sistema urinario se presenta la formación de cálculos renales como los de oxalato de calcio, entre otros pudiendo causar la muerte (Ríos, 2015).

El implementar esta nueva alternativa de conservación, se debe a la acción bacteriostática dada por los aceites esenciales, en especial por la presencia de ciertos compuestos antimicrobianos de origen natural, entre los cuales se encuentra el carvacrol y el timol (Bastos, Damé, Souza, *et al*, 2011). Según García habla que cuando la concentración de carvacrol aumenta, se acumula mayor cantidad en la membrana y por consiguiente el daño en la membrana es mucho mayor. (García & García, 2008). Los aceites esenciales se pueden obtener a partir de las hojas, tallos, semillas, flores de las plantas (Alimentos, 2002), las cuales han sido utilizadas desde tiempos atrás y hasta la actualidad, con el fin de prevenir el desarrollo de cualquier tipo de enfermedad (Rodríguez, 2011).

Entre las principales especias se encuentra:

- ✓ El orégano (*Origanum vulgare*) es una planta que posee un alto potencial y contiene diversas sustancias antioxidantes, por lo que no sólo se considera como benéfico para la salud humana, sino que además puede ser utilizado para sustituir los aditivos sintéticos en la producción de los alimentos. Además, se conoce que los aceites

esenciales del orégano actúan como inhibidores de la mutagenicidad, propiedad que ha despertado el interés en muchas personas por el uso de este tipo de hierbas, como un posible tratamiento contra el cáncer. Algunos estudios han demostrado que un pollo almacenado a 4°C con orégano y tomillo, fue altamente tóxico para *Salmonella typhimurium*, *Campilobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes* (Barboza, Vázquez, Salcedo, & Bautista, 2004). Los resultados de los experimentos con el orégano confirman el alto potencial de esta planta y promueven a que haya un mejor aprovechamiento (Arcila, Loarca, Salvador, et al, 2004).

- ✓ El Tomillo (*Thymus vulgaris*) entre sus características están ser una planta aromática y leñosa (Rosas, Lopez, 2011). Estudios realizados recientemente demostraron que esta planta contiene componentes fenólicos como el timol anetol y boneol en las hojas y carvacrol y anetol en toda la planta, lo cual hace que tenga una gran propiedad antimicrobiana contra diversos microorganismos de interés en alimentos (Rosas & Lopez, 2011). En estudios realizados se confirmó que sobre células de *B. cereus* y *Clostridium botulinum*, el timol puede inhibir algunos de los procesos como la germinación, crecimiento y multiplicación celular, e igualmente timol depende de ciertos factores como el tipo de microorganismo, pH del medio y temperatura de incubación (García & García, 2008). Su propiedad antimicrobiana se debe a su carácter lipofílico en la acumulación en membranas pérdida de energía, y en cuanto a la inhibición bacteriana 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).
- ✓ El clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) no solo aporta propiedades para la conservación de los alimentos sino también aportan olor y sabor a los productos (Aguilar & Lopez, 2013). Es una especia ampliamente usada y conocida, debido a la actividad antimicrobiana dada por sus compuestos fenólicos, ya que estos compuestos que pueden desnaturalizar las proteínas y al mismo tiempo reaccionar con los fosfolípidos de la membrana celular, cambiando así su permeabilidad y produciendo la muerte microbiana (Aguilar & Lopez, 2016). Además, se ha demostrado que tiene un amplio espectro de acción frente a una gran cantidad de microorganismos causantes de distintos padecimientos que afecta a los humanos (Aguilar & Lopez, 2016).

Los aceites y extractos de plantas principalmente el orégano, tomillo y clavo de olor y algunos otros, presentan actividad inhibitoria contra ciertos microorganismos de importancia alimentaria. Es importante decir que su

actividad antimicrobiana no se atribuye a un mecanismo específico, sin embargo, estudios han demostrado algunos sitios de acción en la célula, donde pueden ocurrir efectos como: daño a la membrana citoplasmática, degradación a la pared celular, daño a las proteínas, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y disminución de la fuerza motriz (Fundisa, 2001).

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

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

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la especia en aceite Orégano (*Origanum vulgare*), a nivel in vitro frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1325 para un producto cárnico madurado fermentado.
- ✓ Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la especia en aceite Tomillo (*Thymus*), a nivel in vitro frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1325 para un producto cárnico madurado fermentado.
- ✓ Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la especia en aceite Clavo de olor (*Zyzzgium*), a nivel in vitro frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1325 para un producto cárnico madurado fermentado.

3.0 MARCO TEORICO

Hoy en día ha aumentado la necesidad de consumir alimentos de mejor calidad, con una baja cantidad de aditivos y cada vez más parecidos al producto original, debido a que se ha empezado asociar con el desarrollo de algunas intoxicaciones, cáncer y otro tipo de enfermedades dadas por la adición de algunos conservantes, los cuales están generando problemas de salud en el consumidor. Esto ha generado la necesidad de buscar otras alternativas de conservar los productos, con el fin que contengan las mismas propiedades antimicrobianas y compatibilidad con el alimento (Rodríguez, 2011).

Es por esta razón que es importante conocer cada uno de los ingredientes de formulación y los aditivos que se utilizan para elaborar estos productos, ya que son aquellos que sin ser indispensables le confieren la identidad al producto (NTC, 2008) y para ello es importante definir los siguientes aspectos:

3.1 Aditivos en derivados cárnicos: El uso de aditivos químicos o conservantes en los alimentos se ha venido utilizando desde hace mucho tiempo, por lo cual se consideran como una sustancia que normalmente no se consume como alimento y no debe usarse como ingrediente característico, pero su adición se realiza con fines tecnológicos de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaque, transporte o conservación del alimento, con el fin de que no se afecten las características del producto. El chorizo es un producto cárnico procesado, crudo fresco, obtenido por molino o picado, cocido o madurado, embutido, elaborado a base de carne y grasa, con la adición de sustancias permitidas, el cual ha sido introducido a presión en tripas naturales o artificiales aprobadas para tal fin. Entre los ingredientes comúnmente utilizados está: el agua, las sales de curado (nitritos y nitratos), polifosfatos, ascorbato y eritorbato, antioxidantes, leche en polvo, harinas y almidones de cereales y proteínas texturizadas y concentradas (Norma Técnica Colombiana (NTC, 2008)).

3.2. Aditivos naturales: Hoy en día el consumidor prefiere alimentos saludables, naturales, frescos y sanos, que sean agradables a la vista y al paladar, con características nutritivas y fáciles de preparar y consumir. Pero debido a las diferentes situaciones que se presentan actualmente, la gran mayoría de alimentos que adquirimos se han sometido a procesos industriales y con adición de diversos conservantes químicos. Cuando hablamos de la palabra natural, nos estamos refiriendo a algo que no ha sido sometido a

ningún proceso de transformación, sino que se conserva en su forma natural (Durán, 2001).

3.3 Actividad antimicrobiana de los aditivos naturales: Los aditivos naturales poseen unos compuestos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos que afectan la estabilidad y calidad de un producto. Por lo que en la actualidad se ha pensado en la alternativa de utilizar este tipo de aditivos con el fin de ofrecer productos sanos y seguros sin que a futuro se afecte la salud del consumidor (Chavarrias, 2006). Algunos antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas y especias y su actividad antimicrobiana se le atribuye a la presencia de unos compuestos fenólicos como el carvacrol y timol, presentes en los extractos o aceites esenciales. Es importante tener en cuenta que algunas de estas especies no pueden inhibir completamente algunos microorganismos por lo que es necesario combinarlas para que haya un mejor efecto, aumentando la preservación de los alimentos. El mecanismo de ataque de los antimicrobianos naturales puede darse en distintas partes de sobrevivencia de la célula como la pared celular, membrana celular, síntesis de las proteínas y en su genética (Rodríguez, 2011).

La principal causa del deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para los distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo). La calidad de los alimentos se encuentra afectada por factores físicos, químicos, bioquímicos y microbiológicos. El control de dichos factores y en especial el microbiológico es esencial para la preservación de los alimentos (Rodríguez, 2011). A continuación, se hablará sobre algunos de los microorganismos que más afectan a los alimentos

3.4 Microorganismos Gram Negativos: Algunos microorganismos se consideran como causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, de tal manera que se requiere estudiar cuales son los microorganismos patógenos y productores de toxinas, entre los microorganismos gram negativos estudiados se encuentra:

3.4.1 *Escherichia coli*: Es un tipo de bacteria que se encuentra en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente (OMS, 2017). Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, posee tres tipos de antígenos como los somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) (Rodríguez, 2002). El principal reservorio de

este patógeno es el ganado bovino, aunque también puede encontrarse en rumiantes y mamíferos. La mayoría de sus cepas son inofensivas, pero existen algunas de ellas productoras de la toxina Shiga, la cual produce calambres abdominales y diarrea, en algunos casos puede convertirse en diarrea sanguinolenta, acompañada de vómitos y fiebre. En los alimentos esta bacteria puede destruirse cociéndolos a una temperatura que alcance los 70°C o más y los alimentos que comúnmente podría encontrarse están: la carne picada cruda o poco cocida, leche cruda y hortalizas contaminadas con materia fecal, teniendo en cuenta que la principal vía de transmisión es vía fecal-oral (OMS, 2017). Con base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de los cuadros de diarrea son: enterotoxigenica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez, 2002).

3.4.2 *Salmonella spp*: Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos gram negativos, no esporulados y móviles por los flagelos peritricos, poseen un metabolismo anaerobio, reducen los nitratos a nitritos y son fermentadoras de glucosa produciendo ácido y gas. En algunas ocasiones pueden fermentar lactosa o sacarosa y son catalasa positiva. Tienen la capacidad de infectar diferentes especies animales, pueden afectar a los humanos e invadir otros tejidos del tracto gastrointestinal ya sea como patógenos o comensales. La principal forma de transmisión es a través de la vía oral, por contacto con heces de animales infectados, además tienen la capacidad de resistir al pH del estómago, sales biliares y peristaltismo, de tal forma que puede llegar a colonizar el intestino delgado y provocar una infección localizada. La *Salmonella* produce tres tipos de toxinas: enterotoxina, endotoxina y citotoxina, por lo que se cree que estas pueden ser las causantes de diarreas en las personas, síntomas que se expresan a pocas horas de haber consumido un alimento contaminado por este microorganismo. La patología causada por *Salmonella* se denomina salmonelosis, la cual puede causar dos aspectos, fiebres tifoideas y paratifoideas y una gastroenteritis (Robledo, 2015).

Entre los principales alimentos que puede encontrarse este tipo de patógeno se encuentran: los huevos, la carne, leche, pescado, verduras, frutas, entre otros (OMS, 2017).

3.5 Microorganismos Gram Positivos:

3.5.1 *Staphylococcus aureus*: Es un microorganismo que se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente, debido a las características de virulencia que presenta y la resistencia hacia algunos antibióticos. Perteneció al grupo de las bacterias gram positivas, tiene una gran capacidad de adaptación

por lo que puede afectar distintas especies de mamíferos, incluyendo otro tipo de especies y los humanos. La mayoría de los brotes se han dado por los *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, ya que los *Staphylococcus* tienen la capacidad de producir enterotoxinas (enterotoxina A) y enzimas extracelulares, causantes de las intoxicaciones alimentarias. Existen algunos alimentos que son más susceptibles a contaminarse con este patógeno, en especial aquellos que tienen contacto con la piel del animal, tal es el caso de la leche, el huevo, los productos cárnicos como jamón, carne, chorizo y el pollo, además de estos se encuentran los alimentos de calle (hamburguesa) y las condiciones higiénicas que manejan ciertos lugares (Zendejas, Avalos & Soto, 2014).

3.5.2 *Listeria monocytogenes*: Es un microorganismo de distribución universal, resistente a la refrigeración, sequedad y calor extremo. Se considera como principales reservorios el suelo, el agua y el tracto gastrointestinal de las aves, peces y mamíferos, incluyendo al hombre. Además, puede estar presente en algunos alimentos como carne, pescado, vegetales crudos y lácteos no pasteurizados, entre otros. Este microorganismo es capaz de causar una patología denominada listeriosis gastrointestinal no invasiva, siendo la forma clínica más habitual, debido a que produce toxiinfecciones alimentarias. La sintomatología clínica comienza a presentarse alrededor de las 24 horas de haber consumido el alimento contaminado, produciendo diarreas acuosas, náuseas, vómitos, cefalea, artromialgias y fiebre. El inóculo necesario para causar la enfermedad depende de la cepa y la situación del huésped (Sánchez & Palencia, 2010).

3.5.3 *Clostridium perfringers (Esporas sulfito reductor)*: Son aquellas bacterias de morfología bacilar gram positiva, anaerobias estrictas, formadoras de esporas productoras de toxinas y con capacidad de reducir el sulfito a sulfuro, están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son colonizadores habituales del intestino humano y de algunos animales; la alta resistencia de sus esporas le dan valor como indicadores de contaminación fecal de carácter no reciente tanto en agua como en alimentos (Gómez, Reyes, *et al*, 2014). Tiene preferencia de crecimiento en condiciones con muy poco o nada de oxígeno, y en condiciones ideales puede multiplicarse muy rápidamente, En humanos, está asociado a enfermedades como la intoxicación por alimentos contaminados generando toxiinfecciones, debido a una enterotoxina que afecta al sistema digestivo produciendo gastroenteritis, caracterizada por malestar estomacal y diarrea pueden estar presentes en una gran cantidad de alimentos ya sean estos crudos o tratados (Morris & Fernández, 2009).

El uso de conservantes en los alimentos se ha venido implementando desde hace muchos años, por lo cual surgió la idea de buscar nuevas opciones de origen natural como el orégano, tomillo y clavo de olor, que pueden ser

sustituidos por los que comúnmente se están usando hoy en día, los cuales se pueden obtener a partir de hierbas, plantas, y especias, ya que los conservantes se adicionan con el propósito de controlar el crecimiento de los microorganismos como bacterias y hongos que afectan la integridad y calidad del producto. La preservación de los alimentos permite prolongar el tiempo de vida útil de estos, conservando su color, textura, sabor y valor nutritivo, ya que actualmente los consumidores prefieren alimentos de fácil preparación, calidad, seguros y naturales (Rodríguez, 2011). Algunos de ellos son:

3.6 Componentes del Oregano y Acción antimicrobiana del Oregano (*Origanum vulgare*): Es una planta herbácea o sufruticosa, perenne, rizomatosa (Muñoz, 2002), de gran interés debido a sus componentes como timol, cimeno, mirceno, terpineol, carvacrol, 2-dodecadona, linalol, ácido palmítico, acetado de linalilo, óxido de cariofileno, entre otros, los cuales han sido estudiados por su acción antimicrobiana, la cual 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, 2011). Es utilizado en la preparación de alimentos por su capacidad de sustituir los aditivos sintéticos, tiene una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros (Arcila & Loarca S *et al.*2004).

3.7 Componentes del Tomillo y Acción antimicrobiana del Tomillo (*Thymus vulgaris*): El aceite esencial de tomillo está compuesto principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p-cimeno, γ-terpineno, limoneno, borneol y linalol, es uno de los más potentes según investigaciones realizadas en cuanto a sus componentes antimicrobianos en toda la planta, debido a su carácter lipofílico en la acumulación en las membranas y algunos cambios en estas como la pérdida de energía e igualmente a su hidrofobicidad y a los puentes de hidrógeno en los componentes fenólicos en la cual cambia la permeabilidad y característica de la membrana (Rosas & López, 2011).

3.8 Componentes del Clavo de olor y Acción antimicrobiana del Clavo de olor (*Syzygium aromaticum*): La actividad antimicrobiana del aceite de clavo de olor se le atribuye a los compuestos fenólicos, ya que a mayor cantidad de estos compuestos será mayor la actividad antimicrobiana, es ampliamente conocida y utilizada desde hace mucho tiempo en la cual estudios han analizado que sus extractos tienen un amplio espectro de acción contra una gran variedad de microorganismos causantes de distintos padecimientos que afectan a humanos, animales y plantas, ha sido ampliamente investigado debido a su popularidad, disponibilidad y alto rendimiento, entre sus

compuestos de interés están el eugenol, acetato de eugenilo, cariofileno, α -humuleno, nerolidol, γ -cadineno, selineno, entre otros (Aguilar, 2013).

La actividad antimicrobiana de estas especias, está dada principalmente por la presencia de los compuestos fenólicos presentes en los extractos o aceites esenciales, además se ha observado que la grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura, afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Rodríguez, 2011). Los antimicrobianos o conservadores pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo, ellos son:

- Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- Daño a la integridad de las membranas.
- Interferencia en los procesos metabólicos esenciales.

Algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos microorganismos y otros pueden tener una menor inhibición. Desde la antigüedad se ha venido usando agentes antimicrobianos pero el más utilizado hasta el momento ha sido la sal de mesa, la cual se sigue utilizando para conservar productos cárnicos (Rodríguez, 2011).

3.9 Clasificación de los productos cárnicos: La clasificación de estos se debe a la composición de su elaboración en cuanto a su materia prima, estructura de su masa, si se está expuesto o no al calor, si son o no son embutidos la forma del producto terminado, su durabilidad o cualquier otro criterio o nombres derivados de usos y costumbres tradicionales (Venegas & Valladares, 1999), entre estos están los productos cárnicos crudos fermentados, los cuales son sometidos a un proceso tecnológico que no incluye un tratamiento térmico, aquí están los frescos, productos cárnicos crudos salados y los productos cárnicos crudos fermentados los cuales son 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. En cuanto a los productos cárnicos tratados con calor, son los que durante su elaboración han sido sometidos a algún tipo de tratamiento térmico (Venegas & Valladares, 1999).

Kinsman (1980) clasifica los embutidos en seis categorías entre estos están los embutidos frescos elaborados a partir de carne picada condimentada y usualmente embutida en tripa natural, no están curados ni ahumados. Los embutidos cocidos son fabricados a partir de carne picada, condimentada, curada y embutida en tripa. Los embutidos cocidos y ahumados se obtienen como los anteriores pero sometidos a un proceso de ahumado sin ningún tipo de tratamiento térmico y los embutidos secos o semi-secos, los cuales 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 y humedad (Venegas & Valladares, 1999).

4.0 Concentración Mínima Inhibitoria (CIM): Es una concentración requerida para impedir el crecimiento bacteriano, la cual se define como la mínima concentración de un antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, inhibe el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes). Puede ser determinada en micro dilución en caldo y difusión en agar (Taroco, Seija, *et al*, 2008). La sinergia de los componentes de orégano, tomillo y clavo de olor se debe principalmente a su potencial antimicrobiano sobre la integridad celular de los microorganismos ya que han sido de gran apoyo para la aplicación en la elaboración y conservación de alimentos ya que en la actualidad los consumidores tienen preferencia por alimentos de calidad, seguros, y naturales pero que a la vez tengan una mayor vida útil; hoy en día las tecnologías de conservación alimentos tienen como reto la elaboración de productos más duraderos sacrificando al mínimo sus características nutricionales y sensoriales iniciales (Del Valle, 2003).

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de las especies en aceite

Para poder determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de las especies en aceite, se trabajó una metodología llamada “Prueba de Difusión en disco”, con el fin de poder determinar a qué concentración fueron efectivas las especies formando halos de inhibición y cual proporcionaba mejores resultados.

4.1.1 Metodología de Difusión en disco:

Los microorganismos que se reactivaron para poder ser estudiados fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella spp* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva ATCC 25923, los cuales se encontraban preservados en glicerol en tubos ependoff bajo congelación para evitar que se desintegren. Para reactivar *Listeria monocytogenes* ATCC 13923 se utilizó la misma metodología, pero se incubó en microaerofilia y para Esporas de *Clostridium* sulfito reductor ATCC13124 se incubó en condiciones de anaerobiosis.

Posteriormente a ello, se llevaron los tubos a baño maría durante 15 minutos para ser reactivados y con el asa en argolla se tomó una pequeña cantidad de muestra para ser sembrada por agotamiento en agar Trypticase de soja, llevando a incubar a 37°C durante 24-48 horas.

Una vez pasado el tiempo de incubación, fue necesario tomar una unidad formadora de colonia (UFC) para depositarla en un tubo que contenía caldo tripticase soya o BHI. Por cada caja sembrada se repico en dos tubos con caldo y luego se llevó a incubar durante 24 horas. Después de ello se verificó el crecimiento presente en los tubos y la concentración de estos fue medida por espectrofotometría, donde se obtuvo una concentración de 10^8 UFC con un valor de 0.9 de absorbancia.

Para la realización del trabajo se manejaron cuatro concentraciones para cada una de las especies en aceite al 10%, 7.5%, 5% y 2.5%, establecidas mediante la fórmula %p/v como se indicará a continuación:

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

Luego como diluyente se utilizó etanol al 96%, el cual fue medido en beakers y se combinó con la especie. A cada una de las concentraciones se le depositaron unos sensidiscos con el fin de que tengan contacto con ellas en un tiempo aproximado de 20 minutos.

Durante ese lapso de tiempo se realizaron unas siembras masivas en agar tripticasa de soja, por lo tanto, para cada microorganismo se usaron cuatro concentraciones y por cada concentración se sembraron 5 cajas, a las cuales se les coloco 4 sensidiscos como se observa en la Figura 1 y se llevó a incubar durante 37°C por 24 horas. Para el caso de *Clostridium* una vez realizada la siembra y puesto los sensidiscos, fue necesario añadir ---- de agar tripticasa de soja para generar la anaerobiosis.

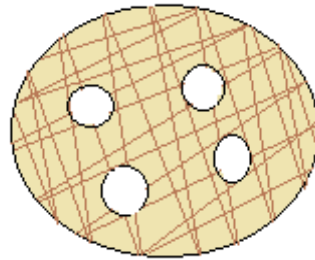


Figura 1 Caja de Petri sembrada con la especie y el microorganismo y los 4 sensidiscos

Posteriormente a la incubación se realizó la respectiva lectura de los halos de inhibición, como CONTROL POSITIVO, se sembró el microorganismo con el sensidisco del antibiótico como lo muestra la Figura 2 y como CONTROL NEGATIVO se sembró el microorganismo solo como lo indica la figura 3.

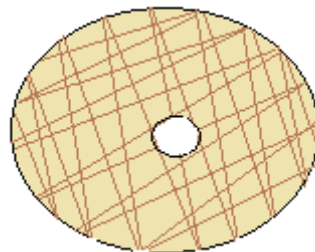


Figura 2 Control positivo (microorganismo y antibiótico)

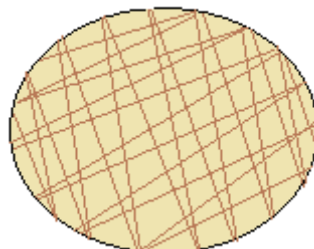


Figura 3 Control negativo (microorganismo solo)

De esta manera se realizó la medición de cada uno de los halos presentes en las cajas sembradas con las especies y se apuntó el respectivo resultado.

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la especie en aceite Orégano (*Origanum vulgare*), a nivel in vitro frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1325 para un producto cárnico madurado fermentado.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron al evaluar las especias en aceite esencial frente a los microorganismos que son criterio microbiológico según la norma NTC 1325, se determinó lo siguiente:

Al evaluar el aceite esencial de Orégano en las cuatro concentraciones frente a los microorganismos, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella spp* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 13923 y *Clostridium perfringens* ATCC13124, no se obtuvo ningún resultado, es decir no se observó ningún halo de inhibición como lo muestra los resultados de la tabla 1, sin embargo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, presento halos de inhibición en las cuatro concentraciones (10%, 7,5%, 5% y 2,5%), alcanzando en la cuarta concentración (2,5%) un halo de inhibición de alrededor de 6milímetros (mm), como se observa en la figura 1, teniendo en cuenta que esta última es la concentración más baja.

Tabla 1 Resultados de la concentración mínima inhibitoria de la especie Orégano en aceite esencial

Especia orégano + <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			
[1]	[2]	[3]	[4]
0	0	0	0

Especia Orégano + <i>Salmonella spp</i> ATCC 14028			
[1]	[2]	[3]	[4]
0	0	0	0

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

Especia Orégano + <i>Clostridium perfringens</i> ATCC13124			
[1]	[2]	[3]	[4]
0	0	0	0

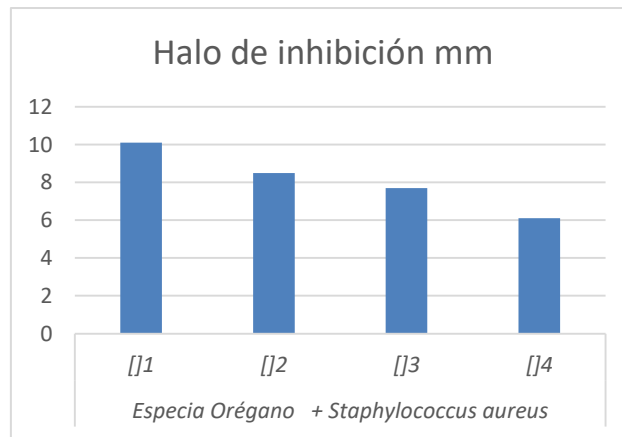


Figura 1 Halos de inhibición en mm de la especia orégano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

A nivel mundial existen diferentes especias denominadas con el nombre de Orégano, siendo *Origanum* el género más conocido, al cual se le ha dado múltiples usos como lo es en la industria alimentaria, en la elaboración de perfumes, plantas decorativas, aceites esenciales y oleorresinas. Actualmente se utilizan muchas especias y hierbas para la conservación de los alimentos, con el fin de sustituir el uso de aditivos químicos y aumentar así su importancia en la industria alimentaria, generando mayores beneficios en la salud del consumidor (Amadio, Medina, Dediol, Zimmermann & Miralles, 2011). Entre los principales componentes del *Origanum* se encuentra el limoneno, el β -cariofileno, el p -cimeno, el canfor, el linalol, el α -pineno, el carvacrol y el timol, siendo estos últimos los más importantes en la evaluación de la actividad antimicrobiana de esta especia (Arcila, Loarca, Salvador, *et al*, 2004).

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano depende de su composición, la cual está relacionada con la especie de orégano (Paredes, Gastelum, Silva & Nevarez, 2007), se ha encontrado que este tipo de especia tiene la capacidad de actuar contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Además de ello se habla que los compuestos fenólicos como el carvacrol y timol, poseen una actividad más alta contra los microorganismos Gram negativos, excepto para *Pseudomonas aeruginosa*, siendo el timol el componente más efectivo (Rodríguez, 2011).

Los géneros como *Salmonella* y *Staphylococcus*, pueden contaminar los alimentos y ser agentes causantes de enfermedad. La carne es un alimento

que tiene un alto contenido de agua y un a_w de 0,99, lo que favorece el crecimiento de microorganismos como *Salmonella* y *Staphylococcus*, causando alteraciones en la composición de la carne y siendo fuente de enfermedad para el ser humano. Teniendo en cuenta todo lo anterior la carne de cerdo es muy utilizada para la elaboración de derivados cárnicos en especial los embutidos, por lo que son susceptibles a ser contaminados por estos tipos de microorganismos. De acuerdo a un estudio realizado por Vasquez, Alvarado, Rodríguez, Saldaña, *et al* en el 2014, el cual tenía como objetivo determinar el efecto del aceite esencial *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus* y otras *Salmonellas spp* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada, determinaron mediante el método de Microdilucion en caldo que la menor concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Staphylococcus aureus* fue de 1,5 $\mu\text{L/mL}$ y para las *Salmonellas spp* la mayor fue de 3,0 $\mu\text{L/mL}$. Por lo tanto, el aceite esencial de orégano al actuar como un agente antibacteriano afecta la permeabilidad de la membrana bacteriana causando la salida de iones desde el interior de la célula hacia el exterior. Por lo general esta salida de iones va acompañada de otros constituyentes citoplasmáticos, sin embargo, cierta cantidad de perdida puede ser tolerada por la célula, pero si el flujo aumenta puede llevar a la muerte de la misma (Vásquez, Alvarado, Rodríguez, Saldaña, *et al*, 2014).

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

Al ser evaluado el aceite esencial de Tomillo en las cuatro concentraciones frente a los microorganismos, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella spp* ATCC 14028 y *Listeria monocytogenes* ATCC 13923, los resultados que se obtuvieron fueron de cero, es decir no se observó la formación de ningún halo de inhibición como lo indica los resultados de la tabla 2, pero a diferencia de los demás microorganismos, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, presento halos de inhibición en las cuatro concentraciones (10%, 7,5%, 5% y 2,5%), alcanzando un valor en la última concentración de 10mm como lo muestra la figura 5, en las demás concentraciones se obtuvo valores de 11mm al 5%, de 13mm al 7,5% y de 19mm al 10% y además de ello *Clostridium perfringers* ATCC13124 también presento halos de inhibición pero solo en la primera concentración es decir al 10%, utilizando la especia pura con un valor de 1,4mm como se observa en la figura 2.

Tabla 2 Resultados de la concentración mínima inhibitoria de la especia Tomillo en aceite esencial

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

Especia Tomillo + <i>Salmonella</i> ATCC 14028			
[1]	[2]	[3]	[4]
0	0	0	0

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

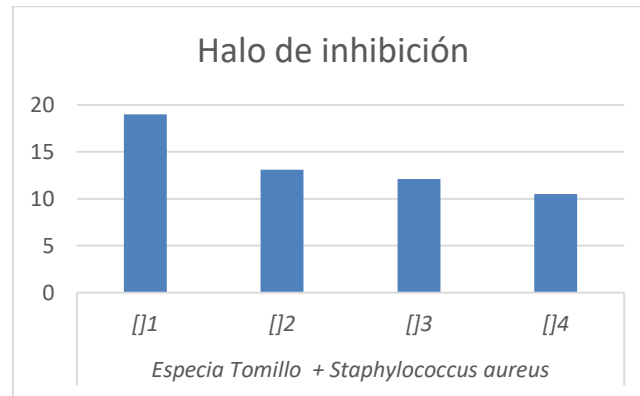


Figura 2 Halos de inhibición en mm de la especia Tomillo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

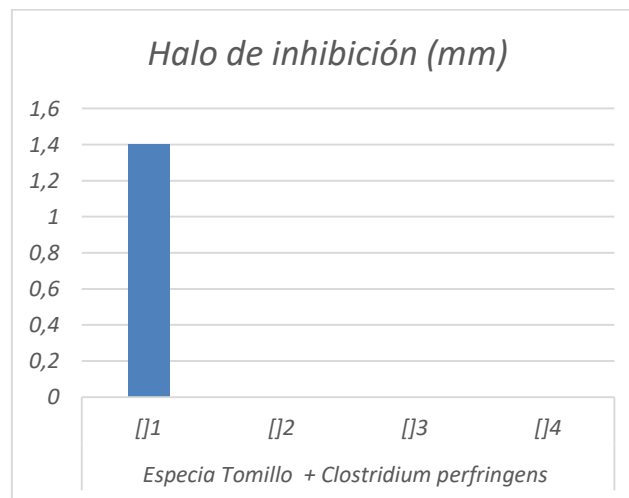


Figura 3 Halos de inhibición en mm de la especia Tomillo frente a *Clostridium perfringens* ATCC 13124

La forma más importante de perder la calidad de un producto es aquella que está asociada con el deterioro microbiano y en general por la presencia de microorganismos patógenos. Muchos alimentos contienen componentes naturales, los cuales pueden ayudar a prolongar la vida útil de los alimentos actuando como agentes antimicrobianos. El aceite esencial de tomillo está compuesto principalmente por fenoles monoterpénicos, como el timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno, limoneno, borneol y linalol. Su composición puede variar, pero todo depende de la época y el lugar en que se coseche, teniendo en cuenta que existen diferentes quimiotipos. De acuerdo algunos estudios que han realizado, el aceite esencial de tomillo se caracteriza por tener potentes propiedades antimicrobianas, dentro de ellas se destaca componentes como el timol y el carvacrol, considerados como los componentes más activos contra patógenos transmitidos por alimentos. Por lo tanto, se habla que la propiedad antimicrobiana del tomillo está asociada a su carácter lipofílico, a la acumulación de membranas y a los eventos secundarios dados en la membrana como pérdida de energía (Rosas & López, 2011).

El timol tiene efectos antibacterianos, anti fúngicos y antihelmínticos, pero su mecanismo de acción no está determinado a gran escala, por lo cual se considera que los diferentes grupos químicos que lo componen actúan de diferente forma sobre la célula, teniendo en cuenta que no todos los mecanismos de acción son independientes, algunos pueden verse afectados por la acción del otro (Morales, 2015). El carvacrol tiene la capacidad de interactuar con la membrana mediante la unión con la capa de los fosfolípidos, provocando una desestabilización de la célula y por consiguiente aumentando la fluidez y la permeabilidad de la misma. Entre los principales mecanismos por el cual los microorganismos son inhibidos por los compuestos fenólicos están, la sensibilización de la bicapa fosfolípida de la membrana celular, la cual causa una pérdida de la permeabilidad y de los constituyentes celulares o provoca un daño en las enzimas bacterianas. Además de ello también se presume que la actividad antimicrobiana de este aceite está asociada a su hidrofobicidad y a los puentes de hidrogeno de sus constituyentes fenólicos, lo que produce un cambio en su permeabilidad y características de la membrana. Es importante resaltar que el carvacrol y el timol, al actuar en conjunto conjunto aumentan la permeabilidad de la membrana celular, desintegrando la membrana externa de las bacterias Gram negativas, liberando lipopolisacáridos (LPS) y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática a ATP (Rosas & López, 2011).

El aceite esencial de Tomillo presenta un efecto antimicrobiano de moderado a fuerte sobre algunas bacterias tanto Gram positivas y Gram negativas y en diferentes hongos presentes en alimentos (Medina, Dupertuis, Amadio, *et al*, 2003). Entre algunos de los microorganismos que han presentado actividad

antibacteriana se encuentra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio spp*, y *Listeria monocytogenes* (Rojas, Ortiz, Jauregui, et al, 2015). Además de ello Mazzarino y otros autores en el 2014, utilizaron el aceite esencial de tomillo para evaluar algunas especies de bacterias patógenas, donde observaron que este presentaba un gran espectro de acción sobre varios microorganismos, pero sobre *Listeria monocytogenes* su acción fue reducida, lo que indica el bajo rendimiento de este microorganismo al ser evaluado en el actual estudio.

Por otro lado, se ha determinado que el aceite esencial de tomillo no presenta actividad a bajas concentraciones frente algunas cepas bacterianas, como por ejemplo la presencia de *Clostridium perfringers* (Morales, 2015), esto indica que al momento de ser evaluado en este estudio solo funciona con la especie pura, es decir al 100%. La importancia de inhibir *Clostridium perfringers*, radica en la capacidad toxigenica que este microorganismo tiene y en la capacidad de formar esporas, por lo cual este puede hacerse más resistente a los efectos adversos que los conservantes naturales puedan ejercer sobre el microorganismo, por lo tanto de acuerdo algunos estudios realizados, el aceite esencial de tomillo ha tenido efecto sobre algunas bacterias entéricas ya mencionadas anteriormente incluyendo a *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum*, donde ha producido halos de inhibición alrededor de 7 a 24 mm (Ardila, Vargas, Pérez & Mejia, 2009).

5.3 Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la especie en aceite Clavo de olor (*Zyzygium*), a nivel in vitro frente a cepas que son criterios microbiológicos según norma NTC 1325 para un producto cárnico madurado fermentado.

El Clavo de olor es una especie que es muy utilizada en gastronomía y medicina natural, que han sido utilizados durante las últimas décadas por su uso potencial como conservantes y antioxidantes en el campo de la agroindustria y alimentos contiene una gran variedad de compuestos y su composición varía dependiendo de su procedencia entre sus componentes destaca eugenol (49-98%) como compuesto mayoritario, β -cariofileno (7.2-21%) y eugenil acetato (2.1-6%). Además, también se pueden encontrar pequeñas cantidades de α -humuleno (0.8-1.9%) y trazas (< 1%) de otros 25 a 35 constituyentes (Garcia.2014) El eugenol, componente mayoritario actúan inhibiendo la producción de enzimas extracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular. (Pastrana Y Durango et al.2017)

En el caso de *Escherichia coli*, ATCC 25922 los resultados que se obtuvieron al usar la especie Clavo de olor fueron buenos, presento halos de inhibición en las cuatro concentraciones, teniendo como concentración mínima inhibitoria la

de 2.5 % con halos de inhibición promedio de 6.3 milímetros, y valores de 6.4, 4.6, 4.5 milímetros en las concentraciones de 10, 7.5 y 5 % respectivamente como se observa en la Figura 4.

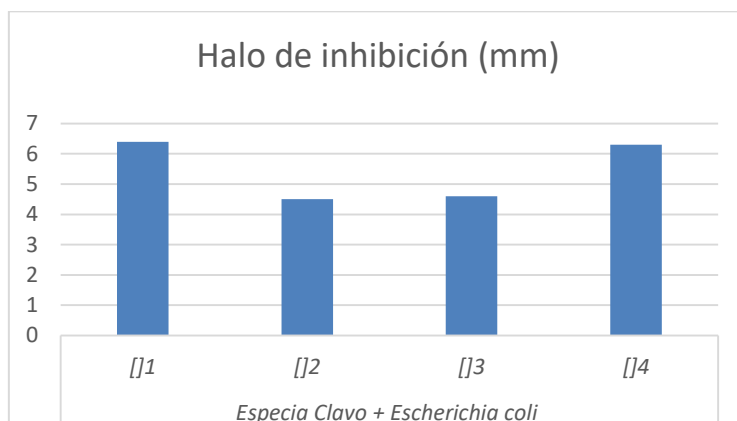


Figura 4 Halos de inhibición en mm de la especia Clavo de olor frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

Esta especia presenta una buena respuesta a la inhibición al crecimiento de *E. coli*, es así como, los derivados fenólicos tales como carvacrol y eugenol provenientes del clavo de olor causan la desintegración de la membrana en la *E. coli* y *S. typhimurium* e igualmente estudios demuestran que este tipo de especia inhiben el crecimiento de las bacterias Gram negativas (Pastrana, Durango, *et al*, 2017). Esto se puede evidenciar en estudios donde esta especie fue adicionada en jugo de manzana pasteurizada con el fin de inactivar el crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7, en la cual se demostró un aumentando seguridad del producto (Caballero & Márquez, 2011).

Para *Salmonella* spp, ATCC 14028 se presentaron halos de inhibición en las concentraciones 10, 7.5, 5 y 2.5 % de 5.4, 5.2, 6.5, y 6.6 milímetros respectivamente como se observa en la Figura 5.

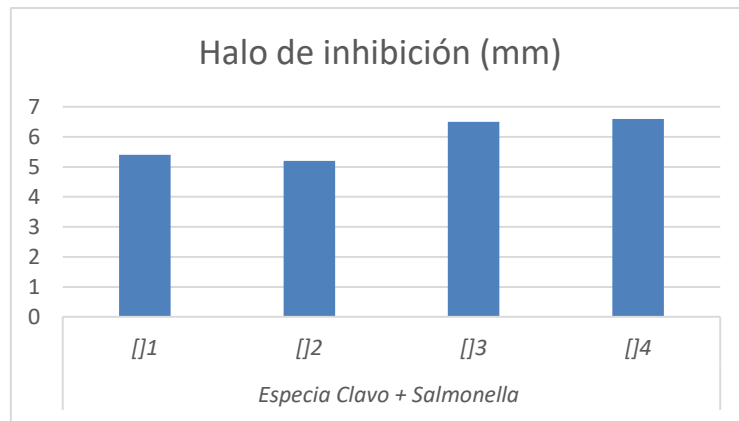


Figura 5 Halos de inhibición en mm de la especia Clavo de olor frente a *Salmonella spp* ATCC 14028

En estudios realizados concluyeron que clavo de olor evaluado presenta un notable efecto inhibitorio en la supervivencia de *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus*, este estudio demuestra que se evaluó el efecto del aceite esencial de “clavo de olor” en la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus* donde se prepararon concentraciones del aceite al 10%, 20%, 30% y 40% más Tween 80 como solvente emulsificante estudio que demostró una relación directa entre la concentración del aceite y el efecto inhibitorio: a mayor concentración (40%) mayor efecto inhibitorio sobre los microorganismos en estudio. (Gamboa, Vásquez. 2015)

Por otro lado, el microorganismo que mejor se ha inhibido usando los tres tipos de especias en las cuatro concentraciones es *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 el cual al ser evaluado con Clavo de olor llegó a presentar un halo de inhibición de aproximadamente 1,3cm en su última concentración del 25% en las demás concentraciones se obtuvo valores de 4mm al 10%, de 3,3mm al 7.5%, de 2,4 al 5% como se observa en la Figura 6.

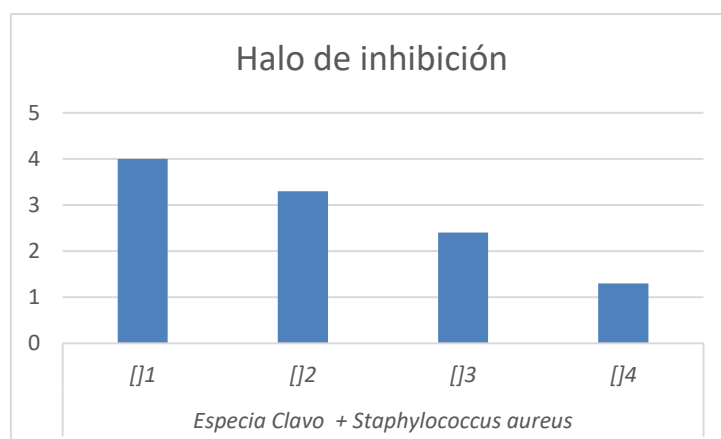


Figura 6 Halos de inhibición en mm de la especie Clavo de olor frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Pastrana y durando, *et al*, 2017, compararon las propiedades antimicrobianas, de 30 especies y resumieron el espectro antibacteriano de cada especie y observaron que el 80% de ellas inhibieron el crecimiento de más del 50% de las bacterias del estudio, de hecho, el clavo de olor junto a otra especie, inhibieron entre el 75 y el 100% de las cepas bacterianas utilizadas, Teniendo efecto antimicrobiano sobre los patógenos *Staphylococcus aureus* e igualmente con *Salmonella spp. E. coli* utilizando el método de difusión en agar, y diluciones dobles en caldo. Esto es posible por la presencia de alcaloides, oxhidrilos fenólicos, y el eugenol presente en el clavo según Khan (Pastrana & Durango, *et al*, 2017).

En el caso de *Clostridium perfringers* ATCC 13124 al evaluarlo con las tres especies, los resultados que se obtuvieron con la especie Clavo de olor logró presentar una concentración mínima inhibitoria de aproximadamente 1,7cm en la cuarta concentración del 2.5%, en las demás concentraciones se obtuvo valores de 3,3cm al 10%, de 2.7 cm al 7.5%, de 2.8 al 5% como se observa en la Figura 7.

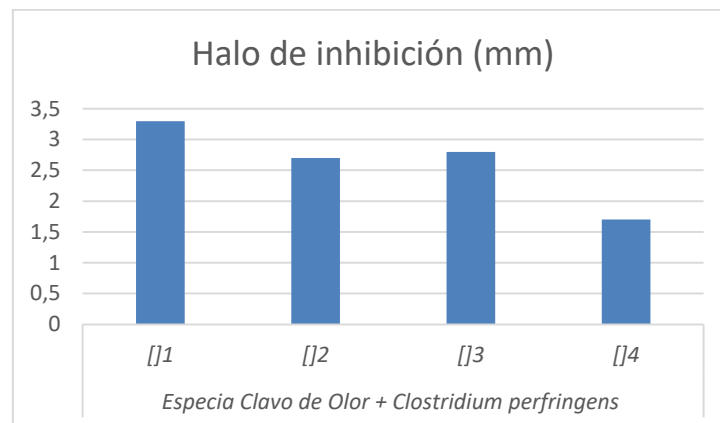


Figura 7 Halos de inhibición en mm de la especie Clavo de olor frente a *Clostridium perfringers* ATCC 13124

Según Mitch 2004, Dean 1995 y Huerta 2007, demostraron que la actividad antimicrobiana del clavo de olor frente a *Clostridium perfringers*; otros trabajos demostraron que los aceites esenciales presentan mayor actividad frente a *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* (Zecaria, 2008). En altas concentraciones tiene un efecto bactericida, acción que se ha atribuido a los fenoles por degeneración de las proteínas lo que resulta en daño a la membrana celular, a diferencia de las bajas concentraciones de eugenol que tienden a estabilizar las membranas celulares, en un estudio realizado en ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de diferentes extractos en el

que se encuentra clavo de olor frente a *Clostridium perfringens* determinaron que se produce la inhibición en la formación de gas por parte de *C. perfringens* a concentraciones inferiores al 1% (10 µl/ml) y además se observó cómo hay variación en la concentración y composición de los aceites esenciales obtenidos de una misma planta.(Ardila & Vargas. *et al.*2009).

6.0 CONCLUSIONES

- ✓ El aceite de esencial **orégano** (*Origanum vulgare*) sólo presentó actividad antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en las cuatro concentraciones evaluadas, siendo 2.5% la concentración mínima inhibitoria.
- ✓ El aceite de esencial de **tomillo** (*Thymus vulgaris*) no presentó actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram-negativos y solo inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en las cuatro concentraciones evaluadas y *Clostridium perfringens* ATCC 13124 sólo en la concentración mayo 10%.
- ✓ El aceite esencial de **Clavo de olor** (*Syzygium aromaticum* o *Eugenia caryophyllata*), presentó actividad antimicrobiana frente a 4 de los 5 microorganismos evaluados, siendo *Listeria monocytogenes* ATCC 13923, la única cepa que no fue inhibida.

7.0 RECOMENDACIONES

- ✓ Para obtener resultados más eficaces es importante conocer y tener en cuenta la forma o método que se utilizan para extraer el aceite, ya que esto podrá variar su composición y por ende su acción.
- ✓ La concentración de cada especia utilizada es de gran importancia porque de esto depende la variación de resultados frente a los microorganismos en estudio.
- ✓ La actividad antimicrobiana frente a las diferentes especies en estudio depende de método que se emplee.
- ✓ Es importante conocer tanto los efectos de cada especia como al microorganismo con el que se desea tener actividad antimicrobiana.

8.0 BIBLIOGRAFIA

- ✓ Amadio. C., Medina. R., Dediol. Cora, Zimmermann. M., & Miralles. S. (2011). Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *Revista de la facultad de ciencias agrarias*, 43 (1), 237-245. Recuperado de: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/3927/amadio.pdf
- ✓ Antón. L., Lizaso. J. (2001). Nitritos, nitratos y nitrosaminas. *Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria*. Recuperado de: <https://iacmx.com/wp-content/uploads/2017/02/nitratos-y-nitrosaminas.pdf>
- ✓ Ardila M, Vargas A *et al.* (2009). Ensayo Preliminar De La Actividad Antibacteriana De Extractos De Allium Sativum, Coriandrum Sativum, Eugenia Caryophyllata, Origanum Vulgare, Rosmarinus Officinalis Y Thymus Vulgaris Frente A Clostridium Perfringens. *Biosalud*, Volumen 8, enero - diciembre, 2009. págs. 47 – 5. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v8n1/v8n1a07.pdf>
- ✓ Arcila. L., Loarca. P., Salvador. U., et al. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54 (1), 100-111. Recuperado de: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015
- ✓ Ardila. M., Vargas. A., Perez. J., & Mejia. L. (2009). Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extratos de Allium Sativum, Coriandrum Sativum, Eugenia Caryophyllata, Origanum Vulgare, Rosmarinus Officinalis y Thymus Vulgaris frente a Clostridium perfringens. *Biosalud*, 8 (1), 37-46. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502009000100007
- ✓ Bastos. M., Damé. L., Souza. L., Almeida. D., & Alves. R. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(3), 260-266. Recuperado de: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/63156/000819863.pdf?sequence=1>
- ✓ Bazán. L. (2008). Nitritos y nitratos: Su uso, control y alternativas en embutidos cárnicos. *Nacameh*, 2 (2), 160-180. Recuperado de: http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v2n2/Nacameh_v2n2_160BazanLugo.pdf

- ✓ Bejarano. J., & Suarez. L. (2015). Algunos peligros químicos y nutricionales del consumo de los alimentos de venta en espacios públicos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 47 (3), 349-360. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/3438/343842287011.pdf>

- ✓ Chavarria. M. (2006, 19 de octubre). Antimicrobianos naturales y conservación de alimentos. *Eroski consumer*. Recuperado de: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2006/10/19/25370.php>

- ✓ Durán. L. (2001). Aditivos naturales. *Arbor*, 661, 87-107. Recuperado de: https://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=11&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjhhKO97M3YAhVP61MKHQ_iBM4QFghXMAo&url=http%3A%2F%2Farbor.revistas.csic.es%2Findex.php%2Farbor%2Farticle%2Fdownload%2F824%2F831&usg=AOvVaw2BZBkUc2jgSLeAnOYi-rXv

- ✓ Federecion Hipercoleterolemia Familiar(FHF.) (2015, 13 de noviembre). El consumo excesivo de carnes rojas y procesadas se asocia a mayor riesgo de cáncer y otros problemas de salud. *FHF*. Recuperado de: <https://www.colesterolfamiliar.org/el-consumo-excesivo-de-carnes-rojas-y-procesadas-se-asocia-a-mayor-riesgo-de-cancer-y-a-otros-problemas-de-salud/>

- ✓ García. R., & García. E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 2 (2), 41-51. Recuperado de: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TsIA-2\(2\)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TsIA-2(2)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf)

- ✓ Gianina. (2014, 23 de junio). Por qué los embutidos son dañinos. Recuperado de <http://www.datosgratis.net/por-que-los-embutidos-son-daninos/>

- ✓ Gomez J, Reyes N, et al(2014)Investigacion Y Recuento De Esporas De Clostridium Sulfito Reductor (Ecsr). Laboratorio De Microbiologia De Alimentos.Recuperado De: <https://es.scribd.com/document/246865586/RECUENTO-DE-CLOSTRIDIUM-SULFITO-REDUCTOR>

- ✓ La Voz. (2015, 27 de Octubre). Las familias con niños son las que mas salchichas y hamburguesas consumen . *La Voz* .

- ✓ Matey. P. (2012, 8 de marzo). Pacientes de EPOC ingresados por consumir embutidos en exceso. *El Mundo*. Recuperado de: <http://www.elmundo.es/elmundosalud/2012/03/08/nutricion/1331212617.html>
- ✓ Mazzarrino. G., Paparella. A., Chaves. C., Faberi. A., Sergi. M., Sigismondi. C., Serio. A. (2014). *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794–803.
- ✓ Medina. R., Dupertuis. L., Amadio. C., et al. (2003). Aceite esencial de tomillo como antioxidante y conservador de hamburguesas funcionales. *Revista de la facultad de ciencias agrarias UNCuyo*, 35 (2), 13-23. Recuperado de: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/1720/medinaagrarias35-2.pdf
- ✓ Medrano. L. (2013). Desarrollo y evaluación de extractos etanólicos de tres especias como antimicrobianos en chorizo italiano Zamorano (Tesis de pregrado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.
- ✓ Morales. A. (2015). Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta (Tesis de grado). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- ✓ Moreno. B., Soto. K., & González. D. (2015). El consumo de nitrato y su potencial efecto benéfico sobre la salud cardiovascular. *Revista chilena de nutrición*, 42 (2), 199-205. Recuperado de: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182015000200013
- ✓ MORRIS E, FERNÁNDEZ, M (2009). Toxinas *Clostridium perfringens*. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v41n4/v41n4a10.pdf>
- ✓ Muñoz. L. (2002). Plantas medicinales españolas: *origanum vulgare l. (lamiaceae)* (orégano). Recuperado de: http://www.biolveg.uma.es/abm/volumenes/vol27/27_munozcenteno.pdf
- ✓ Norma Técnica Colombiana. (2008). Recuperado de: <http://www.analisisambiental.com.co/wp-content/uploads/2014/02/NTC-1325.pdf>
- ✓ OMS. (2017, 23 de septiembre). *Escherichia coli*. OMS

- ✓ OMS. (2017, 23 de septiembre). *Salmonella* (no tifoidea). OMS

- ✓ Paredes. M., Gastelum. M., Silva. R., & Nevarez. G. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*LIPPIA BERLANDIERIS*Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. *Revista Fitotecnica Mexico*, 30 (3), 261-267. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/html/610/61003008/>

- ✓ Ríos. S. (2015). Daños que causa el consumo excesivo de embutidos. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Complejo Universitario de la Salud*. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/abbeyloopezcarmona/daos-del-consumo-excesivo-de-embutidos>

- ✓ Robledo. A. (2015). Investigación de *Salmonella spp* en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos (Tesis de pregrado).

- ✓ Rodríguez. E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7 (1), 153-170. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>

- ✓ Rodríguez. M. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44 (5), 464-475. Recuperado de: http://www.adiveter.com/ftp_public/E.coli.pdf

- ✓ Rojas. J., Ortiz. J., Jauregui. J., et al. (2015). Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo), su combinación con EDTA contra *Cándida albicans* y formulación de una crema. *Anales de la facultad de ciencias médicas*, 76 (3), 253-240. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832015000400002

- ✓ Rosa. A., & López. A. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomillo (*Thymicus vulgaris*). *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 5 (1), 41-50. Recuperado de: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5\(1\)-Rosas-Gallo-et-al-2011.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5(1)-Rosas-Gallo-et-al-2011.pdf)

- ✓ Sánchez. B., & Palencia. E. (2010). Infecciones por *Listeria*. *Medicine*, 10 (50), 3368-3372. Recuperado de: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Listerias_Medicine_2010.pdf

- ✓ Vasquez. M., Alvarado. Prado., Rodriguez. I., Saldaña. W., et al. (2014). Efecto del aceite de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella parathypi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. *Revista científica oficial de la facultad de ciencias biológicas, Universidad de Trujillo - Perú*, 34 (1), 57-68. Recuperado de: https://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=12&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj68rTwkdvYAhXBneAKHb7kAt8QFg hWMAs&url=http%3A%2F%2Frevistas.unitru.edu.pe%2Findex.php%2Ffaccbiol%2Farticle%2Fdownload%2F589%2F551&usg=AOvVaw1fVUV3BQFkg2ilUumZXWb_

- ✓ Zendejas. G., Avalos. H., & Soto. M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista biomédica*, 25 (3), 129-143. Recuperado de: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb142534.pdf>