Evaluación de la capacidad antimicrobiana de la especia Clavo de olor (*Syzygium spp.*) en aceite esencial en un producto cárnico madurado frente a microorganismos criterio microbiológico según la NTC 1325

DANIELA GONZÁLEZ CASTRO

KAREN LORENA ROJAS FRANCO

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

Evaluación de la capacidad antimicrobiana de la especia Clavo de olor (*Syzygium spp.*) en aceite esencial en un producto cárnico madurado frente a microorganismos criterio microbiológico según la NTC 1325

DANIELA GONZÁLEZ CASTRO

KAREN LORENA ROJAS FRANCO

Proyecto de investigación 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, DÍA MES de 2018

DEDICATORIA

Este documento, resultado de un proyecto investigativo arduo y con convicción, se lo dedico a mi mamá, que ha sido mi principal ATP, y me ha proporcionado todo cuanto he necesitado: apoyo, palabras de aliento, confianza, soporte económico, paciencia, fe en mí y mucho amor en la distancia.

¡Gracias!

- Daniela González Castro

A Dios, por ser mi guía y fortalecerme cuando quise desfallecer; a mis padres y hermano por el esfuerzo que han hecho para que yo salga adelante, por su amor y su apoyo en todo; a mi abuela por aportar un granito de arena para cumplir mi meta y a ti, Amor, por estar siempre dispuesto a escucharme, darme palabras de aliento y llenar de felicidad mis días.

- Karen Lorena Rojas Franco

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Católica de Manizales por la oportunidad de ser parte de ella. Al programa de Bacteriología por brindarnos conocimientos valiosos para este proceso, también al grupo de Investigación INDETSA por la oportunidad de participar en este excelente proyecto.

Nuestros 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 todas aquellas personas que directa e indirectamente nos brindaron su colaboración, ayuda y entrega durante todo este proceso que no fue fácil.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN 9
2. OBJETIVOS 15
2.1 Objetivo general 15
2.2 Objetivos específicos 15
3. MARCO TEÓRICO 16
3.1 Aditivos en derivados cárnicos: 16
3.2 Aditivos antimicrobianos de origen natural: 17
3.3 Clavo de olor *Syzygium aromaticum:* 18
3.4 Mecanismo de acción del clavo de olor: 19
3.4.1 Compuestos fenólicos: 20
3.5 Producto cárnico madurado: 21
3.6 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs): 21
3.6.1 Intoxicaciones alimentarias: 22
3.6.2 Infecciones alimentarias: 23
3.7 Microorganismos Patógenos en un producto cárnico madurado según la norma técnica Colombiana 1325: 23
3.7.1 *Escherichia coli* 23
3.7.2 *Salmonella spp:* 24
3.7.3 *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva: 24
3.7.4 *Listeria monocytogenes* 25
3.7.5 Esporas de *Clostridium* sulfito reductor: 26
4. MATERIALES Y MÉTODOS 27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 33
6. CONCLUSIONES 40
7. RECOMENDACIONES 41
8. BIBLIOGRAFÍA 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fuente: Fedegán FNG, Fenavi, Porcicol y Fedeacua *Consumo de proteína animal corresponde al consumo acumulado de carne de res, pollo y cerdo. 11
Figura 2: consumo de carne en Colombia en los años 2014, 2015, 2016. (Alfonso, 2017).... 12
Figura 3: Componentes de aceites esenciales que presentan propiedades antimicrobianas. Fuente: (García & García, 2008). 17
Figura 4: Elaboración del producto cárnico. 31
Figura 5: recuento microbiológico..... 32

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Medios de cultivo y Temperaturas de Incubación por Microorganismo..... 29
Tabla 2: Productos obtenidos 30
Tabla 3: Análisis microbiológico de materia prima 33
Tabla 4: Recuentos microbiológicos obtenidos en los dos tiempos evaluados. 34

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de carne hace parte de la cultura latinoamericana y hoy en día es la principal fuente de proteínas en la dieta diaria, sin embargo, debido al alto costo ecológico que representa el negocio ganadero a nivel mundial (es una de las principales causas del cambio climático) (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006) y a la concientización acerca de este fenómeno por parte de la sociedad, se ha fortalecido la tendencia al vegetarianismo, como ejemplo de esto se tiene que en Bogotá aumenta el número de establecimientos vegetarianos y así mismo ocurre en diferentes ciudades colombianas donde se ha producido una ruptura en las tradiciones culinarias convencionales (Galeano, 2017).

El periódico “El Tiempo” anunció una posible alza en el precio de los cárnicos debido a gastos por causa de una mejora en programas de calidad (El Tiempo, 2017), aun cuando la carne de res ya es la más costosa del mercado, es decir, a medida que avanza el tiempo se hace menos asequible para miles de familias; esto, aunado a lo ya mencionado anteriormente, amenaza al mercado cárnico a corto y largo plazo, y es por esto que se hace urgente brindarle al consumidor productos con valores agregados de manera económica.

En el mercado cárnico se emplea una amplia gama de aditivos (la gran mayoría químicos sintéticos) con diferentes fines, tales como mejorar propiedades organolépticas (sabor y apariencia) (Ospina et al., 2011), y, la función más importante: conservar el producto, es decir, alargar su vida útil, lo cual se logra, generalmente mediante efectos bacteriostáticos o bactericidas sobre microorganismos alterantes; sin embargo, algunas de estas sustancias (como nitritos, nitratos y sales de curado) pueden representar un problema para la salud del consumidor al ser altamente cancerígenas o generar otro tipo de padecimientos en la salud.

Los nitritos y nitratos brindan ventajas para la industria cárnica al favorecer tanto aspectos organolépticos como conservantes porque no sólo le provee un color rosa agradable visualmente al producto sino que ejerce una acción bactericida, disminuyendo el olor generado por la descomposición y aportando firmeza al tejido animal, sin embargo, su

consumo no es inocuo y genera riesgos como: el aumento de metahemoglobina, que es incapaz de transportar oxigeno por la sangre y la formación de nitrosaminas, de las cuales está demostrada su acción cancerígena en hígado, estomago, páncreas, riñones, esófago y vejiga (Vargas, López & Flores, 2014) (Antón & Lizaso, 2011), por lo tanto ahora se ha reducido su uso y se intenta encontrar un sustituto natural que brinde ventajas semejantes.

Otro aditivo muy utilizado es la sal, la cual es necesaria para la producción de energía en las células y la regulación hidrostática en el cuerpo humano; la sal en los productos cárnicos aporta sabor al mismo, actúa como conservante, solubiliza proteínas y tiene efecto antimicrobiano, pero un exceso en el consumo de sal trae consecuencias para la salud como el aumento de la presión arterial; también puede causar inflamación de las encías, de la cavidad bucal y del sistema digestivo. Investigaciones realizadas demostraron que el consumo excesivo de sal no sólo aumenta el riesgo de desarrollar hipertensión arterial, sino que este consumo desmedido también puede contribuir a un gradual deterioro de la memoria, debido a que daña las paredes de los pequeños capilares del cerebro (Vargas, et al., 2014).

Los efectos negativos causados por los aditivos químicos son de conocimiento universal y su uso se encuentra reglamentado por el comité conjunto FAO/OMS los cuales han establecido una ingesta máxima tolerable de 70pg/mes (World Health Organization, 2011). Gracias a la difusión mediática de la información se ha generalizado el temor por padecer los efectos secundarios de estas sustancias artificiales y se ha generado una consciencia de lo natural, llevando al consumidor a preferir alimentos más naturales o con bajo contenido de sustancias sintéticas, en conclusión, esto ha tenido una incidencia negativa para las industrias cárnicas, ya que disminuye el consumo en la sociedad, baja la demanda y con ella las ventas del sector ganadero.

Pese a lo anterior, según la Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN), el consumo de carne de res anual por persona en Colombia, en el año 2016, fue de 19.1 kg/hab. ubicándose por encima del consumo de carne de cerdo y pescado; y en el 2017 fue de 18,1kg/hab., lo que confirma una disminución de su consumo por parte de la población. El consumo de cárnicos procesados en el año es de 4 kilos por persona según la industria de

alimentos Zenú. (Zenú, 2016); Estas cifras indican que tanto la carne como sus derivados son productos con alta demanda nacional, y por ende, las industrias cárnicas deben plantearse retos que involucren el uso de aditivos más naturales por el bienestar de los consumidores, en este siglo, el sector agroindustrial tiene una gran responsabilidad social y ya es hora de comenzar a asumirla.

El uso del clavo de olor como aditivo cárnico puede resultar beneficioso para el productor si este es hábil en el aprovechamiento del sabor proporcionado por la especia, en este caso se estaría obteniendo un producto sazonado desde su producción primaria, con un sabor que resulta familiar y agradable para el consumidor, además de contener menor cantidad de sustancias químicas pero con igual calidad microbiológica y una vida útil prolongada.

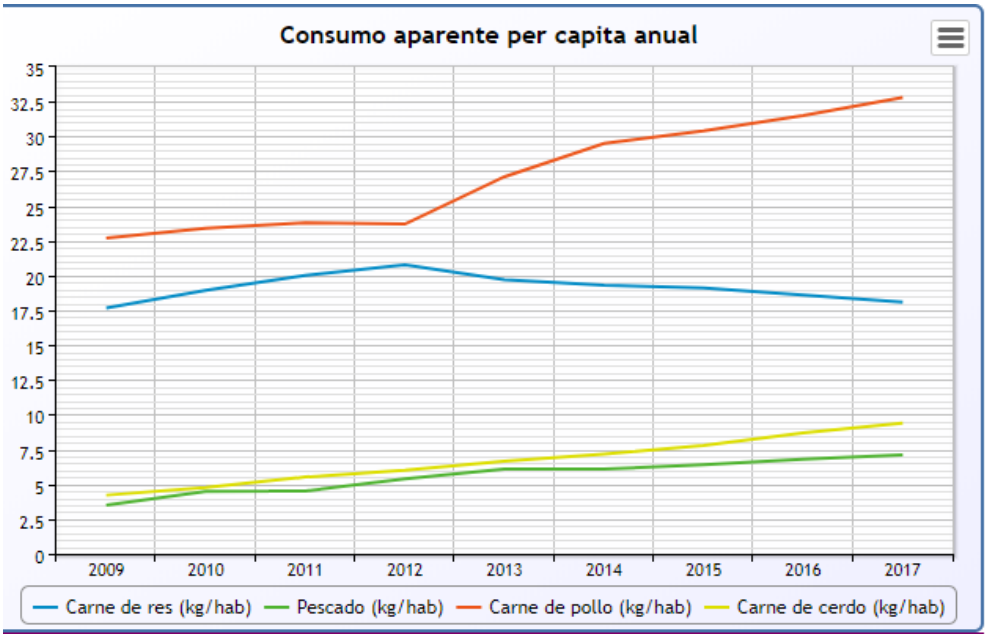

Figura 1: Fuente: Fedegán FNG, Fenavi, Porcicol y Fedeacua

*Consumo de proteína animal corresponde al consumo acumulado de carne de res, pollo y cerdo.

En Colombia, los primeros puestos de ventas de carnes están entre los comercializadores de carne de pollo y carne de res, sin embargo, el mercado porcícola ha ido ganando terreno y el consumidor colombiano, cada vez más, considera la carne de cerdo como una buena opción proteica en sus comidas, esto se debe en parte al precio de estos productos de origen animal: “un kilo de chatas está en $21.000, mientras que la misma cantidad, en carne de cerdo, puede costar $12.000, según Corabastos.” como se evidencia en la figura 2 (Alfonso, 2017).

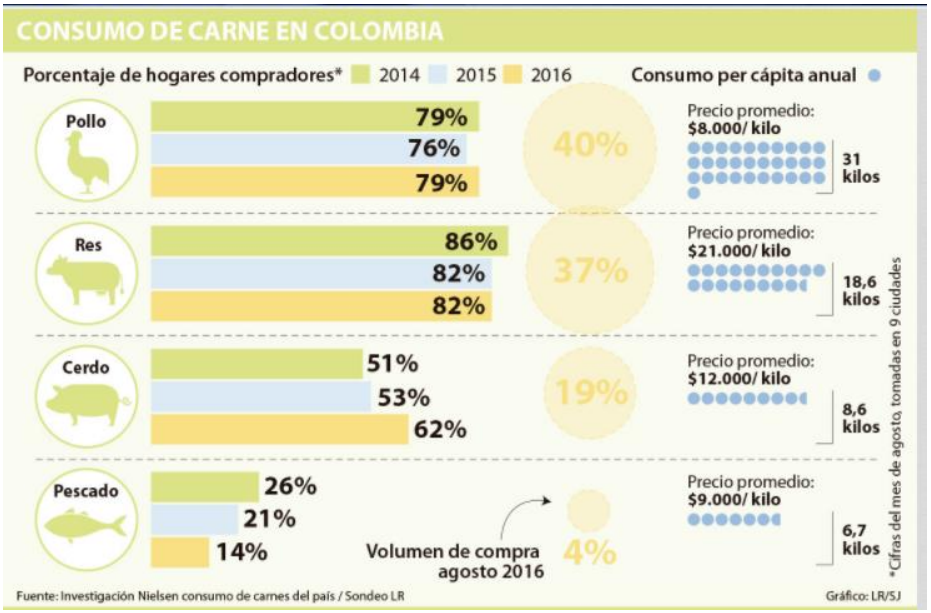

Figura 2: consumo de carne en Colombia en los años 2014, 2015, 2016. (Alfonso, 2017).

Múltiples estudios han revelado la importancia para la salud de las personas el consumir alimentos saludables, y más aún alimentos funcionales que aporten sustancias como vitaminas, minerales y demás, que ayuden a mejorar y/o prevenir algunas enfermedades.

La adición de ingredientes en alimentos preparados a base de carne que aporten beneficios para la salud se ha aumentado, esto permite que, desde estos alimentos consumidos frecuentemente, sea posible mantener e incluso mejorar la calidad de vida de los consumidores (Ospina, Restrepo & López, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) especializado en el cáncer clasificó la carne procesada como carcinógena para los humanos (Grupo 1) (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2015). Es por estas razones y muchas más que las tendencias de alimentación en las personas se han ido dirigiendo hacia el lado saludable, hacia el consumo de productos sin aditivos químicos y es ahí donde surge la necesidad de utilizar especias y hierbas que, tradicionalmente y durante cientos de años, se han consumido como condimentos esenciales en la cocina y pueden ser utilizadas como alternativa de conservación y un método de control en productos alimenticios, en especial productos cárnicos.

La especia clavo de olor (*Syzygium spp.*) ha demostrado tener actividad antimicrobiana ya que posee acciones bacteriostáticas por contener sustancias como el eugenol, el timol y el carvacrol, por lo que ya se ha venido estudiando su potencial como aditivo alimenticio y se ha estado usando en la industria de alimentos (Flores et al., 2014) (Ardila, et al., 2009).

Este tema de los aditivos y de la seguridad alimentaria se ha convertido en un reto para el sector de la industria cárnica y es por esto que ahora se trabaja bajo el concepto de "alimentos funcionales", es decir, alimentos o sustancias extraídas de ellos que, independientemente de su aporte nutritivo, proporcionan beneficios al organismo (Ospina, Restrepo & López, 2011), además de ser mucho más llamativos para los consumidores por el valor agregado.

Entre los objetivos trazados al inicio del estudio estuvo el demostrar que sí hay aditivos eficaces con pocos o ningún efecto colateral, de esta forma se estarían dando opciones a la industria alimentaria para el uso de aditivos más naturales obtenidos directamente de plantas como el clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), reemplazando así aditivos químicos o sintéticos.

Los efectos bactericidas y bacteriostáticos del Clavo de olor están comprobados experimentalmente tanto *in vitro* como *in vivo*, y es posible encontrar autores que respalden esta afirmación, además las especias han sido utilizadas por mucho tiempo como sazonantes

cárnicos o de otros alimentos, lo cual indica que no se presentarían alteraciones negativas organolépticas en los productos cárnicos.

Se han esclarecido las ventajas sociales y económicas de ofrecer productos con alto valor nutricional, pues estos permiten mejorar la reputación de la marca y mejoran la salud del consumidor, al tiempo que conservan y atraen nuevos clientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio de la especia clavo de olor (*Syzygium spp.)* frente a las siguientes bacterias: *Staphylcoccus aureus, Salmonella spp., Clostridium* sulfito reductor, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* sobre una matriz sólida (producto cárnico madurado) NTC 1325.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar *in vivo* la acción antimicrobiana de diferentes concentraciones de la especia clavo de olor (*Syzygium spp.)* en aceite esencial frente a microorganismos criterio microbiológico para un producto cárnico madurado según la NTC 1325.

- Comparar la actividad antimicrobiana del aceite de clavo de olor (*Syzygium spp.)* frente a la actividad antimicrobiana de la concentración de nitritos utilizada como conservante en un producto cárnico, utilizando microorganismos criterio microbiológico según la norma NTC 1325.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Aditivos en derivados cárnicos:

A los embutidos cárnicos son añadidas sustancias que no son consideradas ni consumidas normalmente como alimentos sino que se incorporan al mismo con un fin tecnológico u organoléptico, estas reciben el nombre de aditivos y son ampliamente utilizadas en el mercado universal. Por mencionar algunos aditivos antimicrobianos aceptados tenemos: benzoatos y ácido benzóico, ésteres, fenoles, ácidos orgánicos y derivados, ácido propiónico y propionatos, ácido sórbico y sorbatos, sulfitos, óxido de etileno, diacetato de sodio y nisina (García & García, 2008); sin embargo los aditivos alimentarios más utilizados son los nitratos, nitritos y cloruro de sodio.

El nitrato potásico y el nitrato sódico forman parte de las diversas sales de curado y su función es favorecer el enrojecimiento del producto y la conservación de características bioquímicas y organolépticas del alimento debido a su efecto bactericida, ya que, al evitar el crecimiento de microorganismos alterantes y/o patógenos se previene la descomposición de las proteínas y el crecimiento de biopelículas en la superficie del alimento; además de proporcionar estos beneficios también tiene otros efectos como retrasar el proceso de oxidación de los lípidos, con la consecuente disminución del característico olor de enranciamiento, y produce una mayor firmeza en la textura.

La sal, otro aditivo, desempeña las funciones de dar sabor al producto, actuar como conservante, solubilizar las proteínas y aumentar la capacidad de retención del agua de las proteínas; también es un agente antimicrobiano debido a que retarda su crecimiento. Normalmente, se agregan 2.5 partes de nitrato a cada 100 partes de sal común (Vargas, et al., 2014).

3.2 Aditivos antimicrobianos de origen natural:

Las especias se han empleado alrededor del mundo desde hace siglos como colorantes, saborizantes y conservantes, entre los países pioneros que tomaron esta iniciativa se encuentran los ubicados al sudeste de Asia como India y China (Shan *et al.,* 2005).

En la búsqueda de plantas que contengan sustancias con potencial antimicrobiano para reemplazar a los aditivos previamente mencionados se han hallado variadas especias que cumplen con la exigencia, entre estas tenemos:

Nombre común de la planta	Nombre científico de la planta	Componente	% máximo presente en el aceite esencial
Cilantro	*Coriandrum sativum*	Linalool E-2-decanal	26% 20%
Canela	*Cinnamomum zaylandicum*	Trans-cinnamaldehido	65%
Orégano	*Origanum vulgare*	Carvacrol Timol Terpineno Cymeno	80% 64% 2-52% 52%
Romero	*Rosmarinus officinalis*	Pineno Acetato de bornil Canfor 1,8 Cineolo	2-25% 0-17% 2-14% 3-89%
Clavo	*Syzygium aromaticum*	Eugenol Acetato de eugenil	75-85% 8-15%
Tomillo	*Thymus vulgaris*	Timol Carvacrol Terpineno Cimeno	10-64% 2-11% 2-31% 10-56%

Figura 3: Componentes de aceites esenciales que presentan propiedades antimicrobianas. Fuente: (García & García, 2008).

3.3 Clavo de olor *Syzygium aromaticum:*

Es una especia que pertenece a la familia *Myrtaceae*, también se conoce como *Eugenia carophyllata* y se caracteriza por habitar ambientes tropicales, en suelos ricos en humus arcillosos y lateríticos (pobres en sílice y ricos en hierro y alúmina), es originaria de Indonesia. Se obtiene de un árbol que demora, aproximadamente, 20 años en desarrollarse y es fructífero unos 50 años, mide entre 12 y 15 metros y florece dos veces al año. Se compone de 15 a 20% de aceite volátil que es el responsable de su olor y sabor característico; a su vez, este aceite se compone de: eugenol, acetato de eugenol, ácidos fenólicos entre otros. El aceite esencial de clavo de olor se extrae de las hojas, los tallos y los botones sin abrir. (Aguilar & López, 2013).

Se le han comprobado múltiples utilidades y se ha empleado históricamente en áreas como: agrícola, gastronómica y medicinal; entre las funciones que se le pueden atribuir encontramos: antiséptico, fungicida, antibacterial, antiviral, antiespasmódico, anestésico local; adicionalmente presenta una acción estimulante del apetito y la digestión, (Ramirez, et al., 2002); además, en un estudio realizado por la universidad de la Rioja, Departamento de Agricultura y Alimentación, se comprobó que también se comporta como promotor del crecimiento en animales (Zarazaga & Torres, 2002); posee propiedades antimutagénicas, diuréticas, cardiotónicas, carminativas y repelentes frente a vectores de parasitemias y viremias, sin olvidar su capacidad antioxidante. (Aguilar & López, 2013).

Entre sus propiedades se destaca su efecto antibacteriano; este se debe en su mayoría a los compuestos fenólicos, ya que su concentración es directamente proporcional a la efectividad antimicrobiana (Rahnama et al. 2012). Estos compuestos desnaturalizan las proteínas y reaccionan con los fosfolípidos de la membrana celular de las bacterias, cambiando su permeabilidad y produciendo su muerte (Nonsee et al., 2011).

El uso de clavo de olor se ha extendido a través de los siglos por su olor y sabor característicos, sin embargo, hace aproximadamente 3 décadas se descubrieron sus capacidades antimicrobianas de gran valor para la industria alimentaria, y se ha ido

profundizando sobre este descubrimiento. El clavo de olor tiene gran acogida en la perfumería y es muy empleado como sazonante (Zheng, Kenney & Lam, 1992).

La especia posee la capacidad intrínseca de inhibir el crecimiento de diferentes especies bacterianas de importancia industrial, sin embargo, es necesario aclarar que el método de extracción del aceite influye en la calidad final del mismo, y por ende, en su efectividad, así como se describen mejores resultados si se emplea un extracto etanólico del clavo de olor en lugar del aceite, esto lo demostraron Aguilar y López al encontrar que la CMI del clavo de olor es mayor a la del extracto (Aguilar & López, 2013).

Su composición es variada, pero en términos generales, los compuestos principales son: eugenol (49-98%) y acetileugenol, alfa y beta-cariofilenos, eugenil acetato, éster bencílico del ácido benzoico, éster bencílico del ácido salicílico (Vaca, 2013) y pequeñas cantidades de ésteres, cetonas, cariofileno, humuleno y alcoholes (Armas, Márquez, & Pretell, 2011).

3.4 Mecanismo de acción del clavo de olor:

La forma en que actúa el clavo de olor está basada en una sinergia de sus compuestos químicos y sus metabolitos, los cuales se encargan de deteriorar e inactivar sistemas enzimáticos claves en la síntesis de paredes, membranas, respiración celular y producción de energía (Armas, Márquez, & Pretell, 2011). La efectividad del clavo de olor como antimicrobiano depende principalmente de la concentración de los compuestos fenólicos, pues, se comprobó que son estos los principales actores en la actividad antimicrobiana del clavo de olor, sin embargo, los mecanismos exactos de los compuestos fenólicos no han sido determinados (Nonsee, Supitchaya, & Thawien, 2011).

Los aceites esenciales son de naturaleza hidrófoba, lo cual brinda ventaja frente a muchos antibióticos que no poseen la facilidad de penetrar el periplasma de las bacterias Gram negativas a través de proteínas de la membrana externa, y de esta manera efectuar acciones como la coagulación del contenido intracelular (García & García, 2008).

Los aceites esenciales de origen vegetal poseen la capacidad de afectar las proteínas presentes en la membrana citoplasmática, lugar en el que se hallan las enzimas ATPasas, siendo estas vulnerables al efecto de las moléculas lipídicas dando como resultado una disminución en el potencial energético de la célula y falla en la síntesis de componentes estructurales (García & García, 2008).

3.4.1 Compuestos fenólicos:

Eugenol: sustancia natural que ha sido aislada de diferentes plantas aromáticas como la canela, la nuez moscada y la albahaca, pero que la planta fuente por excelencia es el clavo de olor (45 – 90% del total de su composición).

A este compuesto químico natural se le han demostrado efectos antimicrobianos (frente a hongos, bacterias y virus), antiinflamatorio, analgésico, antioxidante, antitumoral y previene diabetes (Teixeira & otros, 2018).

El eugenol tiene una mayor efectividad frente a bacterias Gram negativas (a pesar de que se ha reportado resistencia por parte de *E. coli)*, esto es debido a la afinidad del eugenol por los lipopolisacáridos (rompe las cadenas entre monómeros y aumenta la permeabilidad de la membrana), (Nonsee, Supitchaya, & Thawien, 2011) los cuales se encuentran en mayor cantidad en este grupo de bacterias, y al tener las bacterias Gram-positivas mayor contenido de peptidoglicano no son blanco del eugenol (Abdali & Ajji, 2015).

Este compuesto químico producido por células vegetales inhibe la producción de enzimas extracelulares como amilasas y proteasas, lo que produce una elevada tasa de lisis celular (García & García, 2008).

Carvacrol y timol: estos compuestos actúan como desacopladores de membrana en la célula bacteriana (Armas, Márquez, & Pretell, 2011). Nonsee, Supitchaya, & Thawien (2011) afirman que el mecanismo de acción está dado por una desnaturalización de las

proteínas y también por unja reacción con los fosfolípidos de la membrana celular, de tal manera que se produce un desequilibrio osmótico con la subsecuente muerte celular.

Otros blancos de estos compuestos de origen natural son las rutas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético; por ejemplo, se observó que las bacterias expuestas a concentraciones menores a las letales de estos dos compuestos producen "cambios en la concentración de los ácidos grasos de la membrana celular, presentándose un aumento de los ácidos grasos insaturados". También se ha demostrado un efecto sobre la filtración del contenido celular, la coagulación del citoplasma y la disminución de la fuerza motriz (García & García, 2008).

3.5 Producto cárnico madurado:

La NTC 1325 define el embutido como un "producto cárnico procesado, crudo o cocido, que ha sido introducido a presión en tripas naturales o artificiales aprobadas para tal fin, aunque en el momento del expendio o consumo carezca de la envoltura empleada" (NTC 1325, p. 5, 2008). También define la maduración como un "conjunto de procesos bioquímicos y físicos, que tienen lugar en la fabricación de algunos productos cárnicos crudos en los cuales se controla la temperatura, humedad y ventilación, desarrollando el aroma, sabor, consistencia y conservación características de estos productos" " (NTC 1325, p. 6, 2008.

Comúnmente se reconoce el producto cárnico madurado por no requerir cocción previa a su consumo, en ocasiones son empleadas como "Snacks" o como acompañantes de platos.

3.6 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs):

Son enfermedades causadas por la ingesta de alimentos (sólidos o líquidos) contaminados con microorganismos patógenos, con sus toxinas o metabolitos, los casos se pueden dar de manera colectiva o individual; estas pueden ser clasificadas como infección, intoxicación o toxiinfección y en ocasiones presentan afecciones secundarias como síndrome urémico

hemolítico que puede producir daño renal. Es importante aclarar que las reacciones de hipersensibilidad y las alergias no son consideradas ETAs (González & Rojas, 2005).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se debe diferenciar entre brote (incidente en el que dos o más personas desarrollan sintomatología similar después de consumir alimentos en común) y caso (sólo un individuo afectado) y deben ser reportados de manera obligatoria, sin embargo, por variados motivos la cifra de informes está muy por debajo de la cifra real de casos ocurridos dado que en zonas rurales hay comunicación deficiente con los puntos de vigilancia epidemiológica, pero también debido a la falta de diagnóstico eficiente y confusión con otras enfermedades (OMS, 2016).

Estas enfermedades representan un problema serio de salud pública a nivel mundial, especialmente, en países en vía de desarrollo, puesto que afectan principalmente a poblaciones de bajos recursos, niños, mujeres embarazadas y ancianos (Forero, Galindo & Ramirez, 2017). El cuadro clínico se presenta, principalmente, con diarrea, vómitos, escalofríos, pero en casos más graves puede haber choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, entre otros. (González & Rojas, 2005).

En su libro Temas de Higiene de los alimentos, Caballero, (2008) afirma que “En la trasmisión de las enfermedades participan 3 elementos que reciben el nombre de tríada ecológica: el agente causal, el ambiente o vía de trasmisión y el hospedero susceptible” (p.216), sin embargo, la sola presencia del microorganismo no es patológica *per se* sino que es necesario alcanzar la dosis infectante, de lo contrario, el sistema inmune es capaz de sobrellevar al patógeno sin presentar sintomatología.

3.6.1 Intoxicaciones alimentarias: cuadro generado por el consumo de toxinas o metabolitos secundarios previamente formados por microorganismos en agua, plantas o tejido animal; también puede ser originado por toxinas de origen químico (metales pesados, insecticidas, y otros compuestos orgánicos) añadidas en el alimento de forma accidental o intencionada. El tiempo de incubación en esta presentación de la enfermedad es corto ya que el agente causal se encuentra preformado en el alimento.

Microorganismos capaces de causar intoxicación por metabolitos o toxinas son: *Escherichia coli, Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus* (Caballero, 2008).

3.6.2 Infecciones alimentarias: enfermedad que se produce al ingerir alimentos (líquidos o sólidos) que contienen microorganismos vivos patógenos (virus, bacterias, parásitos) capaces de sobrevivir y replicarse en la luz del intestino, de tal manera que desencadenan una infección dentro del tracto digestivo, su período de incubación es más prolongado ya que es necesario esperar la reproducción del agente (Caballero, 2008).

Los microorganismos pueden reproducirse en el alimento previo consumo cuando este no se almacena de forma correcta y se convierte en medio de cultivo para estos microbios, entonces el patógeno alcanza su dosis infectante, o puede reproducirse en el intestino del hospedador luego del consumo evadiendo las barreras innatas inmunes y causando infección, de esto también depende el tiempo de incubación. Entre los ejemplos más comunes de infecciones alimentarias se encuentran la salmonelosis, listeriosis, hepatitis A, toxoplasmosis, entre otros. Cuando el microorganismo ha entrado en el cuerpo humano puede reproducirse dentro de las células entéricas o pueden llegar al torrente sanguíneo (bacteriemia) e invadir otros tejidos u órganos. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2009)

3.7 Microorganismos Patógenos en un producto cárnico madurado según la norma técnica Colombiana 1325:

3.7.1 *Escherichia coli*: es un bacilo Gram negativo que se encuentra comúnmente en el intestino de los seres humanos y animales de sangre caliente como parte de la microbiota bacteriana. La mayoría de las cepas son inofensivas pero algunas pueden causar enfermedades de transmisión alimentaria; que generalmente se da por el consumo de agua o alimentos contaminados o productos cárnicos mal cocidos, estos últimos son una importante fuente de contaminación (OMS, 2016).

Existen variaciones genéticas de esta bacteria, estas variaciones reciben el nombre de "cepas" y difieren en patogenicidad, mecanismos de acción y características clínicas, estas cepas se clasifican en: *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroadherente y *E. coli* enteroagregativa (Caballero, 2008).

Para el aislamiento de esta bacteria se encuentra un amplio catálogo de medios de cultivo, sin embargo, el más empleado es el EMB y MacConkey sorbitol, en donde el crecimiento se reconoce por un característico brillo metálico. En industria el medio más empleado es el medio Chromocult, que es altamente selectivo para Coliformes totales y *E. coli* (Jure & otros, 2015).

3.7.2 *Salmonella spp:* bacilos gramnegativos móviles que no fermentan la lactosa, pero en su mayoría producen sulfuro de hidrógeno o gas por fermentación de los hidratos de carbono. Actualmente se conocen más de 2000 serotipos (Caballero, 2008). Está ampliamente distribuida en el medio ambiente así como también en el intestino de personas y animales sanos; debido a esto la bacteria se transmite vía fecal-oral, las heces son el principal foco de contaminación a los alimentos y aguas, cuando la persona ingiere el agua o alimento contaminado, adquiere una infección gastrointestinal denominada salmonelosis (Elika, 2013).

La salmonelosis está frecuentemente asociada al contacto con aves de corral y el consumo de carne avícola y huevos, pero también se puede encontrar en cerdos, bovinos, perros y gatos. Esta infección tiene un tiempo medio de incubación entre 12 y 72 horas, pero se han reportado casos de hasta 6 horas y se caracteriza por dolor abdominal, diarreas, dolor de cabeza y a veces vómitos, acompañado frecuentemente por fiebre, debido a esta pérdida constante de líquidos sobreviene una deshidratación que complica el cuadro. (Caballero, 2008).

3.7.3 *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva: cocos Gram positivos, aislados, se organizan en parejas, cadenas cortas o agrupados en racimos, es una bacteria no esporulada e inmóvil. *S. aureus* se diferencia de las demás especies del género por poseer la enzima coagulasa y proteína A; fermenta manitol y produce ADNasa. El medio más utilizado para su

aislamiento es el manitol salado (García, Fernandez, & Paredes, 1997). Están ampliamente distribuidas en el medio ambiente y hacen parte de la biota bacteriana de los humanos, principalmente se puede hallar en orofaringe. Se transmiten al ser humano a través de alimentos contaminados generalmente de origen cárnico y lácteo (la bacteria puede estar presente en la ubre de las vacas), provocando una toxiinfección alimentaria (INS, 2011), (Elika, 2013).

Las enterotoxinas A, B, C, D y E de *S. aureus* producen una intoxicación que se manifiesta de manera espontánea, entre 2 y 8 horas después de la ingestión del alimento con vómito, náuseas, cólicos e hipotensión. La toxina se forma en el alimento a temperatura ambiente y es termorresistente. La contaminación de los alimentos se puede dar por la manipulación por parte de personas con heridas infectadas o con secreciones, es decir, por las malas prácticas de manufactura (González & Rojas, 2005).
En un estudio realizado en 2015 por Abdali & Ajji se obtuvo una inhibición total de este microorganismo, es decir, se demostró la sensibilidad de S. aureus frente a los componentes activos del clavo de olor *Syzygium aromaticum.*

3.7.4 *Listeria monocytogenes*: bacteria Gram positiva que, en cultivos viejos, puede parecer Gram negativa por causa de la pérdida de su incapacidad para retener el colorante, bacilo intracelular capaz de invadir macrófagos y neutrófilos, anaerobio facultativo (crece más fácilmente en microaerofilia) sus condiciones óptimas atmosféricas presentan 5% oxígeno y 5-10% CO2 (Reguera & otros, 1995); puede sobrevivir sin dificultad en medios inanimados, adaptándose rápida y eficazmente a cambios extremos en las condiciones ambientales; son catalasa positiva, hidrolizan la esculina; el medio de cultivo Palcam es ampliamente empleado en industria para su aislamiento, y en clínica se usa agar sangre (colonias pequeñas, redondeadas, lisas, blanquecinas con B-hemólisis). (García, Fernandez, & Paredes, 1997).

Puede causar infecciones invasivas muy graves en el hombre y los animales, los cuadros que genera están asociados al sistema nervioso (meningitis) dado su tropismo por este sistema. La infección se adquiere generalmente mediante la ingesta de alimentos contaminados, aunque no siempre puede identificarse la fuente. Los principales reservorios son el suelo, el

agua, el tracto gastrointestinal de aves, peces y mamíferos incluyendo el hombre (Sanchéz & Palencia, 2010) (Elika, 2013).

Un factor primordial en la patogenia de *Listeria monocytogenes* es su capacidad de producir Hemolisina B, pues, se demostró que las variantes no patógenas carecen de esta enzima que permite lisar membranas celulares de eritrocitos; otro factor patogénico importante es la fosfolipasa C zinc-dependiente, que confiere actividad lecitinasa (Reguera & otros, 1995).

3.7.5 Esporas de *Clostridium* sulfito reductor: bacilos Gram positivos con extremos romos, anaerobios y sulfito reductores. Producen esporas muy resistentes a condiciones como la irradiación UV, los extremos de temperatura y pH, procesos de desinfección como la cloración y a medios acuáticos. Estas esporas son productoras de toxinas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza y forman parte de la biota intestinal de personas y animales y se transmite al ser humano a través de alimentos contaminados, por falta de higiene o su inadecuada manipulación. Las especies asociadas al consumo de alimentos son *Clostridium botulinum* cuya toxina afecta al sistema nervioso; y *Clostridium perfringens* cuya enterotoxina afecta al sistema digestivo (Elika, 2013).

La intoxicación se presenta cuando las esporas del microorganismo producen la enterotoxina en el tracto digestivo del hombre, la dosis infectiva es de 10^5 UFC/g y el cuadro clínico se caracteriza por diarrea con cólico, se pueden presentar náuseas pero no vómitos ni fiebre, que aparecen entre las 8 y 12 horas posteriores al consumo del alimento contaminado. Generalmente se presenta por la ingestión de cárnicos mal cocidos o recalentados, o de alimentos que contienen rellenos de carnes (Caballero, 2008).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Para la realización de la investigación se utilizaron diferentes materiales, cepas y reactivos, como: Cepas ATCC: *Escherichia coli* 25922, *Salmonella spp* 14028, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva 25923, *Clostridium* sulfito reductor 13124 y *Listeria monocytogenes* 13932, las cuales fueron aisladas en medios de cultivos comerciales sintéticos específicos para cada microorganismo como: Agar Chromocult, Agar Rambach, Agar Baird Parker, Agar SPS (sulfito polimixina sulfadiaxina) y Agar Palcam Listeria, respectivamente.
Para determinar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de clavo de olor se utilizó un aceite comercial 100% puro.

Para la elaboración del producto cárnico madurado se utilizó materia prima y características de elaboración según lo planteado en la Tesis de maestría de Rodríguez en el 2015 (Rodríguez, 2015).

4.2 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de la especia Clavo de olor (*Syzygium spp.*) frente a microorganismos criterio microbiológico según la NTC 1325

Para el desarrollo del pimer objetivo específico planteado se realizó el aislamiento y recuento de los microorganismos establecidos en la NTC 1325, utilizando la metodología que avala la International Commission on Microbiological Specifications for Foods, para análisis microbiológico en alimentos. (ICMSF, 2000).

4.2.1 Preparación y Evaluacion de la materia prima.

Para la evaluación de la materia prima se realizaron, como primera instancia, los análisis y procedimientos pertinentes en pro de disminuir la contaminación cruzada que pudiera alterar los resultados finales del estudio. Para la preparación del producto cárnico madurado se utilizó carne de res obtenida de una cadena de supermedado reconocida de la ciudad de Manizales

en empaque al vacío. Se procedió a desinfectar la superficie del material de empaque de la carne con una solución de amonio cuaternario a una concentración de 225 ppm con el fin de reducir las probabilidades de contaminación cruzada.

Las características físicas macroscópicas y organolépticas como: color, olor y frescura aparente fueron satisfactorias.

Para la evaluación de la calidad microbiológica de la materia prima se procedió a realizar los análisis según la International Commission on Microbiological Specifications for Foods, recuento en placa de *Staphylococcus* coagulasa positivo, recuento de Coliformes totales y *Escherichia coli,* recuento de esporas de *Clostridium* sulfito reductor y aislamiento de *Salmonella spp*. y de *Listeria monocytogenes*.

En el recuento de *Staphylococcus* coagulasa positivo, recuento de Coliformes totales y *Escherichia coli*, y recuento de esporas de *Clostridium* sulfito reductor, se tomaron 10g de materia prima (carne) y se hicieron 3 diluciones en agua peptona: 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} , posteriormente se sembraron por duplicado; Para esporas de *Clostridium spp.* se hizo choque térmico antes de la siembra: de cada una de las diluciones se tomó 10ml en un tubo esteril, se llevaron a 80ºC en baño María por 10 minutos y posteriormente se puso en contacto con hielo entre 5ºC y 0ºC durante 10 minutos.

Para el aislamiento de *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes*, se tomaron 25g de la muestra y adicionaron en el caldo de preenriquecimiento respectivo de 225 mL, se incubaron 24h a 37ºC; pasadas las 24h se sembró en el medio de cultivo selectivo para cada microorganismo por la técnica de agotamiento.

En La tabla 1 se relacionan los medios de cultivo, tipo de siembra, tiempo y temperaturas que se utilizaron para el recuento de cada microorganismo.

Tabla 1: Medios de cultivo y Temperaturas de Incubación por Microorganismo

Microorganismo	Medio de Cultivo	Tipo de Siembra	Tiempo y Temperatura de incubación
Staphylococcus coagulasa positivo	Agar Baird parker	Profundidad	24-48 Horas, 37ºC
Coliformes totales y *Escherichia coli*	Agar chromocult	Superficie	24-48 Horas, 37ºC
Esporas de *Clostridium* sulfito reductor	Agar SPS	Profundidad	48 Horas, 45ºC Anaerobiosis
Salmonella sp	*Salmosyst, Agar* Rambach	Agotamiento	24h a 37ºC
Listeria monocytogenes	Caldo *Listeria base* Agar Palcam Listeria	Agotamiento	24h a 37ºC microaerofilia

4.2.2 Reactivacion de cepas:

Las cepas ATCC se encontraban preservadas en glicerol; para su reactivación, se sometieron a baño María durante 5 minutos a 37 °C, posteriormente se sembraron por agotamiento en agar tripticasa soja y se incubaron durante 24 - 48 horas a 37°C, las esporas de *Clostridium* sulfito se incubaron en anaerobiosis y *Listeria monocytogenes* en microaerofilia por sus exigencias y condiciones repiratorias.

4.2.3 Evaluacion del producto cárnico madurado

Para evaluar la capacidad antimicrobiana del clavo de olor en el producto cárnico fermentado madurado (chorizo), la materia prima fue picada en un molino de carne marca Premier, referencia ED-1653, previamente sometido a un proceso de lavado y desinfección con amonio cuaternario a 225 ppm; para el procesamiento y almacenamiento de la materia prima se emplearon bolsas de polietileno estériles (Stomacher).

Las muestras de carne fueron inoculadas con los microorganismos a una concentración de 10^8 UFC (0.9 absorbancia a una longitud de onda de 600nm), y se homogenizaron por medio de un Stomacher a velocidad normal durante 30 segundos para obtener una distribución adecuada de los mismos, posteriormente se les adicionó 2,75 ml y 1,1ml de aceite necesario para obtener las concentraciones 1% y 2.5% respectivamente y para los controles se adicionaron nitritos de 0.02 gramos por kilogramo de carne, como se establece en la formulación establecida por Rodríguez-Restrepo en el 2015 (Rodríguez, 2015).

Se obtuvo 3 lotes, los cuales se especifican en la tabla 2.

Tabla 2: Productos obtenidos

Lote	Cantidad	Ingredientes	Concentración
Lote 1	5	1.1ml de aceite esencial de clavo de olor 5 microorganismos 110g de carne magra	1%
Lote 2	5	2,75ml de aceite esencial de clavo de olor 5 microorganismos 110g de carne magra	2.5%
Lote 3	5	0,0001g de Nitritos 5 Microorganismos 20g de carne magra	Control

Todas las bolsas que contenían estas muestras fueron almacenadas a 4ºC y se evaluaron los criterios microbiológicos pasadas 24 horas.

4.2.4 Elaboración del producto cárnico: para su elaboración se ejecutaron los pasos resumidos en la figura 4.

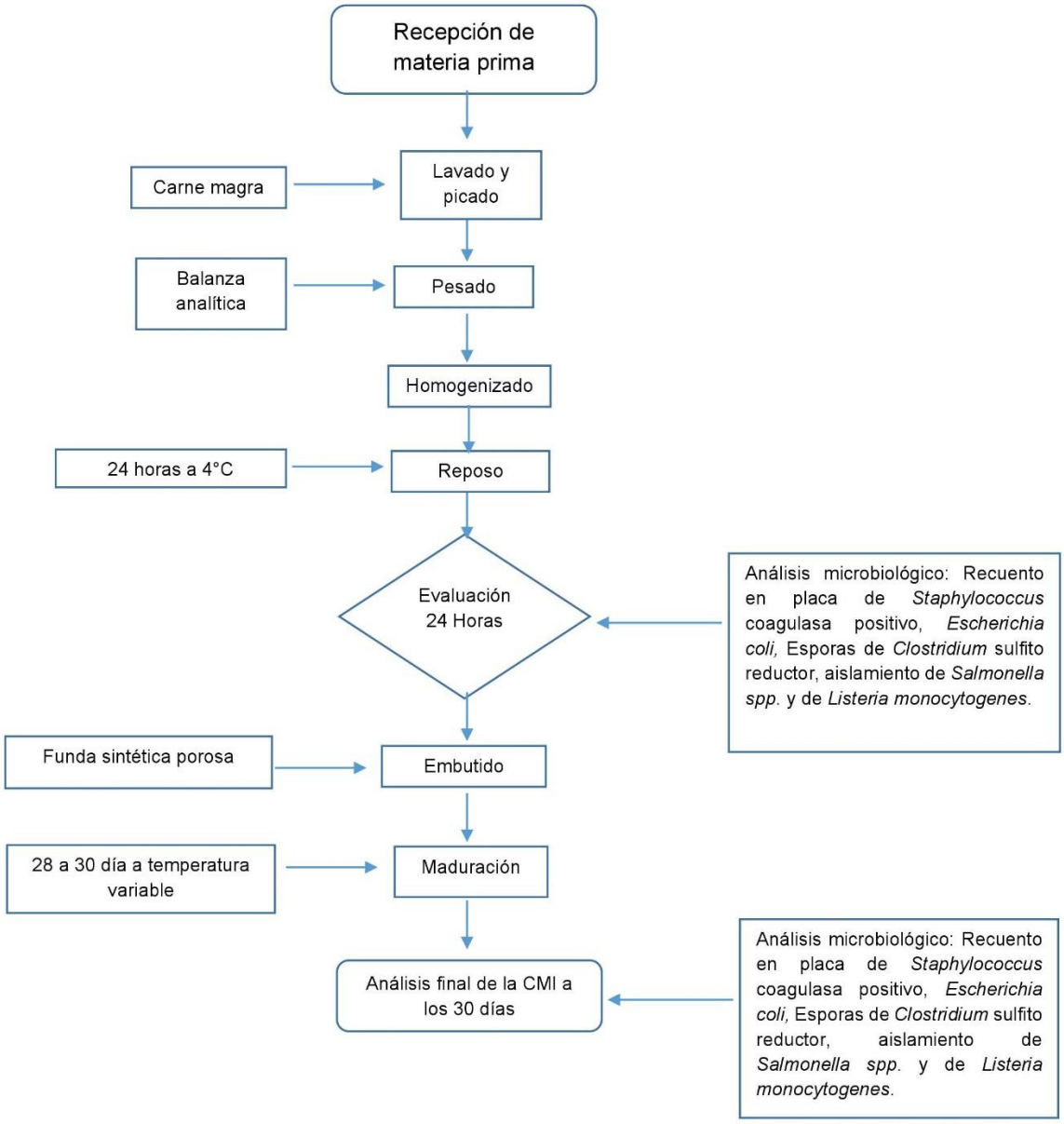

Figura 4: Elaboración del producto cárnico.

4.2.5 Proceso de maduración:

Se controló la cámara de maduración a temperaturas entre 12 y 16ºC y una humedad relativa de 70 y 80%; condiciones que permitieron el crecimiento de microorganismos en la etapa previa a la maduración. Los productos fueron puestos en el lugar de la cámara donde había una adecuada distribución del aire para favorecer el proceso de deshidratación (Rodríguez, 2015).

4.2.6 Recuento microbiológico: el protocolo a seguir para el recuento de microorganismos se especifica en la figura 5.

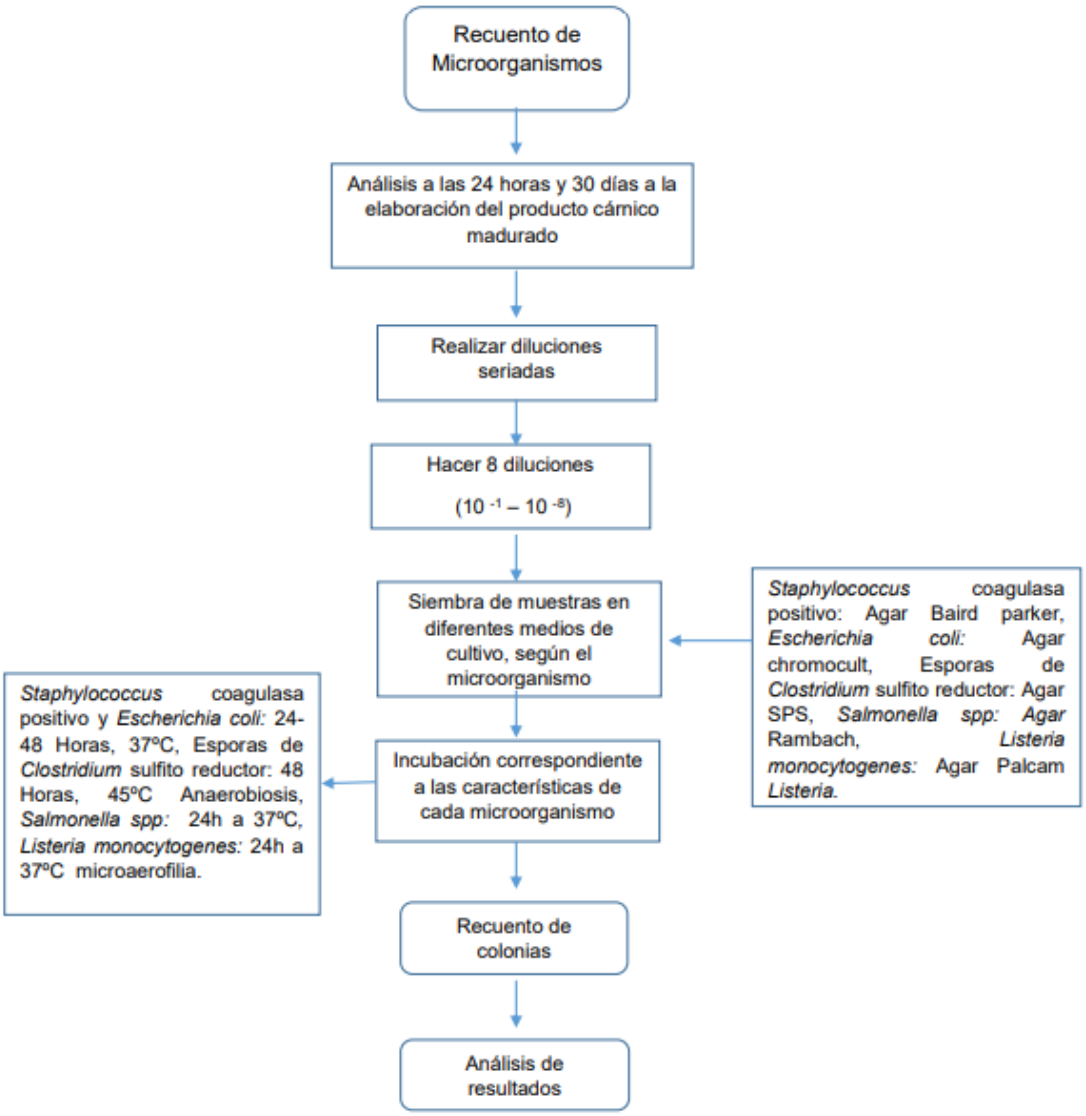

Figura 5: recuento microbiológico.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluar *in vivo* la acción antimicrobiana de diferentes concentraciones de la especia clavo de olor (*Syzygium spp.)* en aceite esencial frente a microorganismos criterio microbiológico para un producto cárnico madurado según la NTC 1325.

El análisis microbiológico realizado a la materia prima permitió evidenciar la buena calidad y la idoneidad sanitaria de la misma ya que, como se muestra en la tabla 2, hubo ausencia de *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes;* del mismo modo las esporas de *Clostridium* sulfito reductor, *Staphylococcus aureus* resultaron negativos;

Para *Escherichia coli* hubo un recuento de 1 UFC/g en la dilución 10^1, teniendo en cuenta que la siembra se realizó por superficie y aplicando las normas de recuento esto da como resultado 100UFC/g, siendo este un bajo recuento. (Tabla 3);

Tabla 3: Análisis microbiológico de materia prima

Microorganismo	Medio de cultivo	Resultados
Escherichia coli	Chromocoult	100 UFC/g
Staphylococcus aureus	Baird Parker	<100 UFC/g
Clostridium sulfito reductor	Agar SPS	<10 UFC/g
Salmonella sp.	Rambach	Ausente/25g
Listeria monocytogenes	Palcam	Ausente/25g

Los recuentos microbiológicos obtenidos que se relacionan en la tabla 4, indican en el tiempo 1 una inhibición bacteriana parcial desde las primeras 24 horas siguientes a la inoculación, teniendo en cuenta que la misma se realizó utilizando una concentración estándar de los microorganismos de 10^8 UFC/g; los resultados indican que la concentración de la especia de 2,5% tiene mayor inhibición que los nitritos sobre microorganismos como *E. coli* y *Clostridium spp.;* mientras *Salmonella spp.* se mostró más sensible al efecto del clavo de olor al 1% en el primer recuento. Para *L. monocytogenes* la concentración de 2,5% dio resultados muy similares a los del control.

Los datos obtenidos en el primer recuento fueron positivos para la investigación e indican una disminución significativa de la carga microbiana inicial, por ejemplo, los microorganismos evaluados tuvieron disminuciones de: 97,6% para E. coli, 76% para Salmonella spp., 91,4% para *Listeria monocytogenes*, 99.9% para *Clostridium spp.* y 90,7% para *Staphylococcus aureus*.

Lo anterior se traduce en una demostrada eficacia de la especia frente a estos patógenos alimentarios en la primera fase del experimento, con sólo un contacto de 24 horas.

Es importante resaltar que durante las primeras 24 horas se tuvo la mezcla carne-especia a temperatura de refrigeración, lo cual tiene un efecto bacteriostático sobre la mayoría de microorganismos psicrotrópicos, es decir, ralentiza el metabolismo celular evitando la reproducción óptima de los microorganismos (Tirado, Paredes, Velazquez, & Torres, 2005); sin embargo, esto no le resta crédito a la acción de la especia ni representa un obstáculo para el empleo del clavo de olor como aditivo ya que los productos cárnicos tienen su temperaturas idóneas de almacenamiento bajas, por lo tanto es una ventaja que estos dos factores resulten sinérgicos.

Tabla 4: Recuentos microbiológicos obtenidos en los dos tiempos evaluados.

RECUENTO MICROBIOLÓGICO UFC/g						
Microorganismo / Concentración	1 día			30 días		
	1%	2,5%	Control	1%	2,5%	Control
Escherichia coli	$15x10^6$	$24x10^5$	$12x10^6$	$10x10^1$	<100	$47x10^2$
Salmonella spp	$20x10^6$	$24x10^6$	$24x10^6$	$90x10^2$	<100	$80x10^3$
Listeria monocytogenes	$56x10^6$	$86x10^5$	$84x10^5$	$80x10^1$	<100	<100
Clostridium spp.	$50x10^4$	$12x10^4$	$19x10^5$	$10x10^5$	$42x10^5$	$22x10^4$
Staphylococcus aureus	$20x10^6$	$93x10^5$	$60x10^5$	$10x10^1$	<100	$10x10^1$

Para el análisis de los resultados obtenidos en el tiempo 2, es decir, transcurridos 30 días del proceso de maduración debemos tener en cuenta las condiciones finales del producto cárnico, principalmente la Actividad de agua (Aw) que es determinante en el crecimiento de microorganismos, puesto que si el agua libre presente en el alimento es mínima e insuficiente los microorganismos no pueden desarrollarse por carencia de reacciones químicas que den lugar al metabolismo celular (Dominguez & Ramirez, 2017).

Según Dalmaus & Rivera (2012) el Aw final de un embutido madurado oscila entre 0,82 y 0,87, y según Gonzalez *et al.* (2013) un producto madurado es aquel que posee un Aw inferior a 0.90, teniendo en cuenta estos datos es importante aclarar que el Aw adecuado para el desarrollo óptimo de la mayoría de las bacterias de interés epidemiológico se encuentra por encima de 0.9, lo que lleva a concluir que en un producto madurado no debería presentarse crecimiento de ninguno de los microorganismos analizados, sin embargo, se presentó crecimiento de microorganismos como *Listeria monocytogenes, Clostridium spp., Salmonella spp., Staphylococcus aureus y E. coli.*

Esto indica que el estado microbiológico final del alimento está determinado por otros factores diferentes al Aw como la temperatura, la humedad relativa, disponibilidad de nutrientes, la generación de mecanismos de resistencia por parte de la célula, el sinergismo con otros microorganismos como hongos, entre otros. (Vásquez, 2010). Como también por la materia prima, ya que la carne fresca por su contenido nutricional y su alto valor de actividad de agua (0.98 - 0.99) está considerada dentro del grupo de los alimentos altamente perecederos, y es muy susceptible a la contaminación por microorganismos, debido a que ofrece las condiciones necesarias para su crecimiento; entre estos microorganismos pueden incluirse algunos patógenos como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Yersinia enterolitica/pseudotuberculosis, Campylobacter jejuni/coli, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Bacillus cereus, Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum,* (Restrepo, Arango, Amézquita, & Restrepo, 2001) y con este estudio se demostró que no se logra una inhibición completa en los microorganismos trabajados, por lo tanto si no se tiene una materia prima de buena calidad, el producto final va a tener alto recuento de microorganismos.

Si se comparan los recuentos en ambos tiempos es posible notar un decremento significativo en el desarrollo de *E.coli (*Negativo en tiempo 2)*, Salmonella spp. (*Negativo en tiempo 2)*, L. monocytogenes* (Negativo en tiempo 2) *y Staphylococcus spp.* (Negativo en tiempo 2), al emplear la concentración 2,5% de la especia.

En el caso de *Clostridium spp*. se cumple parcialmente lo encontrado en diferentes artículos como el publicado por Sánches & Martinez (2017) en el que demostraron la ineficacia del clavo de olor en el control de *Clostridium sp*p, y esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio; por otra parte presenta una discordancia entre lo relatado en otros artículos y los resultados obtenidos en el presente ensayo experimental, pues, a pesar del Aw bajo que presentan los productos madurados hubo un extenso crecimiento de *Clostridium spp.* cuando afirma que no hace falta preocuparse por el crecimiento de microorganismos culpables de descomposición y putrefacción, puesto que las condiciones que alcanza el producto no permiten el crecimiento de los mismos. El experimento mostró que, pese a las afirmaciones de Vidal (1997), hubo crecimiento de *Clostridium spp* y de *E. coli, Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* en los chorizos que contenían la concentración de nitritos usualmente empleada.

Ya que se observó prevalencia del microorganismo resulta necesario hallar una explicación que se extralimite a las condiciones de temperatura y actividad de agua, analizando el fenómeno de manera holística como se intenta hacer a continuación:
En el primer recuento microbiológico, las condiciones de temperatura del producto previas al análisis ejercían un efecto inhibitorio sobre *Clostridium spp*, que tiene su temperatura óptima por encima de 43°C, lo cual, aunado a la capacidad microbicida del Clavo de olor, resultó en un recuento bajo; sin embargo, luego de 30 días a una mayor temperatura el microorganismo evidenció crecimiento elevado aún en presencia del clavo de olor, mostrándose más sensible al efecto de los nitritos, lo cual es entendible si se tiene presente lo volátil que resulta el clavo de olor, la resistencia al clavo de olor que ha presentado en otros estudios y los factores de resistencia frente a la desecación que posee *Clostridium spp.*

5.2 Comparar la actividad antimicrobiana del aceite de clavo de olor (*Syzygium sp.)* frente a la actividad antimicrobiana de la concentración de nitritos utilizada como conservante en un producto cárnico madurado, utilizando microorganismos criterio microbiológico según la norma NTC 1325.

Si se compara la inhibición microbiana producida por el aceite esencial de la especia clavo de olor (*Syzygium spp)* con la inhibición producida por los nitritos tradicionalmente utilizados en este tipo de productos, se demuestra que esta primera tiene mayor capacidad inhibitoria que las sales de curado, por lo cual es útil para conservar el alimento cárnico y sigue siendo una opción muy conveniente para la industria cárnica.

Los resultados al emplear la concentración 1% demostraron que, aún a bajas concentraciones, el aceite de clavo de olor, gracias a su composición química, inhibe más eficazmente los microorganismos que los nitritos; exceptuando a *Listeria monocytogenes*, caso en el cual resultó negativo cuando se usaron los nitritos y hubo un escaso crecimiento al usar la especia al 1% y a *Staphylococcus aureus* que tuvo el mismo recuento que con los nitritos.

En términos generales podemos decir que la concentración más eficiente de aceite esencial de clavo de olor para controlar microbiológicamente el producto es la de 2,5%. Como ejemplo tenemos que resulta más eficaz el uso de *Syzygium spp*. que de sales de curado en el tratamiento de *E.coli*, pues el recuento fue menor en los dos tiempos al emplear esta concentración de la especia.

La concentración más alta del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium spp.)* utilizada en este estudio mostró una efectividad del 100% frente a *Salmonella spp.* en el segundo tiempo (Recuento negativo).

En los recuentos en los que se empleó la concentración de 1% del aceite esencial y los nitritos hubo crecimiento bacteriano, lo cual indica que, aunque *Salmonella spp* requiere un Aw cercana a 0,95 para desarrollarse óptimamente (Vásquez, 2010), puede crecer en condiciones

donde la actividad de agua sea menor, por lo cual resulta necesario el empleo de conservantes en el producto cárnico para que la inhibición sea completa.

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo muy comúnmente encontrado en productos cárnicos refrigerados (Tirado, Paredes, Velazquez, & Torres, 2005) que es el protagonista de ETA's a nivel mundial y que soporta muy bien las bajas cantidades de agua libre creciendo en condiciones de hasta 0,86 de Aw (Vásquez, 2010), así que si se presentó un recuento negativo de este microorganismo en el análisis microbiológico, como en el segundo tiempo al emplear la concentración de 2,5% de la especia, es debido a que los componentes como el carvacrol, eugenol y timol presentes en el clavo de olor sí son antimicrobianos eficaces frente a *Staphylococcus aureus* y que pueden reemplazar a los nitritos, pues, aunque fue un recuento bajo el que se obtuvo al emplear nitritos, es indicativo de una menor efectividad.

Siguen evidenciándose las ventajas de usar productos naturales para alargar el tiempo de almacenamiento de los productos; hay autores que sugieren un mayor daño en las células bacterianas con el empleo de especias que con el empleo de nitritos y nitratos (Suárez, Restrepo, & Carrasquilla, 2011).

Se han realizado muchos estudios con aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas, clasificadas como especias, en especial del clavo de olor, los cuales han presentado una gran capacidad inhibitoria de bacterias, las cuales por su acción lipofílica tienen la capacidad de pasar las membranas celulares, romper polisacáridos, ácidos grasos y lípidos, permeabilizando la membrana celular lo que conduce a la muerte celular (Ardila, Vargas, Perez, & Mejía, 2009).

El recuento negativo de *Listeria monocytogenes* tanto en la concentración 2,5% como en el control indica que la especia es efectiva en el tratamiento de este microorganismo, contrario a los resultados obtenido por Sánchez y Martinez (2017) en su estudio con especias, quienes afirman que el clavo de olor no tiene efecto sobre esta bacteria; sin embargo, en otro estudio realizado en la Universidad de Georgia por Mytle *et.al* (2006) se describe la eficacia del clavo

de olor en el tratamiento de *Listeria monocytogenes* que se evidenció tras una disminución importante en la cantidad de bacteria inoculada.

La importancia de este estudio radica en que se evalúa la capacidad antimicrobiana del aceite esencial del clavo de olor frente a los microorganismos patógenos que son criterio microbiológico en un producto cárnico madurado fermentado según la NTC 1325 que establece los requisitos que deben cumplir estos productos; evaluando las características específicas de crecimiento incluyendo a microorganismos difíciles como *Clostridium perfringes*, el cual, por su capacidad toxigénica, formación de esporas y requerimiento de anaerobiosis hace difícil su aislamiento; también tener en cuenta que se trabajó *in vivo*, haciendo pasar el producto por todas las etapas necesarias para el producto terminado.

Bajo estas condiciones se observa, como este aceite muestra una inhibición en 4 de los 5 microorganismos trabajados pero no produce efectos inhibitorios en *Clostridium spp.*, que puede ser por los factores antes expuestos, pero es necesario entonces realizar nuevos estudios que permitan conocer una mayor probabilidad de sustituir los conservantes químicos que causan efectos dañinos sobre la salud por especias naturales que aportan beneficios.

6. CONCLUSIONES

- La concentración de aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium spp.)* que tuvo mayor efectividad en el control de los microorganismos criterio microbiológico estipulados en la NTC 1325 fue la de 2,5% porque fue la que permitió obtener recuentos negativos en el análisis microbiológico del producto cárnico madurado para las bacterias: *Salmonella spp, Listeria monocytogenes, Escherichia coli y Staphylococcus aureus*; el único microorganismo que creció en presencia de las dos concentraciones de clavo de olor y de los nitritos fue *Clostridium spp*.

- Las sales de curado (nitritos) comparadas con la especia no muestran mayor efectividad como conservantes cárnicos para evitar el crecimiento bacteriano, pues se demostró que el clavo de olor tiene mayor efectividad en 4 de los 5 microorganismos evaluados; la única bacteria que se mostró resistente fue *Clostridium spp*. Esto indica que el uso de nitritos no es la única ni la mejor opción para la industria cárnica, mientras que al emplear la especia clavo de olor (*Syzygium spp.)* esta gran industria se ve beneficiada al igual que sus consumidores habituales.

- El producto cárnico madurado, pese a su bajo Aw, requiere de la adición de sustancias que permitan la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos además de requerir un almacenamiento a temperatura de refrigeración para evitar la reproducción de *Clostridium spp.*

7. RECOMENDACIONES

Dados los resultados obtenidos en el ensayo descrito en este documento y teniendo en cuenta el impacto que puede llegar a tener el presente estudio para la industria alimentaria, especialmente la industria cárnica, es relevante presentar las consideraciones que resulten pertinentes y que permitan la obtención de un producto óptimo para el consumo tanto microbiológica como sensorialmente. En pro de lo anterior se presentan las siguientes recomendaciones:

- Realizar estudios donde se evalúe la efectividad del clavo de olor en sinergismo con otras especias como la canela, el tomillo y el orégano que generen mayor inhibición del microorganismo *Clostridium spp.* y sus esporas.

- Evaluar diferentes metodologías de estudio como la impregnación de las fundas sintéticas con la especia para disminuir la volatilización de la misma y permitir una acción más prolongada.

- Evaluar el efecto que puede tener la especia sobre las características organolépticas del producto cárnico madurado mediante el estudio de los compuestos encargados del olor y el sabor de la especia y su relación con los componentes activos de la misma, para determinar la viabilidad de conservar el efecto bactericida sin que las propiedades sensoriales del producto se vean afectadas por el clavo de olor.

- Complementar el estudio con la determinación de parámetros físico-químicos del producto terminado como el Aw, pH, acidez, entre otros, para favorecer el análisis y la correlación de los resultados microbiológicos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdali, H., & Ajji, A. (2015). Development of antibacterial structures and films using clove bud powder. *Industrial Crops and Products*, 214-219.
- Aguilar, A., & López, A. (2013). Extractos y aceite esencial del clavo de olor (Syzygium aromaticum) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *Tema Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 35 - 41.
- Alfonso, K. (9 de marzo de 2017) Los colombianos comen 31 kilos de pollo, 18 de res y ocho de cerdo cada año. La República. Recuperado de https://www.larepublica.co/economia/los-colombianos-comen-31-kilos-de-pollo-18-de-res-y-ocho-de-cerdo-cada-ano-2482001
- Ardila, M., Vargas, A., Perez, J., & Mejía, L. (2009). ENSAYO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE Allium sativum, Coriandrum sativum, EugeniaCaryophyllata, Origanum vulgare, Rosmarinus officinalis Y Thymus vulgaris FRENTE A Clostridium perfringens. *Biosalud* .
- Armas, C., Márquez, L., & Pretell, C. (2011). Efecto del aceite esencial de clavo de olor (Syzygium aromaticum), canela (Cinnamomum zeylanicum) y su combinación sobre la acción antifúngica en Aspergillus flavus en agar chicha de maíz (Zea mays L.), variedad morado. *Pueblo continente*, 124 - 132.
- Caballero, A. (2008). *Temas de Higiene de los Alimentos.* La Habana: Ciencias Médicas.
- Celis, L. (2010). Usos medicinales del clavo de olor Syzygium aromaticum (L.)
- Dalmaus, M., & Rivera, D. (2012). E*laboración de un embutido crudo fermentado tipo chorizo a base de carne de búfalo con adición de cultivos Stárters* (Tesis de Pregrado). Universidad de Cartagena, Cartgena de Indias.
- Dominguez, V., & Ramirez, J. (2017). Characterization of physicochemical and microbiological properties of gelatina blanca de pata de res. *Entre Ciencia e Ingeniría*, 50-55.
- Forero, Y., Galindo, M., & Ramírez, G. (2017). Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimetos en restaurantes escolares en Colombia. *Revista chilena de nutrición*, 325-332.

- Galeano, A. (2017). De omnívoro a vegetariano: una exploración de los caminos que permiten el cambio de dieta alimenticia. (Trabajo de grado). Pontificia Universidad Javeriana.
- García, P., Fernandez, T., & Paredes, F. (1997). *Microbiología clínica aplicada* (Tercera ed.). España: Días de Santos S.A.
- García, R., & García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 41-51.
- González, R., Totosaus, A., Caro, I., & Mateo, J. (2013). Caracterización de Propiedades Químicas y Fisicoquímicas de Chorizos Comercializados en la Zona Centro de México. Información tecnológica, 24(2), 3-14. https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642013000200002
- González, T., & Rojas, R. (2005). Enfermedades Transmitidas por Alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 380-390.
- ICONTEC. (2008). *NTC 1325.*
- Jure, M., Condorí, M., Pérez, G., Catalán, M., López, A., Zolezzi, G., . . . Castilo, M. (2015). Aislamiento y caracterización de Escherichia coli O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Revista Argentina de microbiología*, 125-131.
- Mytle, N., Anderson, G., Doyle, M., & Smith, M. (2006). Antimicrobial activity of clove (Syzgium aromaticum) oil in inhibiting Listeria monocytogenes on chicken frankfurters. Elsevier Ltd., 102-107.
- Nonsee, K., Supitchaya, C., & Thawien, W. (2011). Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove (Eugenia caryophyllata Thunb.) oil. *International Food Research Journal*, 1531-1541.
- OMS. (08 de Agosto de 2016). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de http://www.paho.org
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico.* Roma.
- Pastrana, Y., Durango A., & Acevedo, D. (2017). Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patogenos . Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 56-65.

- Reguera, J., Nieto, J., Eiros, J., González, Z., Ortiz, R., & Rodriguez, A. (1995). Infección alimentaria por Listeria monocytogenes. *Bol Pediat*, 215-224.

- Restrepo, D., Arango, C., Amézquita, A., & Restrepo, R. (2001). Industria de Carnes . *Industria de Carnes* , 1-6 .

- Rodríguez, R. (2015). *ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO CÁRNICO MADURADO BAJO EN SODIO Y SALES DE CURADO CON ATRIBUTOS FUNCIONALES.* Manizales: Universidad NAcional de Colombia.

- Sánchez, C., & Martínez, V. (2017). *Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las especias en rama Tomillo (Thymus), Orégano (Origanum vulgare), Clavo de olor (Syzygium) utilizadas en un producto cárnico madurado fermentado frente a microorganismos criterio microbiológico según la norma NTC1325.* (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Manizales, Manizales).

- Shan B., Yizhong Z., Sun M. & Corke H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. J*ournal of Agricultural and Food Chemistry* 53:7749-7759.

- Suárez, H., Restrepo, D., & Carrasquilla, L. (2011). Influencia de Especias Naturales en la Vida Útil y Aceptación Sensorial de Salchicha Bratwurst. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 6007-6013.

- Teixeira, R., Rodrigues, P., Manoel da Silva, A., Goncalves, M. P., Rossi, B., Salgado, R., . . . Pacienza, W. (2018). Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 274 - 286.

- Tirado, J., Paredes, D., Velazquez, G., & Torres, A. (2005). CRECIMIENTO MICROBIANO EN PRODUCTOS CÁRNICOS REFRIGERADOS. *CYTA - Journal Food*, 66-76.

- Vaca, V. (2013). Estudio de la aplicación de aceites esenciales de canela (Cinnamomum zeylanicum) y clavo de olor (Syzygium aromaticum) para optimizar la calidad microbiológica y sensorial de cuatro tipos de hortalizas: col de repollo (Brassica oleracea var. capitata cv. bronco), colorada (Brassica oleracea var. capitata f. rubra), lechuga iceberg tipo salinas (Lactuca sativa var. capitata) y espinaca (Spinacia oleracea L.) (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato. http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8418/1/AL%20529.pdf

- Vargas C, López AR, et al. (2014) Evaluación de la Concentración de Nitratos/Nitritos y Cloruro de Sodio en Embutidos Expendidos en la Ciudad de Tarija. Ventana Cientifica. 1(7), 1–8.
- Vásquez, G. (2010). La contaminación de los alimentos, un problema por resolver. *Salud UIS*, 48-57.
- WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants. 57 report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 909. Geneva: WHO; 2001
- Zarazaga, M., & Torres, C. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales ¿Vamos por el buen camino? *Gac Sanit*, 109 - 112.