



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*) Y TOMILLO (*Thymus
vulgaris L.*) COMO POTENCIALES BIOCONSERVADORES EN CARNE DE
POLLO”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR

PAOLA NATALY SOLÍS CAMPOVERDE

RIOBAMBA – ECUADOR

2011

DEDICATORIA

Al cerrar este capítulo en mi vida, el cual considero uno de los más importantes, ya que con él se me abrirán nuevas oportunidades quiero dedicar este trabajo a todos los que de una u otra manera han colaborado en la realización de este gran sueño.

A Dios por darme la oportunidad de vivir y junto a Jesús y a la Virgen María por guiar mis pasos y regalarme una vida llena de bendiciones.

A mis padres Florencio y Patricia por su apoyo, comprensión y por ser mi ejemplo de lucha y trabajo.

A mi hija Doménika por su amor y compañía en esta gran batalla que supimos llevar juntas.

A mi hermana Vanessa por su cariño, amistad y confianza.

A mis demás familiares por su colaboración y palabras de aliento.

Y a todos mis amigos y amigas con lo que compartí esta bonita etapa de mi vida.

A todos ustedes con gratitud y amor.

Paola Nataly

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento es a Dios por haberme orientado por el camino del bien, por darme la salud, la fuerza y la fe. Además porque he aprendido a valorar lo bello de la vida.

A mi familia por su apoyo incondicional porque me han enseñado valores y por ellos sé que todo lo que realice será gratificado por mi esfuerzo y sacrificio.

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a mis Profesores por la formación académica y quienes con nobleza y entusiasmo, depositaron en mí sus valiosos conocimientos y me ha enseñado a ser una persona con ética y moral profesional.

A la Dra. Janneth Gallegos por su valiosa colaboración, apoyo, ayuda y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis Además por su amistad y dedicación.

A la Dra. Olga Lucero Miembro del Tribunal de Tesis por sus ideas y por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo

A todas las personas que de una u otra forma me han apoyado a culminar este gran sueño y a esas personas que estuvieron en los buenos y malos momentos los cuales no olvidaré.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que El trabajo de investigación: “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*) COMO POTENCIALES BIOCONSERVADORES EN CARNE DE POLLO**” de responsabilidad de la señorita egresada Paola Nataly Solís Campoverde, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dra. Yolanda Díaz DECANA FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dr. Luis Guevara DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA	-----	-----
Dra. Janneth Gallegos DIRECTOR DE TESIS	-----	-----
Dra. Olga Lucero MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Tc. Carlos Rodriguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----
NOTA DE TESIS	-----	

Yo Paola Nataly Solís Campoverde, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la tesis de grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

Paola Nataly Solís Campoverde

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AMH	Agar Müller Hinton
AND	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
a_w	Actividad del agua
c	Concentración
CMH	Caldo Müller Hinton
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
°C	Grados Celsius
cm ²	Centímetro cuadrado
EDTA	Etilen-Diamino-Tetra-Acetato
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
f	Factor de dilución
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administración
g	Gramos
h	Horas
IDA	Ingesta Diaria Aceptada
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
Kcal	Kilocalorias
LIA	Lysine Iron Agar
m	Metros
mg	Miligramo
mL	Mililitro

mm	Milímetro
M	Muestra
n	Número de colonias
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCA	Plate Count Agar
pH	Potencial de Hidrógeno
Ps.	Pseudomona
ppm	Partes por millón
R ₁	Primera repetición
R ₂	Segunda repetición
R ₃	Tercera repetición
t	Tiempo
Tamb	Temperatura ambiente
Trfig	Temperatura de refrigeración
Tcong	Temperatura de congelación
TSA	Agar Soya Tripticasa
TSB	Caldo Soya Tripticasa
TSI	Triple Sugar Iron
U.V.	Ultravioleta
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
Vit.	Vitamina
XLD	Xilosa, Lisina, Desoxicolato
%	Porcentaje
μL	Microlitro

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

1.	PARTE TEÓRICA	3
1.1	Actividad antimicrobiana.....	3
1.1.1	Generalidades.....	3
1.1.2	Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	4
1.1.3	Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana.....	5
1.1.3.1	Método de difusión de agar.....	5
1.2	Orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>)	6
1.2.1	Clasificación científica del orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	6
1.2.2	Hábitat y características del orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	7
1.2.3	Propiedades medicinales del orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>)	8
1.2.4	Composición química del orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	8
1.3	Aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>)	12
1.3.1	Uso terapéutico del aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	12
1.3.2	Toxicidad del aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>)	14
1.3.3	Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano.....	14
1.4	Tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>).....	15
1.4.1	Clasificación científica del Tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>).....	15
1.4.2	Hábitat y características del tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>).....	16
1.4.3	Propiedades medicinales del tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>).....	18
1.4.4	Composición química del tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>)	19
1.5	Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>)	19

1.5.1	Uso terapéutico del aceite esencial de tomillo.....	20
1.5.2	Toxicidad del aceite esencial de tomillo.....	21
1.5.3	Efecto antibacteriano del aceite esencial de tomillo.....	22
1.6	Conservantes naturales.....	23
1.7	Aceites esenciales.....	24
1.7.1	Generalidades.....	24
1.7.2	Localización de los aceites esenciales	25
1.7.3	Función de los aceites esenciales.....	27
1.7.4	Clasificación de los aceites esenciales.....	27
1.7.4.1	Por su consistencia.....	27
1.7.4.2	Por su origen.....	28
1.7.5	Control de calidad de aceites esenciales.....	28
1.7.6	Toxicidad de los aceites esenciales.....	29
1.8	Carne de pollo.....	29
1.8.1	Composición de la carne de pollo.....	30
1.8.2	Propiedades nutritivas de la carne de pollo.....	30
1.8.3	Proteínas y grasas buenas de la carne de pollo.....	31
1.8.4	Minerales presentes en la carne de pollo.....	32
1.8.5	Vitaminas presentes en la carne de pollo.....	33
1.8.6	Ventajas e inconvenientes del consumo de carne de pollo.....	33
1.8.7	Contaminación, conservación y alteración de la carne de pollo.....	34
1.8.7.1	Contaminación de la carne de pollo.....	34
1.8.7.2	Conservación de la carne de pollo.....	35
1.8.7.3	Alteración de la carne de pollo.....	36
1.8.8	Deterioro de la carne de pollo.....	36
1.9	Enfermedades transmitidas por alimentos.....	37
1.10	<i>Salmonella</i>	40
1.11	Bacterias proteolíticas.....	43
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	45
2.1	Lugar de investigación.....	45
2.2	Materiales, equipos y reactivos.....	45
2.2.1	Material vegetal y cárnico.....	45
2.2.2	Equipos.....	46
2.2.3	Materiales.....	47
2.2.4	Reactivos.....	48
2.2.5	Medios de cultivo.....	48

2.2.6	Cepas utilizadas	49
2.3	Métodos.....	50
2.3.1	Determinación sensorial de la carne de pollo.....	50
2.3.2	Determinación química.....	50
2.3.2.1	Determinación de ácido sulfhídrico.....	50
2.3.2.2	Determinación del pH.....	51
2.3.3	Determinación microbiológica.....	52
2.3.3.1	Ensayos microbiológicos en pechuga de pollo.....	52
2.3.3.2	Aislamiento, identificación y conservación de la cepa empleada en el estudio.....	52
2.3.3.3	Aislamiento de proteolíticos.....	53
2.3.3.4	Conformación de banco de cepas.....	53
2.3.4	Screening de actividad antimicrobiana.....	53
2.3.5	Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	54
2.3.6	Determinación de la concentración mínima bactericida.....	56
2.3.7	Tiempo de muerte.....	57
2.3.8	Efecto inhibitorio de los aceites esenciales de orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>) y tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) estudio “ <i>in situ</i> ”	59
2.3.9	Efecto combinado.....	60
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
3.1	Análisis sensorial de la carne de pollo.....	61
3.2	Determinación química.....	63
3.2.1	Ensayo de ácido sulfhídrico.....	63
3.2.2	Determinación de pH.....	64
3.3	Determinación microbiológica.....	65
3.3.1	Obtención de microorganismos.....	65
3.3.2	Reactivación de cepa <i>Salmonella</i> spp.	66
3.3.3	Identificación de la cepa <i>Salmonella</i> spp.	66
3.3.4	Screening de actividad antimicrobiana.....	69
3.3.5	Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	73
3.3.6	Determinación de la concentración mínima bactericida.....	77
3.3.7	Tiempo de muerte.....	79
3.3.8	Efecto inhibitorio del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) “ <i>in situ</i> ”	86
3.3.9	Efecto combinado.....	90

CONCLUSIONES	92
RECOMENDACIONES	94
RESUMEN	95
SUMARY	96
BIBLIOGRAFÍA	97

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Evaluación de las características sensoriales de la pechuga de pollo.....	61
TABLA No. 2	Análisis sensoriales de la pechuga de pollo a utilizada para el análisis microbiológico.....	62
TABLA No. 3	Determinación de ácido sulfhídrico en pechuga de pollo.....	64
TABLA No. 4	Determinación de pH en pechuga de pollo.....	65
TABLA No. 5	Resultado de identificación de la <i>Salmonella</i> spp. en medios selectivos...	67
TABLA No. 6	Características morfológicas de <i>Salmonella</i> spp.....	68
TABLA No. 7	Screening de actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.) frente a <i>Salmonella</i> spp.....	69
TABLA No. 8	Screening de actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) frente a <i>Salmonella</i> spp.....	70
TABLA No. 9	Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	74
TABLA No. 10	Concentración mínima bactericida del aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.) frente a <i>Salmonella</i> spp.....	77
TABLA No. 11	Determinación de la turbidez en tubos a diferentes tiempos.....	78
TABLA No. 12	Resultados del tiempo de muerte de <i>Salmonella</i> spp. frente una concentración de 0.5 MIC (1.56 %) aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	80
TABLA No. 13	Resultados del tiempo de muerte de <i>Salmonella</i> spp. frente una concentración de 1 MIC (3.12 %) aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	82
TABLA No. 14	Resultados del tiempo de muerte de <i>Salmonella</i> spp. frente una concentración de 2 MIC (6.25 %) aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	83
TABLA No. 15	Resultados del tiempo de muerte de <i>Salmonella</i> spp. frente una concentración de 4 MIC (12.5 %) aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	85
TABLA No. 16	Tratamientos utilizados “ <i>in vivo</i> ” para la determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.) frente a <i>Salmonella</i> spp.	86
TABLA No. 17	Tratamientos utilizados “ <i>in vivo</i> ” para la determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.) frente a proteolíticos.....	88
TABLA No. 18	Efecto combinado de los aceites esenciales de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) y tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.) sobre <i>Salmonella</i> spp.....	90

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Composición química de <i>Origanum</i>	11
CUADRO No. 2	Composición nutritiva del pollo (por 100 g de porción comestible).....	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICA No. 1	Screening de actividad antimicrobiana del aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) frente a <i>Salmonella</i> spp.....	72
GRÁFICA No. 2	Screening de actividad antimicrobiana del aceite de orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>) frente a <i>Salmonella</i> spp.....	72
GRÁFICA No. 3	<i>Salmonella</i> spp. expuesta al aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) 0.5 MIC.....	81
GRÁFICA No. 4	<i>Salmonella</i> spp. expuesta al aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) 1 MIC.....	83
GRÁFICA No. 5	<i>Salmonella</i> spp. expuesta al aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) 2 MIC.....	84
GRÁFICA No. 6	<i>Salmonella</i> spp. expuesta al aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) 4 MIC.....	86
GRÁFICA No. 7	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) frente a <i>Salmonella</i> spp. en pechuga de pollo.....	87
GRÁFICA No. 8	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) frente a bacterias <i>Proteolíticas</i> en pechuga de pollo...	88

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Estructura química de los principales componentes del orégano...	9
FIGURA No. 2	Estructura química de los principales flavonoides del orégano....	10

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N° 1 Bacterias proteolítica..... 44

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Tabla para valoración de calidad con la escala de Karlsruhe.....	106
ANEXO No. 2	Carne y productos carnicos ensayo de ácido sulfhídrico NTE INEN 790.....	108
ANEXO No. 3	Carne y productos carnicos determinación de pH NTE INEN 783.....	112
ANEXO No. 4	<i>Salmonella</i> spp. en PCA.....	116
ANEXO No. 5	Siembra de bacterias proteolíticas en agar leche.....	116
ANEXO No. 6	Bacterias proteolíticas en caldo leche.....	116
ANEXO No. 7	Bacterias proteolíticas en agar leche.....	117
ANEXO No. 8	Banco de cepas de <i>Salmonella</i> spp. en agar soya tripticasa para conservación de la cepa.....	117
ANEXO No. 9	Actividad antimicrobiana del aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.).....	117
ANEXO No. 10	Actividad antimicrobiana del aceite de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.).....	118
ANEXO No. 11	<i>Salmonella</i> spp en agar Müller Hinton para conservación de la cepa	118
ANEXO No. 12	Morfología de <i>Salmonella</i> spp.....	118
ANEXO No. 13	Siembra de <i>Salmonella</i> spp. en agar Müller Hinton para realizar el screening.....	119
ANEXO No. 14	Determinación de la concentración mínima bactericida.....	119
ANEXO No. 15	Preparación del medio Müller Hinton.....	119
ANEXO No. 16	Purificación del aceite esencial de tomillo con sulfato de sodio hidratado.....	120
ANEXO No. 17	Purificación del aceite esencial de orégano con sulfato de sodio hidratado.....	120
ANEXO No. 18	Efecto inhibitorio del aceite esencial de tomillo.....	120
ANEXO No. 19	Muestras de pechuga de pollo cocinadas para análisis de tiempo de muerte.....	121
ANEXO No. 20	Ensayo de ácido sulfhídrico.....	121
ANEXO No. 21	Determinación de pH.....	121
ANEXO No. 22	Tiempo de muerte de <i>Salmonella</i> spp. por efecto del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.).....	122
ANEXO No. 23	Tiempo de muerte de bacteria proteolitica por efecto del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.).....	122
ANEXO No. 24	Efecto combinado de los aceites esenciales de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) y tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.) sobre <i>Salmonella</i> spp.....	122
ANEXO No. 25	Resultados de tratamientos utilizados “ <i>in vivo</i> ” para la determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.) frente a <i>Salmonella</i> spp.....	123
ANEXO No. 26	Resultado de tratamientos utilizados “ <i>in vivo</i> ” para la determinación	123

de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo
(*Thymus vulgaris L.*) frente a proteolíticos.....

INTRODUCCIÓN

Los bioconservadores son una parte esencial en los productos alimenticios (Ray, 2001) ya que extienden la vida de anaquel del producto, controlan las propiedades organolépticas de los alimentos y garantizan la salud del consumidor inhibiendo el crecimiento o aniquilando a microorganismos indeseables como saprofitos alterantes, mesófilos, psicrotrofos, *Pseudomonas*, *Entobacterias*, *Mohos*, *Levaduras*, *Coliformes*, *E. coli*, *Salmonella* y *Campylobacter spp.* (Robinson et al, 2000) (27) (70). Las hierbas y las especias han sido empleadas durante siglos para aumentar la vida útil de los alimentos. Diversos han sido los para demostrar la actividad antimicrobiana de este tipo de sustancias. Hoy en día, ha disminuido el consumo de los productos que contienen aditivos sintéticos, ya que la mercadotecnia ha generado una tendencia favorable hacia el consumo de productos con conservadores naturales o bioconservadores. En consecuencia, se requiere un nuevo conservador que sustituya a los sintéticos actuales, que su Ingesta Diaria Aceptada (IDA) no se rebase al consumirlo, que su espectro de inhibición sea adecuado para usarse en alimentos enlatados y que su uso sea económicamente factible (48). El tomillo y el orégano que se utilizan en la industria alimenticia como sazónadores y bioconservadores culinarios contienen aceites esenciales que se consideran de actividad inhibitoria fuerte. El reconocido principio aromático y de sabor de extractos vegetales de diferentes tipos de plantas ha motivado el uso de varios de ellos, principalmente como agentes saborizantes o sazónadores de alimentos y bebidas. En nuestro país actualmente no se realiza aplicación de bioconservadores en las industrias alimenticias pero en investigaciones en la Universidad Central del Ecuador en la Facultad se han aplicado bioconservadores en carnes envasadas, embutidos y en productos lácteos. En otros países ya se utiliza bioconservadores para la conservación de carnes y alargamiento de su vida de anaquel, además se sugiere la aplicación de bioconservadores en alimentos, plantas y medicamentos (54). Los Aceites Esenciales son

la alternativa de conservadores naturales que prometen competir con el amplio mercado de los agentes químicos o sintéticos que actualmente ofrecen productos económicos, de aplicación sencilla y amplio espectro, pero que están destinados a desaparecer porque son altamente tóxicos para el hombre y los animales, son bioacumulables, y después de un largo tiempo de aplicación son inactivos para muchos microorganismos patógenos. (47).

En consecuencia esta investigación plantea evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare L.*) y tomillo (*Thymus vulgaris L.*) y como un sistema sustituto de: conservadores químicos, empaque al vacío y atmósferas modificadas utilizadas por la tecnología para conservación de carnes en fresco.

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Microbiología de Alimentos y Bromatología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH utilizando técnicas sensoriales para determinar el color, textura, olor aplicando la Escala de Karlsruhe; técnicas químicas para determinar la presencia de ácido sulfhídrico y el pH de la carne y microbiológicas para aislar los microorganismos. Para determinar la actividad antimicrobiana se realizó ensayos de screening mediante difusión de discos, concentración inhibitoria mínima, concentración mínima bactericida, tiempo de muerte y efecto combinado de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare L.*) y tomillo (*Thymus vulgaris L.*). Los análisis se orientaron a estimar la factibilidad de emplear estos productos como potenciales bioconservadores en carne de pollo para aumentar el periodo de vida útil y, de esta manera beneficiar al sector comercializador, garantizar la salud y la economía de los consumidores y poner a disposición de la industria alimentaria un aditivo natural frente a la demanda de los consumidores de alimentos más frescos, menos procesados, de calidad e inocuidad.

CAPÍTULO I

1. PARTE TEÓRICA

1.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

1.1.1 GENERALIDADES

Un antimicrobiano es un agente que interrumpe una función microbiana presentando a la vez una toxicidad selectiva. Estos agentes (antibióticos) son producidos por microorganismos, tienen diferentes espectros de inhibición, muchos son efectivos solo contra una variedad limitada de patógenos mientras otros son de amplio espectro, es decir atacan diferentes clases de patógenos (45).

Algunos agentes se pueden usar contra más de un grupo. Entre los antimicrobianos, los agentes estáticos inhiben el crecimiento microbiano de modo reversible, o sea si el agente es removido, los microorganismos recuperarán de nuevo su crecimiento, en cambio los agentes cidas destruyen al microorganismo diana, su actividad depende de la concentración y el agente puede ser solamente estático a bajos niveles. El efecto de un agente también varía con la especie diana, un agente puede ser cida para unas especies y estático para otras (43).

Plantas con usos medicinales y culinarios han demostrado tener actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, las cuales han sido evaluadas mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. Las pruebas de actividad antibacteriana se han clasificado en métodos de difusión, de dilución y autobiográficos (1).

Investigadores han adaptado métodos experimentales para representar lo mejor posible futuras aplicaciones, sin embargo el ensayo puede ser afectado por múltiples factores tales como: el método para extraer el material de la planta, el volumen de inóculo, la fase de crecimiento, el medio de cultivo, el pH, el emulsificante, el tiempo y la temperatura de incubación (5).

Algunos datos de la efectividad de estos agentes pueden ser obtenidos a partir de la concentración inhibitoria mínima, (CIM), la concentración mínima bactericida (CMB) y el tiempo de muerte. La concentración inhibitoria mínima mide el desempeño antibacteriano del agente, a través de la más baja concentración de una droga que previene el crecimiento de un patógeno particular. La concentración mínima bactericida es la concentración más baja que mata al patógeno. Para determinar la rapidez de un efecto bactericida o la duración de un efecto bacteriostático se aplica el ensayo de tiempo de muerte (50).

1.1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Hoy en día existe una demanda significativa de los consumidores por los alimentos que son mínimamente procesados y libres de conservantes químicos de síntesis con la percepción de ser "natural" (Gaysinsky & Weiss, 2007; Zink, 1997). Como resultado, la industria alimentaria se enfrenta a grandes desafíos para producir alimentos naturales antimicrobianos y antioxidantes para reducir el uso de conservantes químicos sintéticos y

siguen produciendo alimentos seguros que son también considerados como saludables (39).

Los antimicrobianos se usan en los alimentos por dos razones principales: (1) para controlar los procesos naturales de deterioro (conservación de alimentos), y (2) para prevenir y controlar el crecimiento de microorganismos, incluidos los microorganismos patógenos, los antimicrobianos naturales son derivados de origen animal, vegetal y de origen microbiano. Existe un potencial considerable para la utilización de antimicrobianos naturales en los alimentos, especialmente en frutas y hortalizas frescas. Sin embargo, los métodos y mecanismos de acción, así como los efectos toxicológicos y sensoriales de los antimicrobianos naturales, no se conocen con exactitud (8).

1.1.3 MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha aprobado este método como una norma para el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (Turker y Usta, 2008). El método de difusión del disco es el método técnico más a menudo utilizado para las proyecciones a los antimicrobianos de los aceites esenciales y extractos (39).

1.1.3.1 Método de difusión en agar

La actividad antimicrobiana es generalmente evaluada por este método para los estudios preliminares. Un disco de papel empapado con igualdad de oportunidades se coloca en la superficie inoculada de una placa de agar y tras el crecimiento se mide la zona de inhibición microbiana.

1.2 ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

1.2.1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DEL ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Lamiales
Familia	: Lamiaceae
Subfamilia	: Nepetoideae
Género	: <i>Origanum</i>
Especie	: <i>vulgare</i>

El orégano, (*Origanum vulgare*), es una herbácea perenne aromática del género *Origanum*, muy utilizada en la cocina mediterránea. Las hojas de esta planta se utilizan como condimento tanto secas como frescas, aunque secas poseen mucho más sabor y aroma (68).

Morfología de la planta de orégano: La planta forma un pequeño arbusto achaparrado de unos 45 cm. de alto, los tallos, que a menudo adquieren una tonalidad rojiza, se ramifican en la parte superior y tienden a deshojarse en las partes más inferiores. Las hojas surgen opuestas, ovales y anchas de entre 2-5 cm, con bordes enteros o ligeramente dentados y con vellosidad en el envés. Las diminutas flores, de color blanco o rosa, que nacen en apretadas inflorescencias terminales muy ramificadas están protegidas por diminutas hojillas de color rojizo (68).

Toda la planta posee unas pequeñas glándulas donde está contenida la esencia aromática, de color amarillo limón, compuesto por un estearopteno y dos tipos de fenoles, como mayoritario el carvacrol y en menor proporción el timol. Las raíces contienen estaquiosa y los tallos sustancias tánicas (69).

Varias especies del género *Origanum* son nativas de la zona mediterránea y todas ellas son tratadas como especia. La influencia del clima, la estación y el suelo afectan en mayor medida la composición del aceite esencial que contienen las diferentes especies (69).

Una especie estrechamente emparentada es la mejorana procedente de Asia Menor, que sin embargo, difiere significativamente en sabor debido a que su aceite esencial carece de compuestos fenólicos. Algunos cruces poseen un sabor intermedio entre el orégano y la mejorana (mejorana dorada = orégano dorado) (69).

1.2.2 HÁBITAT Y CARACTERÍSTICAS DEL ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

La planta de orégano crece en pastizales, matorrales, pedregales, orlas de encinares, en zonas secas y soleadas, generalmente en calizas localizándose cerca de donde se acumulan sustancias nitrogenadas. Desde el nivel del mar a los 800 m. Es una planta característica de comunidades de clase Trifolio-Geranietea sanguinei, herbácea y viváceas, de alta cobertura, que son las orlas naturales, más o menos heliófilas de los bosques climáticos y sus correspondientes mantos preforestales o espinosos (70).

Se caracteriza por ser una planta perenne de la familia de las labiadas de hasta 80cm. tallos erectos, pilosos y aromáticos, hojas ovales, pecioladas, dentadas o enteras, flores rosadas, vioáceas o blancas de hasta 7 mm; reunidas en inflorescencias redondeadas terminales. Estambres sobresalientes. En herbazales secos y a lado de los bosques (71).

1.2.3 PROPIEDADES MEDICINALES DEL ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

- El orégano es utilizado para trastornos digestivos por ejemplo dispepsia de origen nervioso, flatulencia, espasmos o cólicos de los órganos digestivos. Por su acción carminativa es un buen condimento para legumbres, potajes y pizzas.
- Afecciones respiratorias que cursan tos seca o irritativa, como la laringitis. El orégano tiene también acción expectorante y antitusígena, tanto como en uso interno y como externo.
- Dolores musculares, tortícolis y lumbago, aplicando externamente tanto en cataplasma como en fricciones sobre la piel (40).

1.2.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. En *O. vulgare* se han encontrado ácidos coumérico, ferúlico, caféico, r - hidroxibenzóico y vainillínico. Los ácidos ferúlico, caféico, r - hidroxibenzóico y vainillínico están presentes en *O. onites*. Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, b -cariofileno, r -cimeno, canfor, linalol, a -pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo. En extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens* se han encontrado siete iridoides minoritarios conocidos como loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-

logánico y carioptosido; y tres iridooides mayoritarios como el ácido carioptosídico y sus derivados 6'-O-p-coumaroil y 6'-O-cafeoil. También contiene flavonoides como naringenina y pinocembrina, lapachenol e icterogenina. Las Figuras 1 y 2 presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano (34).

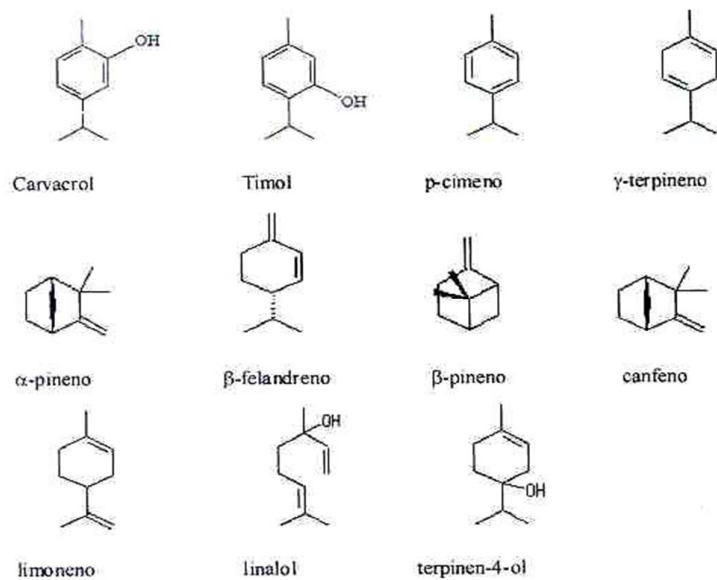


FIGURA N° 1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL ORÉGANO

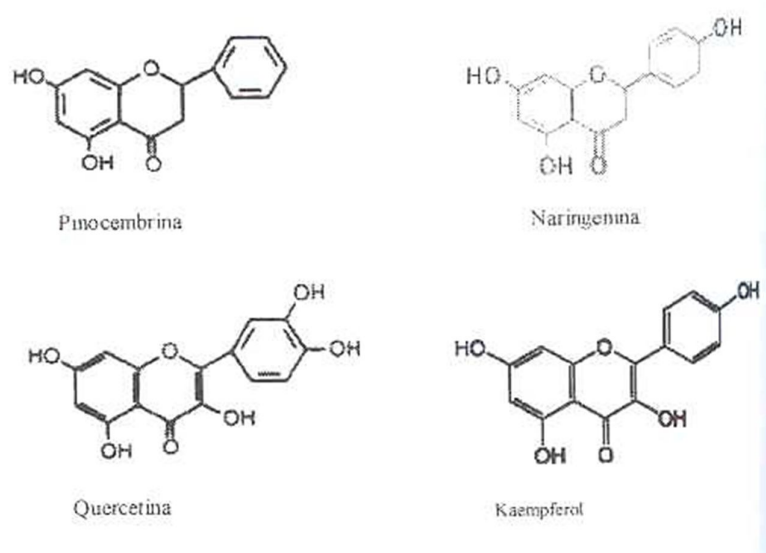


FIGURA N° 2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES FLAVONOIDES EN ORÉGANO

Los monoterpénoides, compuestos volátiles con olores intensamente pungentes, son los responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor de muchas plantas. Estructural y biológicamente son muy diferentes, llegándose a clasificárseles hasta en 35 grupos. Los principales quimiotipos de la especie *O. vulgare* son el carvacrol y el timol cada una con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis (34).

La subespecie *O. vulgare* ssp. *Hirtum* es la más estudiada, especialmente en relación a la composición y calidad de su aceite esencial, ya que este último tiene un importante valor comercial. En esta subespecie el rendimiento del aceite esencial en la hoja seca varía entre 2% y 6%. Este porcentaje se ve afectado por la altitud del lugar de cultivo, y por la época de recolección, siendo este más bajo en el otoño (34).

Los compuestos mayoritarios encontrados en *O. vulgare* ssp. *Hirtum* son el carvacrol, timol, r -cimeno y g -terpineno, aunque en diversos estudios realizados por cromatografía

de gases/espectrometría de masas se han identificado de 16 a 56 compuestos diferentes. Estos componentes también se han encontrado en *O. dictamnus* y se sabe que otras especies como *O. scabrum* y *O. microphyllum* contienen alrededor de 28 y 41 compuestos diferentes, respectivamente. Los investigadores cubanos caracterizaron tres especies de orégano y concluyeron que se recomendaba la producción de *Lippia micromera*. El cuadro N° 1 presenta algunos de los compuestos principales en cada tipo de orégano. En el aceite del orégano que crece en forma silvestre se ha encontrado la presencia dominante de carvacrol y timol. Se ha observado que un incremento en los porcentajes de timol provoca un decremento en el contenido de carvacrol. De igual manera, los hidrocarburos monoterpénicos α -terpineno y γ -cimeno están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores a las de los dos fenoles (41).

CUADRO N° 1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *Origanum*

Nombre Científico	Principales componentes	Referencias
<i>O. vulgare</i>	Ácido o -cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido r -hidroxibenzoico, ácido vainillínico, ácido rosmarínico. Mirceno, α -terpineno r -cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol, β -cariofileno	5, 6, 15, 16, 53
<i>O. dictamnus</i>	r -cimeno, timoquinona, carvacrol	25
<i>O. onites</i>	Ácido ferúlico, ácido cafeico, r -hidroxibenzoico ácido vainillínico	16
<i>O. glandulosum</i>	r -cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol	99

En el aceite del orégano silvestre cultivado en hidroponía y adicionado de fósforo se han identificado 46 componentes. En este caso, los principales compuestos fueron el carvacrol (29%-73%) y el p -cimeno (11%-42%). Al mismo tiempo se observó un incremento en el porcentaje de p -cimeno y un decremento de carvacrol cuando se comparó con el aceite de plantas enriquecidas con nitrógeno (41).

1.3 ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

El aceite de orégano es el primer antiséptico natural y tiene amplio poder microbicida, el orégano no tiene la tendencia conocida para el desarrollo de la resistencia. El aceite de Orégano puede matar o puede bloquear el crecimiento de virtualmente cualquier hongo, así como también inhibe el crecimiento de la mayoría de bacterias. El aceite de orégano, carvacol y timol son los más activos y estos trabajan juntos con efecto sinérgico para potenciar las propiedades antisépticas (12).

El aceite de orégano es quizás el más poderoso agente anti-fungal herbal conocido. Su eficacia es aumentada por su seguridad, desde que es enteramente no tóxico. Esto es de importancia crucial con infecciones de hongos tales como la Candidiasis, donde dosis grandes pueden ser necesarias para establecer la curación. La resistencia fungal al orégano es muy rara. De hecho, el orégano es un agente anti-fungal tan poderoso que es capaz de destruir hongos que han sido mutados en el laboratorio como resistentes y formas resistentes de hongos que resultan de la terapia antibiótica. El aceite de Orégano es un poderoso calmante del dolor, es también un poderoso antioxidante. Además, el aceite mejora la digestión estimulando el flujo de bilis (33).

1.3.1 USO TERAPÉUTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

La planta de orégano *Origanum vulgare*, posee muchos usos medicinales y aplicaciones curativas, los cuales están dados por las propiedades medicinales que presenta. A su vez éstas están dadas por sus componentes del orégano, los cuales pueden ser aprovechados de mejor manera, al extraer los aceites esenciales (3).

El consumo de los aceites esenciales del orégano facilita la eliminación de los gases acumulados en el tubo digestivo. Debido a esto es muy recomendado para aquellas personas que presenten meteorismo y flatulencia (3).

Se recomienda consumir los aceites esenciales del orégano a las personas que tengan problemas de estreñimiento, digestión lenta y problemas digestivos en general, ya que debido a sus propiedades medicinales favorece la función biliar mejorando la digestión. Debido a lo anterior se recomienda ingerir posterior a las comidas (3).

La tos excesiva producto de resfriados o catarros, así como también los problemas bronquiales pueden tratarse mediante el consumo de los aceites esenciales del orégano (3).

El orégano posee muchas sustancias dentro de su composición (como los flavonoides) que favorecen la circulación sanguínea. Debido a esto es muy recomendable su consumo para prevenir problemas cardíacos y la aparición de trombos. Además ayuda a aliviar dolores de cabeza ocurridos por una mala circulación sanguínea (3).

Los aceites esenciales del orégano están muy recomendados para aquellas mujeres que sufren de fuertes dolores durante la menstruación, ya que debido a sus propiedades medicinales el consumo de estos aceites alivian dichos dolores (3).

1.3.2 TOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

El orégano no posee efectos tóxicos si se consume en su estado natural en dosis adecuadas y durante un tiempo prudente. Sin embargo, los aceites esenciales de la planta de orégano pueden ser catalogados como tóxicos, ya que al ser ingeridos en dosis elevadas puede ocasionar efectos narcóticos, evidenciados en síntomas como sueño excesivo (somnolencia) o adormecimiento de ciertas partes del cuerpo (77).

No se recomienda la ingesta de los aceites esenciales del orégano en mujeres que se encuentran embarazadas, ya que sus componentes podrían ocasionar problemas durante este periodo, incluso puede provocar abortos (77).

Debido a que no existe evidencia que asevere que el consumo de los aceites esenciales del orégano no resultan ser perjudiciales para los lactantes, no se recomienda su consumo a las mujeres que se encuentren durante la etapa de lactancia (77).

Los aceites esenciales del orégano pueden ocasionar un aumento de los síntomas en personas que presenten gastritis, colon irritable o úlceras, por lo cual no se recomienda su consumo a personas que padezcan de estas enfermedades (77).

1.3.3 EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

El aceite esencial de orégano tiene propiedades antibacterianas ya que puede ayudar en la prevención de las infecciones bacterianas, incluyendo infecciones del tracto urinario,

infecciones de la piel e incluso la intoxicación por alimentos. Un estudio reciente sobre las cualidades antibacterianas de varios aceites esenciales que se encuentran en los aceites de orégano y tomillo mostraron los mayores niveles de actividad antibacteriana (46).

Un estudio hecho en 6 semanas en individuos con parásitos con suplementación de 600 mg. diarios de aceite de orégano, llevo a cabo la completa desaparición de los organismos nocivos. También puede protegernos contra una amplia variedad de infiltración parásitos diferentes, tanto dentro del cuerpo, así como el entorno físico. Esto incluye los gusanos redondos, gusanos planos chinchas, piojos, pulgas y mosquitos (46).

1.3 TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)

1.4.1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)

Reino	: Plantae
División	: Spermatophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Lamiales
Familia	: Lamiaceae
Género	: <i>Thymus</i>
Especie	: <i>T. vulgaris</i>
Nombre binomial	: <i>Thymus vulgaris</i> L. (33).

1.4.2 HÁBITAT Y CARACTERÍSTICAS DEL TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)

Thymus vulgaris es una planta aromática, vivaz (que vive más de dos años), leñosa, muy polimorfa, de 10 a 40 cm. de altura, alcanzando el medio metro en zonas protegidas. Posee numerosas ramas, leñosas, compactas, de color parduzco o blanco aterciopelado (73).

Las hojas son lineares, entre 4 y 8 mm., oblongas, sentadas o brevemente pediceladas, opuestas, sin cilios, con el peciolo o sus márgenes revueltos hacia abajo y blanquecinas por su revés (73).

Las flores son rosadas y blancas, axilares y agrupadas en la extremidad de las ramas, forman una especie de capítulo terminal, a menudo, con inflorescencia interrumpida. Las brácteas son verde grisáceas. Los cálices se presentan algo gibosos, tres dientes en el labio superior, cortos y casi iguales, y dos en el inferior, siendo estos muy agudos, de mayor longitud, con pelos en sus bordes y de color rojizo. Las corolas son algo más largas que los cálices, con el labio superior erguido y el inferior trilobulado (73)

El fruto es un tetraquenio, lampiño, de color marrón. Florece a partir de marzo. La parte útil de la planta son las hojas y sumidades florecidas (56).

Como especies más utilizadas y con mayores posibilidades para su futuro cultivo, especialmente en el sureste español, destacan: *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* spp. *Gracilis*, *Thymus baeticus*, *Thymus hiemalis*, *Thymus mastichina* y *Thymbra capitata*. *Thymus vulgaris* es una especie muy variable, tanto en su fenología como en la

composición química de su aceite esencial, habiendo sido detectados siete quimiotipos (56).

El hábitat natural del tomillo se encuentra en países de la cuenca mediterránea occidental, especialmente sobre suelos soleados y secos. Predomina en el este, centro y sur de la Península Ibérica, así como en Baleares. Sobre suelos calizos, arcillosos y menos frecuentemente en los silíceos (56).

Puede encontrarse en una altitud entre 0 y 2.000 m. Sus especies perviven bajo temperaturas muy variadas e incluso extremas. Crece en climas templados, templado-cálidos y de montaña. Resiste bien las heladas y sequías, pero no el encharcamiento ni el exceso de humedad ambiente. Aunque se adapta bien a los suelos ricos en aluvión y calcáreos, se adapta a los arcillosos, ligeros y silíceos. Prefiere la exposición a mediodía. Normalmente, se disponen en forma de matorral bajo en zonas de sol directo e intenso, que soportan gracias a la impregnación oleosa de sus hojas (56).

El tomillo se resiente si se manipulan excesivamente sus raíces, por eso es necesario que al realizar el trasplante se coja toda la tierra del tiesto y se introduzca en el hoyo hecho en el suelo. Su componente más importante es su esencia, que en el tomillo varía en gran manera por la proporción en que la produce la planta, según su propia naturaleza, el país en que se cría, la altitud a que medra, la época de recolección, la planta llega a dar el 3% de esencia en estado seco (23).

1.4.3 PROPIEDADES MEDICINALES DE TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*)

- El aceite esencial de tomillo contiene compuestos tales como timol, carvacrol, borneol, linaol, cimeno, pineno, dipenteno y acetato de bornila), un principio amargo, tanino y materias resinosas y pépticas el tomillo actúa como digestivo, antiséptico, vermífugo, y como estimulante sedativo en las crisis de tos (9).
- La esencia tiene un poder antiséptico superior del fenol al del agua oxigenada en la actualidad está bien comprobada la acción bactericida de la esencia de tomillo sobre los bacilos tífico, diftérico, tuberculoso (bacilo de Koch), y sobre los meningococos (causantes de la meningitis), los neumococos y los estafilococos. Su acción antiséptica se localiza sobre el aparato digestivo, el respiratorio y el genitourinario, y especialmente sobre las mucosas de la boca y garganta, así como las de los órganos genitales. Su acción antimicrobiana se ve potenciada por la capacidad que tiene para estimular el fenómeno de la leucocitosis (aumento de los glóbulos blancos en la sangre). Tal como se ha podido demostrar experimentalmente. Al contrario que los antibióticos los cuales deprimen el sistema inmunitario (defensas), el tomillo lo estimula, favoreciendo la actividad de los leucocitos (glóbulos blancos). El uso del tomillo se halla pues indicado en todas las enfermedades infecciosas, en especial las de origen bacteriano que afecta a los órganos digestivos, respiratorios y genitourinarios.
- En el sistema nervioso actúa como tonificante general del organismo estimula las facultades intelectuales y la agilidad mental.
- Antiespasmódico, eupéptico, carminativo abre el apetito, favorece la digestión y combate las putrefacciones intestinales por desequilibrios en la microbiota del colon. Indicado en gastroenteritis y colitis provocadas por bacterias del genero *Salmonella* responsables de numerosas infecciones por alimentos en mal estado, especialmente durante el verano.
- También se emplea como vermífugo, para afecciones bucales y faríngeas, como expectorante, antitusígeno y balsámico y por sus propiedades diuréticas y antisépticas, resulta indicando en las infecciones urinarias (40).

1.4.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*)

En su composición química destacan el aceite esencial y los flavonoides. El aceite esencial (1,0-2,5%) está constituido principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p-cimeno, gammaterpineno, limoneno, borneol y linalol. No obstante, se ha de tener en cuenta que la composición del aceite esencial es variable según la época y lugar de la cosecha, además de la bien conocida existencia de diferentes quimiotipos, tanto de *T. vulgaris* como de *T. zygis*. Por este motivo, la Farmacopea Francesa exige que la esencia tenga un mínimo del 30% de fenoles totales. Entre ellos, los principales son el timol y el carvacrol, cimol, Vitamina B₁, Vitamina C, taninos, Manganeso, saponinas, triterpenoides, flavonoides (derivados de apigenol y luteolol), ácidos fenoles (ácido cafeico, rosmarínico), alcoholes (borneol, linalol) Terpenos (terpineno, cimeno) (58).

También contiene flavonoides, como luteolina, apigenina, naringenina, eriodictol, cirsilineol, salvigenina, cirsimaritina, timonina y timusina, entre otros (74).

Otros componentes también destacables son los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (ácidos cafeico y rosmarínico), triterpenos (ácidos ursólico y oleanólico), saponinas, taninos y un principio amargo (serpilina) (74).

1.5 ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*)

El aceite esencial de tomillo se extrae mediante un proceso de destilación de las partes aéreas de la planta. El componente principal del aceite esencial de tomillo es el timol, que tiene propiedades medicinales sobresalientes. El timol es una sustancia muy potente y puede llegar a ser peligroso para la salud si no lo utilizamos correctamente (49).

Estos aceites esenciales son usados en sesiones de aromaterapia para recuperar la vitalidad, suprimir la ansiedad y para darle tonicidad a los músculos. Además despide un agradable aroma si lo usamos en un difusor o un hornillo para perfumar el ambiente, y al mismo tiempo, estaremos aprovechando las múltiples propiedades medicinales del tomillo en aromaterapia (49).

El aceite de tomillo puede ser un muy buen remedio natural expectorante, estimulante del sistema respiratorio, antiviral, antiséptico, antibacterial y como tónico energizante natural. Para esto podemos mezclar unas pocas gotas no más de 4 o 5 gotas en una taza de infusión de eucaliptos, menta, té verde u otras infusiones según el efecto buscado (49).

1.5.1 USO TERAPÉUTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO

Tiene un efecto antihelmíntico, antimicrobiano, antioxidante, antiputrescente, antirreumático, antiséptico (intestinal, pulmonar genitourinario), antiespasmódico, antitusígeno, antitóxico, astringente, diurético, afrodisíaco, bactericida, tónico nervioso, balsámico, revulsivo, carminativo, cicatrizante, emenagogo, rubefaciente, parasiticida, estimulante del sistema inmunitario y de la circulación, vermífugo (50).

Piel: cortes, contusiones, quemaduras, abscesos, acné, dermatitis, sarna, piojos, picaduras de insectos, piel grasa, infecciones de las encías.

Aparato respiratorio: bronquitis, laringitis, sinusitis, amigdalitis, catarro, tos, asma.

Circulación, músculos y articulaciones: artritis, reumatismo, dolor muscular, torceduras, lesiones deportivas, celulitis, gota, obesidad, mala circulación, edema.

Aparato digestivo: dispepsia, flatulencia, diarrea,

Sistema inmunitario: enfermedades infecciosas.

Sistema nervioso: insomnio, debilidad nerviosa, enfermedades por estrés, dolor de cabeza (50).

1.5.2 TOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO

La planta de tomillo es en general muy segura de consumir, en especial si se ingieren preparados naturales en base a esta planta y se consume en dosis adecuadas. Sin embargo, los aceites esenciales de tomillo pueden provocar efectos tóxicos en las personas que lo consumen (76).

No se recomienda el consumo, mediante aplicación oral, de los aceites esenciales del tomillo, conocido científicamente como *Thymus vulgaris*, a las mujeres que se encuentren embarazadas o en la etapa de lactancia (76).

Esto se debe a que no se conoce en detalle, los efectos que podría provocar el tomillo en estas situaciones. Debido a los componentes de esta planta, se especula, que podría provocar reacciones abortivas (76).

El consumo, en dosis elevadas, de los aceites esenciales de esta planta podría ocasionar algún tipo de intoxicación, la cual se caracterizaría por fuertes dolores estomacales y de cabeza, mareos, diarreas y vómitos (76).

El tomillo puede provocar reacciones alérgicas en las personas que son hipersensibles a esta planta, por lo tanto no se recomienda su ingesta a aquellas personas que son alérgicas a las plantas de la familia de las labiadas (76).

1.5.3 EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO

El aceite esencial de Tomillo, fundamentalmente por sus componentes fenólicos, timol y carvacrol, tiene una actividad antibacteriana tanto frente a gérmenes grampositivos como gramnegativos. Este efecto es debido a su acción sobre la membrana bacteriana. La eliminación de timol y carvacrol por vía respiratoria produce una actividad antiséptica respiratoria. Por su actividad antibacteriana, el tomillo tiene interés también como antiséptico urinario y de la cavidad bucofaringea, así como para el lavado de heridas. Además, el timol y el carvacrol tienen una acción antimicótica, efectiva frente a *Candida albicans* (75).

Por otra parte, el extracto acuoso de Tomillo, inhibe de forma significativa, *in vitro*, el crecimiento de *Helicobacter pylori* y su potente actividad ureasa (75).

Posee propiedades antisépticas utilizadas para tratar las infecciones pulmonares. Es espasmolítico y calma la tos espasmódica. Actúa además sobre la rinorrea, disminuyendo las secreciones nasales (75).

También es eficaz en el alivio de los problemas intestinales como vientre hinchado y aerofagia, para lo que resulta ideal asociarlo al carbón vegetal. Su acción antiséptica se ejerce igualmente sobre el sistema digestivo y especialmente sobre los casos de diarrea. Tiene también virtudes estimulantes y antivíricas y como tal puede utilizarse para prevenir las recidivas del herpes zóster (75).

1.6 CONSERVANTES NATURALES

Las especias y aceites esenciales desde la antigüedad ya eran utilizados para embalsamar cadáveres y evitar la putrefacción, por la presencia de fenoles, flavonoides, que retrasan la autoxidación de las grasas (21) (37).

Actualmente, el creciente interés de los consumidores por la seguridad y calidad de los alimentos que ingieren, las nuevas tendencias revelan una clara preferencia de la industria alimentaria hacia los conservantes naturales, como es el caso de antioxidantes procedentes de extractos de plantas. Así, el mercado de los antioxidantes sintéticos está en declive mientras que los antioxidantes naturales ganan importancia debido a la aceptación de los consumidores y a los requerimientos legales para acceder al mercado (65).

Ciertas especias inhiben el crecimiento de microorganismos. En general son más efectivos frente a organismos grampositivos que frente a bacterias gramnegativas. En estos productos se han determinado: gran poder conservante (canela, clavo de olor, mostaza). Inhibición débil de una gran variedad de microorganismos (*Micrococcus pyogenes*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* *Penecillum notatum*) (37).

Los aceites esenciales de los cítricos (naranja, limón) son inhibidores del desarrollo de *Aspergillus flavus*, eliminando la producción de aflatoxina. Los extractos de ajo y cebolla inhiben el desarrollo de levaduras y son también antibacterianos. Los cereales, rábanos, plátano, berza contienen también sustancias antimicrobianas (17) (64).

Las sustancias antimicrobianas de numerosas especias son los principios de los aceites esenciales, que son mezclas de diferentes productos volátiles, con frecuencia afines, entre los que se encuentran los hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, esteres fenólicos y ácidos (66).

Los marinados también son otra forma de conservar alimentos, están compuestos por líquidos y elementos aromatizantes que tienen por objeto eliminar los fuertes sabores que pudieran tener los distintos tipos de carne. Además de aromatizarlas se consigue ablandarlas y prolongar su conservación al formar en la preparación una película externa que aísla los microorganismos (54).

1.7 ACEITES ESENCIALES

1.7.1 GENERALIDADES

Según la 8ª. Edición de la farmacopea francesa del año 1965, los aceites esenciales son “productos de composición general muy complejas que contienen los principios volátiles que se encuentran en los vegetales más o menos modificados durante su preparación” (71).

Los aceites esenciales no se encuentran prácticamente más que en vegetales superiores. Se calcula que existen aproximadamente unas 17.500 especies aromáticas, son productos químicos que forman las esencias odoríferas de un gran número de vegetales, se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. (70).

Los aceites esenciales o esencias vegetales son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas. Por lo general se obtienen por arrastre de vapor. Las propiedades físico químicas de los aceites esenciales son muy diversas, puesto que el grupo engloba sustancias muy heterogéneas, de las que en la esencia de una planta, prácticamente puede encontrarse solo uno o más compuestos. El rendimiento de esencia obtenido de una planta varía de unas cuantas milésimas por ciento del peso vegetal hasta 1-3%. La composición de una esencia puede cambiar con la época de la recolección, el lugar geográfico (18).

Son mezclas complejas de fragancias y aromas o sustancias aromáticas originadas en plantas. Muchas de estas sustancias son utilizadas totalmente, otras una parte y otras un solo componente, dependiendo de su actividad. A los aceites esenciales se les denomina también quinta esencia; se los puede clasificar de acuerdo al uso industria, medicinal: sea como aroma y fragancia en cosmética, saborizante y bactericida en alimentos, antisépticos y medicinales (18).

1.7.2 LOCALIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Generalmente, la síntesis y acumulación de los aceites esenciales se asocia a la presencia de estructuras histológicas especializadas, a menudo localizadas sobre o en la proximidad de la superficie de la planta (71).

Los aceites esenciales se pueden aislar de diferentes partes de la planta:

- En las hojas (ajenjo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.)

- En las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.).
- En el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.).
- En las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.).
- En el tallo (canela, caparrapí, etc.).
- En las flores (árnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.).
- En los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.).

Los aceites esenciales son volátiles, arrastrables por vapor de agua o gas supercrítico y a ello se debe su aroma. Los aceites esenciales están presentes en glándulas, pelos glandulares o disueltos en las resinas. Son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, generalmente son líquidos, pero en algunos casos se solidifica una parte por enfriamiento. Ello se aprovecha para separar los componentes sólidos que conforman la parte conocida como estereopteno (alcanfor) de los aceites, olcopteno (33).

Las aplicaciones de los aceites esenciales son muy variadas, sea en perfumería especialmente los terpenos oxigenados tienen olor agradable, mientras mayor cantidad de compuestos oxigenados tenga es más valorada una esencia. Como saborizantes de alimentos como son los aceites de anís, de menta (33).

En medicina son muy utilizadas como carminativas y saporíferas las esencias de anís, clavo, canela, la esencia de clavo de olor es muy utilizada como analgésico dental y como precursor de vainillina. Los monoterpenos sirven a las plantas entre otras cosas, para inhibir la germinación de otras especies y así evitar la competencia especialmente de agua, si esta es escasa (33).

1.7.3 FUNCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

En general, la función biológica de los terpenoides de los aceites esenciales sigue estando poco clara. Sin embargo, es probable que tengan un papel ecológico. Apoya esta hipótesis el haber establecido experimentalmente el papel de algunos de ellos, tanto en el campo de las interacciones vegetales (agentes alelopáticos, especialmente inhibidores de la germinación) como en las interacciones vegetal-animal: protección contra los depredadores (insectos y hongos) y atracción de polinizadores (6).

1.7.4 Clasificación de los aceites esenciales

1.7.4.1 Por su consistencia

Esencias fluidas : Son líquidos volátiles a temperatura ambiente.

Bálsamos : Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos: el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc (38).

Oleorresinas : Tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (48).

1.7.4.2 Por su origen

Aceites Naturales: Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Estos aceites esenciales son los llamados Aceites esenciales de aromaterapia (48).

En Aromaterapia o la Aromacología sólo se deben de utilizar aceites esenciales naturales, puros y completos, que no hayan sufrido ningún tipo de agregado natural o sintético y que no hayan sufrido ningún proceso de rectificación etc. El concepto básico de la Aromaterapia es que el aceite esencial no debe tener ninguna transformación para mantener las características químicas que tiene el vegetal (48).

Aceites Artificiales: Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes (48).

Aceites Sintéticos: Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química (48).

1.7.5 CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

La calidad se ha convertido en algo cada vez más importante para toda actividad productiva; la competencia de los mercados, y la globalización de la economía hacen

imperativo que los productos sean de alta calidad y los costos se controlen en cada etapa del proceso (12).

Concretamente y desde el punto de vista productivo, la calidad de los aceites esenciales implica la valoración de las necesidades del cliente desde el estudio del mercado y su traducción en un diseño y en producto que satisfaga las necesidades en cuanto a funcionalidad, precio, vida y servicio de agentes naturales que han centrado recientemente en la ampliación de la vida útil de los alimentos, para reducir o eliminar las bacterias patógenas, y aumentar la calidad global de sus productos (12).

1.7.6 TOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

Por regla general, los aceites esenciales por vía oral poseen una toxicidad débil o muy débil: la mayoría de los que se utilizan frecuentemente tienen una DL50 comprendida entre 2 y 5 g/Kg (anís, eucalipto, clavo, canela etc.), o lo que es más frecuente, superior a 5 g/Kg (manzanilla, lavanda, etc.), similar caso se da con los componentes de los aceites esenciales. Son raros aquellos que tienen una DL50 inferior a 2 g/Kg (6).

1.8 CARNE DE POLLO

Dentro del reino animal las aves ocupan un gran papel dentro de la incorporación de proteínas por parte del hombre, desde tiempos remotos la humanidad se ha valido de ellas para su alimentación, ya sea a través de su carne o de sus huevos (71).

1.8.1 COMPOSICIÓN DE LA CARNE DE POLLO

La composición de la carne de pollo es particularmente favorable para el hombre. Se trata de un alimento de gran valor como fuente de proteínas. Por su proporción relativamente escasa de sustancias colágena, es muy digerible y de ahí su utilidad como alimento de enfermos y convalecientes. La carne de pollo es además estimulante del apetito y de la digestión por su elevado contenido en sustancias básicas, entre ellas, la creatina. La creatinina y la anserina (N- metilcarnosina). Entre los diversos compuestos nitrogenados, los principios biológicamente más importantes de esta carne son las proteínas. Según Grau (1969); en su composición participan los 21 aminoácidos. La proporción de los llamados esenciales sirve de índice para establecer el valor biológico de las proteínas animales y vegetales. Por lo tanto. La carne de ave, con un valor bilógico de 90, es superada únicamente por la leche y los huevos (24).

1.8.2 PROPIEDADES NUTRITIVAS DE LA CARNE DE POLLO

Dependiendo de la composición de las distintas piezas cárnicas, existen diferencias nutricionales. La pechuga sin piel es la menos grasa, con menos del 1% en peso, y la parte del animal con menos colesterol. Los muslos tienen menos proteínas que la pechuga y el triple de grasa, así como las vísceras, con cinco veces más de grasa. El hígado tiene nueve veces más contenido de colesterol que la pechuga. Se pueden apreciar variaciones en la composición de la carne, en función de la edad del animal sacrificado. En relación con las carnes rojas la carne de pollo tiene un aporte proteico similar. En vitaminas, destaca la presencia de ácido fólico y vitamina B₃ o niacina. Entre los minerales, el nivel de hierro y de zinc es menor que en el caso de la carne roja, aunque supone una fuente más importante de fosforo y potasio. El valor nutritivo de la menudencia de pollo es muy alto, especialmente en proteínas y lípidos similares al de la carne roja, aunque destaca su aporte en minerales y vitaminas, principalmente vitamina

B₁₂, A, vitamina C y ácido fólico. Cada 100 g de carne de pollo aportan unas 130 calorías (25). (VER CUADRO N° 2)

1.8.3 PROTEÍNAS Y GRASAS BUENAS DE LA CARNE DE POLLO

La carne de pollo contiene proteínas de alta calidad (aminoácidos esenciales de alta digestibilidad), y además aporta poca carga calórica. De hecho, el pollo está considerado como carne magra porque contiene menos de un 10% de grasa en su composición. Su contenido en ácidos grasos monoinsaturados (AGM) o 'grasas buenas', es mayor que el de ácidos grasos saturados (AGS) o 'grasas malas', por lo que resulta muy recomendable como parte integrante de una dieta saludable. Las distintas partes de éste ave aportan diferentes cantidades de nutrientes. Así, la pechuga de pollo es la parte del ave que contiene una menor proporción de ácidos grasos saturados y de colesterol, pero una mayor cantidad de proteínas, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. Si conservamos la piel de pollo a la hora de consumirlo, aumenta el contenido de calórico, proteico y lipídico, así como el nivel de colesterol, por lo que se recomiendan eliminarla previamente a su ingesta (62).

CUADRO N° 2 COMPOSICIÓN NUTRITIVA DEL POLLO (por 100 g de porción comestible)

Alimento	Agua (mL)	Energía (Kcal)	Proteína (g)	Grasas (g)	Cinc (mg)	Sodio (mg)	Vit. B1 (mg)
Pollo con piel	70,3	167,0	20,0	9,7	1,0	64,0	0,10
Pollo en filetes	75,4	112,0	21,8	2,8	0,7	81,0	0,10
Alimento	Vit. B2 (mg)	Niacina (mg)	AGS (g)	AGM (g)	AGP (g)	Colesterol (mg)	
Pollo con piel	0,15	10,4	3,2	4,4	1,5	110,0	
Pollo en filetes	0,15	14,0	0,9	1,3	0,4	69,0	

AGS= grasas saturadas / AGM= grasas monoinsaturadas / AGP= grasas poliinsaturadas. (26).

1.8.4 MINERALES PRESENTES EN LA CARNE DE POLLO

El pollo es además una buena fuente de fósforo, también. El fósforo es uno de los minerales más presentes en nuestros tejidos, por lo que es importante ingerirlo en mayor proporción que otros nutrientes. Forma parte de todas las membranas celulares, sobre todo en los tejidos cerebrales, y participa en el mantenimiento de huesos y dientes (61).

1.8.5 VITAMINAS PRESENTES EN LA CARNE DE POLLO

Aporta vitamina B₆ o piridoxina, que ayuda a mantener la función normal de nuestro cerebro, y participa en la formación de glóbulos rojos. Su consumo nos reporta además ácido fólico, cuya ingesta regular antes y durante la gestación (sobre todo durante el primer trimestre), contribuye a prevenir defectos de nacimiento en el cerebro y la médula espinal denominados defectos del tubo neural. Además, el ácido fólico se relaciona con la formación de glóbulos rojos, que cuando se encuentran en baja proporción en sangre, se asocian con un aumento del riesgo cardiovascular. Tampoco es despreciable su contenido de la antioxidante vitamina E, en comparación con otros tipos de carne (61).

1.8.6 VENTAJAS E INCOVENIENTES DEL CONSUMO DE CARNE DE POLLO

La carne de pollo es muy fácil de digerir, más incluso que la de pavo. Además, por su versatilidad en el modo de cocinado, es un alimento muy adecuado en dietas de control de peso, siempre y cuando se elijan las piezas del animal más magras como la pechuga, se elimine la piel y se prepare a la plancha o al horno, técnicas culinarias que exigen poco aceite (29).

Puesto que los menudillos de pollo contienen gran cantidad de colesterol, este aspecto ha de ser tenido en cuenta en caso de padecer hipercolesterolemia o enfermedades cardiovasculares (29).

La carne de pollo es una de las más bajas en purinas, así que limitando la cantidad a 80 - 100 g por ración, puede formar parte de la dieta de personas con hiperuricemia (ácido úrico elevado) (29).

1.8.7 CONTAMINACIÓN, CONSERVACIÓN Y ALTERACIÓN DE LA CARNE DE POLLO

La carne de pollo es un producto muy alterable por lo que deben manejarse con especial cuidado durante todas las operaciones de procesado. La alteración se inicia pronto, después de la sangría, como resultado de acciones microbianas, químicas y físicas. Si no se frenasen pronto estas acciones se convertiría la carne en un producto no apto para el consumo. Es necesario minimizar su deterioro para prolongar el tiempo durante el que la carne mantiene un nivel de calidad aceptable (20).

El no aplicar las medidas de control de calidad, durante cualquier operación de procesado, aumenta generalmente la velocidad y la extensión de los cambios alterativos que llevan al deterioro y finalmente a la putrefacción de la carne (20).

1.8.7.1 Contaminación de la carne de pollo

Las fuentes de contaminación para la carne de aves es la piel de estos animales, cuando están vivos, pueden contener un promedio de 1.500 bacterias por centímetro cuadrado. Probablemente, estas cifras corresponden a la microbiota natural de la piel, más otros microorganismos procedentes de las patas, plumas y heces. La contaminación de la piel y de las paredes de la cavidad abdominal tiene lugar durante las fases de lavado, desplumado y evisceración (21).

La cantidad de bacterias en la superficie externa de los pollos varía consideradamente. Sin embargo, esta variación es más acusada entre cada una de las aves que entre las diferentes zonas de las mismas. Las claves de microorganismos aislados dependerán de donde se hayan recogido las muestras y de la fase o etapa de procesado. En aves y productos derivados se han encontrado miembros de los siguientes géneros:

Enterobacter, Alcaligenes, Escherichia, Bacillus, Flavobacterium, Micrococcus, Paracolobactrum, Proteus, Pseudomonas, Staphylococcus, Corynebacterium y *Salmonella*. Los menudillos como mollejas, corazones e hígado se preparan separadamente, pudiendo diferir la carga y tipos de microorganismos, se han recibido una considerable atención la incidencia de Salmonelas ya que se encuentra una incidencia del 0 y el 20% (21).

1.8.7.2 Conservación de la carne de pollo

Como el sacrificio de los mamíferos para la producción de carne, el método de matanza y sangría de las aves tiene un efecto importante en la calidad del producto. Los métodos modernos implican el corte de la vena yugular, estando el ave suspendida de sus patas para facilitar la sangría (51).

Se dice que el corte es externo cuando la tráquea se deja intacta, mientras que el corte denominado kosher o semita secciona la tráquea. Cuando se escaldan las aves el agua puede pasar por aspiración al saco aéreo. Al parecer el corte kosher determina que la inhalación del agua de escaldado sea mínima, ya que la sección final de la tráquea hace que esta se retraiga bajo la piel. El método de desplumado influye también en la capacidad de conservación del ave. Las desplumadas en seco son más resistentes a la descomposición que las escaldadas o semiescaldadas, ya que la piel queda menos lesionada, aunque es mayor la cantidad de cañones en la piel. La mayoría de las aves se despluman por semiescaldado, que consiste en sumergir las aves en agua a unos 55°C durante 2 minutos. La experiencia demuestra que el agua utilizada para el semiescaldado no es una fuente importante de contaminación siempre que se tomen las debidas precauciones en relación con el cambio de agua. El escaldado de las aves con vapor es más efectivo que con agua caliente para reducir la cantidad de bacterias, con inclusión de coliformes y salmonelas (21).

1.8.7.3 Alteración de la carne de pollo

Aunque las enzimas contribuyen a la alteración de las aves terminadas, la causa fundamental de la misma son las bacterias, principalmente las procedentes del tubo digestivo. El número limitado de trabajos acerca de la alteración de las aves indica que la mayor parte del crecimiento bacteriano tiene lugar sobre las superficies, como son la piel, las paredes de la cavidad abdominal y las superficies de corte, difundiendo los productos de descomposición lentamente hacia la carne (68).

1.8.8 DETERIORO DE LA CARNE DE POLLO

Los estudios sobre la microbiota bacteriana de carnes frescas de ave, han demostrado la intervención de diversos microorganismos pero se considera que las carnes se alteran a bajas temperaturas y el causante de esto son los organismos que pertenecen al género de las *Pseudomonas*. Las principales razones por las cuales el deterioro de las aves está sobre todo limitado a las superficies son las siguientes: las partes internas de los tejidos generalmente son estériles o contienen relativamente pocos organismos, que no suelen crecer a bajas temperaturas en consecuencia, la microbiota productora de la alteración queda reducida a las superficies y piel, a donde llega a través del agua o del proceso de elaboración o manipulación. Las superficies de las aves frescas y almacenadas en un ambiente muy húmedo son muy susceptibles al crecimiento de bacterias aerobias, como son las *Pseudomonadáceas*. Estos organismos crecen bien en las superficies donde forman colonias muy pequeñas que posteriormente confluyen para producir el limo característico de la carne de ave alterada. Cuando las carnes de ave sufren deterioro, los malos olores se perciben antes que la presencia de limosidad, investigaciones recientes sobre los orígenes específicos de los malos olores asociados con la alteración de la carne de pollo han demostrado que *Ps. Putrefaciens* es uno de los microorganismos más importantes, se sospecha la existencia de una selección de especies que originan un potente mal olor a partir de la variada microbiota que se halla en el pollo fresco (68).

1.9 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Es el síndrome originado por la ingesta de alimentos o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población. Las alergias por hipersensibilidad individual a ciertos alimentos no se consideran ETA (22).

Entre los agentes de estas enfermedades se cuentan: bacterias o toxinas bacterianas, micotoxinas, virus, rickettsia, protozoos, helmintos o sustancias tóxicas de origen distinto al microbiano (22).

Las ETAS se clasifican en intoxicaciones e infecciones: Las intoxicaciones alimentarias son las producidas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental, o intencional desde su producción hasta su consumo (15).

Las infecciones alimentarias son las producidas por la ingesta de alimentos y agua contaminada con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, que en la luz intestinal puedan multiplicarse o lisarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros aparatos o sistemas (15).

La vigilancia epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas a través de los Alimentos es un sistema de información oportuna y continua de ciertas afecciones que se adquiere con el consumo de alimentos o agua, que incluye la investigación de los factores determinantes y que permite formular un diagnóstico de la situación. Sobre esta base se logran establecer estrategias de acción para su control y prevención. Los alimentos son el

probable vector de numerosos peligros biológicos, químicos y físicos y sin duda de varios problemas nutricionales (15).

El posible incremento de las enfermedades microbianas transmitidas por alimentos puede deberse a los factores siguientes:

- La plasticidad genética de los microorganismos y su adaptabilidad a los cambios ambientales.
- La evolución de la susceptibilidad del huésped a las infecciones, en la que influyen en particular la edad y la inmunodepresión, unida al aumento de la proporción de subpoblaciones susceptibles como resultado del cambio demográfico en las poblaciones. Esta situación se agrava con la malnutrición que, a nivel mundial, es tal vez la principal causa del aumento de la susceptibilidad del huésped a las infecciones transmitidas por alimentos.
- Los cambios en las prácticas agrícolas, la zootecnia y los sistemas de elaboración y distribución de alimentos, así como en las modalidades de consumo o en las conductas relacionadas con los alimentos.
- El aumento espectacular del comercio internacional de alimentos, que ha tenido como resultado la propagación de microorganismos patógenos fuera de las fronteras de los distintos países (15).

Por lo que respecta a los peligros tanto microbiológicos como químicos, los factores tecnológicos pueden influir unos en otros de dos formas:

- En el mundo desarrollado, los elaboradores de alimentos están estudiando nuevas técnicas de elaboración y conservación. A pesar de sus ventajas, las nuevas tecnologías pueden llevar también consigo nuevos riesgos, especialmente cuando no se han evaluado suficientemente los efectos complejos de las nuevas mejoras tecnológicas en poblaciones microbiológicas complejas o en la composición de los alimentos.
- En los países en desarrollo, en concreto, puede que la infraestructura básica o el conocimiento tecnológico básico de los procesos utilizados en la recolección, así

como antes y después de ésta, sea insuficiente o inexistente. Este es un motivo de preocupación habitual en los países pobres, que tiene como resultado dificultades para asegurar o mantener la inocuidad de los productos alimenticios, así como pérdidas de alimentos, inseguridad alimentaria o restricciones al comercio (68).

- La actitud de los consumidores está evolucionando, siendo cada vez mayor la inaceptabilidad social de los riesgos relacionados con los alimentos, al menos en los países desarrollados. Conforme aumenta la inocuidad objetiva de los alimentos, los riesgos restantes y ocasionales tienden a provocar una indignación desproporcionada con el incidente y son aún menos tolerados por el público en general. Se han hecho en todo el mundo llamamientos en favor de la democratización de las decisiones relativas a la inocuidad de los alimentos, con la expectativa de aumentar la "participación de los interesados", la "apertura" y la "transparencia" (68).

La actitud de los consumidores guarda también relación con la disponibilidad de alimentos sanos y nutritivos y el acceso a ellos. Las preocupaciones relacionadas con la prevención de enfermedades crónicas, como las cardiopatías y el cáncer en edades avanzadas y sus efectos sobre la calidad de vida y el envejecimiento, están aumentando en el mundo desarrollado paralelamente a la inocuidad de los alimentos. Las exigencias de los consumidores han aumentado la sensibilización con respecto al contenido de nutrientes de la alimentación y cuestiones relativas al suministro de información adecuada y fiable y al etiquetado nutricional de los alimentos elaborados. Se trata de cuestiones importantes que tal vez haya que abordar de forma adecuada cuando se promueven una alimentación sana y nutritiva entre unos consumidores cada vez más sensibles y más dispuestos a hacer oír su opinión sobre las cuestiones relacionadas con la alimentación y la nutrición (68).

1.10 *Salmonella*

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, integrada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: son fermentadores de la glucosa, catalasa positivo, oxidasa negativo y suelen ser móviles; representa una excepción *Salmonella gallinarum*, siempre inmóvil (32).

Las Salmonellas son gérmenes patógenas que crece, entre otros, en los intestinos de los animales pueden transmitirse al hombre a través de aves o carnes de res de abastos y provocar graves diarreas (salmonelosis). Sobre todo las aves (incluido el pollo) están contaminadas con frecuencia por *Salmonella*, porque los métodos moderados de cría intensiva de los animales y el tipo de algunos matadores industriales potencia la propagación de las mismas (25).

La nomenclatura de *Salmonella* es compleja. Se han usado diferentes sistemas para referir a este género. Teniendo en cuenta que estas bacterias tienen una muy importante homología general de su ADN, deberían ser caracterizadas como dos únicas especies.(35)(43) Esta propuesta, formulada por Le Minor y Popoff en la década de los ochenta, no ha sido completamente aceptada. No obstante, y teniendo en cuenta la necesidad de uniformizar la comunicación entre los distintos actores (médicos, veterinarios, químicos, etc.), la mayoría ha optado por seguir una antigua propuesta de Kaufmann, con las más recientes modificaciones (formuladas desde el Centro de Referencia colaborador de la OMS, en el Instituto Pasteur); así, se divide el género en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, diferenciables entre sí por características metabólicas tales como la hidrólisis del ONPG, el crecimiento en presencia de KCN y otras. *Salmonella enterica* se subdivide, a su vez, en seis subespecies: *enterica*(I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houenae*(IV), e *indica* (VI) que corresponden a los antiguos subgéneros. Estas subespecies son diferenciables bioquímicamente (60) (2). Como todas las enterobacterias, el género *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y de envoltura, para

Salmonella (Vi). Los antígenos somáticos son termoestables y su especificidad radica en el componente polisacárido de la endotoxina, complejo proteína- lipopolisacárido. Los antígenos O se clasifican en mayores y menores; los mayores son los que definen un grupo antigénico. Así, el factor antigénico O:4 caracteriza el antiguo grupo B, hoy llamado O:4, mientras que los antígenos menores tienen menor valor discriminativo. Por ejemplo, el antígeno O:12 lo presenta toda *Salmonella* perteneciente a los grupos A, B y D. Pueden encontrarse otros antígenos menores generados por modificaciones químicas o por conversiones fágicas (60).

Los antígenos capsulares o de envoltura sólo lo presentan algunos serotipos de *Salmonella* (Typhi y Dublin). Los antígenos flagelares son proteicos y termolábiles. Algunos serovars sólo producen un único tipo de antígeno H, siendo, en consecuencia, monofásicos. Sin embargo otros serotipos pueden producir alternativamente dos tipos de antígenos H, por lo que se denominan bifásicos (2).

Mediante el uso de reacciones antígeno anticuerpo se determina la fórmula antigénica de una cepa y, a partir de dicha fórmula, se la clasifica en serovar o serotipo siguiendo el esquema propuesto originalmente por Kauffman y White (que agrupa todas las serovariedades conocidas, mas de dos mil quinientas) (2).

Salmonella presenta diferencias en cuanto a la especificidad del hospedero; mientras algunos serovars no tienen una estricta adaptación a un huésped, siendo capaces de producir enfermedades con diversas características en distintas especies animales y en el hombre, otros serovars sí son específicos, como *S. gallinarum* para las aves o *S. typhi* en el caso del hombre (2).

Las Salmonellosis humanas pueden clasificarse en dos grandes grupos: por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos, que causan habitualmente síndromes

tifoídicos con presencia de bacterias en la sangre, y las debidas a serotipos ubicuos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre. La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas (2).

La contaminación de los alimentos con este microorganismo es muy común pues los seres humanos, aves de corral, gatos y cerdos pueden ser portadores asintomáticos de la bacteria, aunque los principales implicados en esta infección son las aves, los huevos y los roedores (Sofos, 1994) (2).

Entre los principales factores implicados en esta infección alimentaria se cuentan el consumo de carnes crudas, la recontaminación de alimentos cocidos dados por la manipulación inadecuada, las malas prácticas de aseo y desinfección de los manipuladores, los tratamientos deficientes a alimentos que contengan huevos o carne contaminada (66).

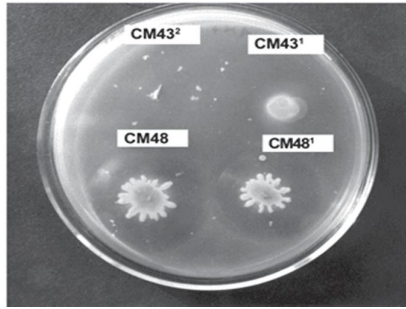
Los alimentos de origen cárnico a través de los cuales se puede transmitir esta infección son principalmente los que contengan carne de pollo, también carnes frescas de cerdo, bovino, pescado y demás alimentos marinos, y los productos cárnicos como empanadas de carne, picadillos, carnes curadas y sandwiches (Sofos, 1994) (66).

Las salmonelas, bacterias gramnegativas, no se diferencian esencialmente en su morfología y capacidad tintorial de los colis y otras bacterias. Son formaciones cortas, rechonchas, con aspecto de bastoncillo, muchas veces también ovaladas, de 2-4 μm de longitud por unos 0,5 μm de anchura. No forman esporos y, como consecuencia de sus 8-12 flagelos peritricos, están dotadas de vivo movimiento. Sin embargo los flagelos pueden desaparecer de forma transitoria o permanente, de forma que la inmovilidad no basta para excluir a un germen del grupo de las salmonellas. Una importante característica diferenciativa referente a la forma de crecimiento es la formación de reborde mucoso es diferentes tipos de salmonellas en el borde de las colonias (10).

Cualquier miembro del género *Salmonella* representa cierto grado de peligro para la salud humana. Algunas, como *S.gallinarum* y *S. pullorum*, son de menor importancia para el hombre; otras son un peligro grave, de forma notable *S. typhi*. El número y la incidencia de estos microorganismos puede y deben ser bajos. Los alimentos que representan un peligro de enfermedad mínimo se analiza para detectar *Salmonella* solo cuando hay una causa especial de interés (30).

1.11 Bacterias *Proteolíticas*

Las Bacterias *Proteolíticas* (Fotografía No 6) constituyen un grupo heterogéneo de bacterias fuertemente proteolíticas que forman proteinasas (enzimas que digieren las proteínas) extracelulares, así llamadas porque se difunden fuera de las células. Todas las bacterias poseen proteinasas intracelulares, pero sólo unas cuantas las tienen en forma que puedan ser difundidas extracelularmente. Las Bacterias proteolíticas pueden dividirse en aerobias o facultativas, que pueden ser esporógenas o no y anaerobias productoras de esporas. *Bacillus cereus* es un germen aerobio esporulado proteolítico; *Pseudomonas fluorescens*, es aerobio o facultativo y no produce esporas y *Clostridium sporogenes* anaerobio y esporulado. Muchas especies de *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Proteus* son proteolíticas. Ciertas bacterias llamadas ácido proteolíticas determinan a la vez una fermentación ácida y una proteólisis. Como ejemplos pueden citarse *Streptococcus faecalis*, *Liquefaciens* y *Micrococcus caseolyticus*. Algunas bacterias son putrefactivas, es decir, descomponen las proteínas anaeróbicamente, produciendo compuestos malolientes tales como ácido sulfúrico, mercaptanos, aminas, indol, y ácidos grasos. La mayor parte de las especies proteolíticas de *Clostridium* son putrefactivas, lo mismo que algunas especies de *Proteus*, *Pseudomonas* y otros géneros que no producen esporas (14).



Fotografía No 1: Bacterias Proteolíticas en agar leche mostrando el halo de inhibición de la caseína.

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en:

- Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.
- Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.
- Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIAL VEGETAL Y CÁRNICO

Se utilizó 100 mL de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*) y 100 mL de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris L.*), las plantas fueron adquiridas en Jambi kiwa ubicada en Yaruquies en el cantón Riobamba, la extracción de los aceites esenciales fueron por el método de arrastre de vapor utilizando un alambique esto se realizó en el salinerito ubicado en Salinas de Guaranda los aceites esenciales se concentraron por adición de sulfato de sodio hidratado lo que permitió la separación de los aceites de la

solución acuosa y 4 kilos de pechuga de pollo, la muestra tomada de pechuga de pollo fueron adquiridas en los diferentes mercados de la ciudad de Riobamba como fueron San Alfonso, La Merced y La Condamine y seleccionadas de acuerdo a los siguientes parámetros: 1) no presentar restos de plumas ni canutos, 2) la piel brillante y cubrir todo el pollo sin presentar desgarros ni faltantes, 3) su color blanco o amarillo pero siempre uniforme sin presentar zonas manchadas por sangre o golpes, 4) no presentar hematomas, ni tener los huesos rotos, 5) las puntas de las alas no oscurecidas, ni presentar ninguna pegajosidad debajo de ellas, 6) olor característico, 7) limpia y fresca. Las pechugas seleccionadas fueron trasladadas en fundas ziploc a los Laboratorios de Alimentos y Microbiología para realizar los correspondientes análisis de frescura.

2.2.2 EQUIPOS

- Balanza semi analítica
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro
- Refrigeradora
- Desecador
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Microscopio
- Incubadora
- Cabina extractora de gases
- Equipo de destilación Kjeldhal
- Estufa
- Mufla
- Balanza de precisión
- Molino
- Equipo de micro destilación
- Baño maría
- Refractómetro

2.2.3 MATERIALES

- Bureta de 50 mL
- Pinza para bureta
- Pinza de discos
- Probetas de 50 y 100 mL
- Cajas petri
- Cajas millipore
- Gradilla
- Soporte universal
- Corchos
- Parafil
- Guantes
- Mascarilla
- Mechero
- Gasa
- Cámara fotográfica
- Papel filtro
- Reverbero
- Matraz de 250 mL y 500 mL
- Algodón
- Termómetro
- Tijeras
- Regla
- Isopos
- Tubos de ensayo
- Computadora
- Espátula
- Papel de empaque
- Masquil

- Asa de platino
- Vaso de precipitación
- Findas ziploc
- Mortero
- Varilla
- Porta objeto
- Cubre objeto
- Papel aluminio
- Esparadrapo
- Cuchillos

2.2.4 REACTIVOS

- Sulfúrico Ácido (J. T. Baker 9681-05)
- Sodio Hidróxido (MERK 1.064998.1000)
- Agua destilada
- Desinfectante
- Alcohol
- Suero fisiológico al 80%
- Aceite de orégano y tomillo a diferentes concentraciones como 10.000, 5.000, 2.500 y 1.250
- Glicerol (Mallinckrodt 5092)
- Tween 80 al 10% (MERK 8.2350)
- Estreptomicina
- Sulfato de amonio
- Extracto de levadura
- Agua de peptona

2.2.5 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar PCA (DIFCO 247940)

- Agar TSA (BBL 211043)
- Agar leche para proteolíticos
- Caldo TSB (Bacto 211825)
- Caldo leche para proteolíticos
- Agar Muller Hinton (DIFCO 225250)
- Caldo Muller Hinton (DIFCO 275730)
- Agar – Agar (Sharlau 07- 004)
- Tryptone (Acumedia 7351A)
- Agar XLD
- Agar Urea
- Agar LIA
- Agar TSI
- Agar Hecktoen
- Agar Mac Conkey
- Agar Sulfito Bismuto
- Agar verde brillante
- Aar cetrimida (MERCK 1.25284)

2.2.6 Cepas utilizadas

- *Salmonella* spp.
- Bacterias proteolíticas

2.3 MÉTODOS

2.3.1 DETERMINACIÓN SENSORIAL DE LA CARNE DE POLLO

- Preparación de la muestra

Luego de la obtención de las muestras de pechuga de pollo, se cortó en pedazos de 5 x 5 cm. y se colocó en papel aluminio para ser codificada y colocada a las temperaturas correspondientes como: ambiente, refrigeración y congelación.

Para la evaluación de las características sensoriales de la pechuga de pollo se tomaron las muestras a diferentes temperaturas: 21 °C (ambiente) y 0 días almacenadas, 4 °C (refrigeración) y 0 días, a 0 °C (congelación) y 0 días. Los análisis se realizaron el mismo día a diferentes tiempos para evitar alteraciones en el control.

El análisis sensorial de la pechuga de pollo investigada se realizó a través de los sentidos de la vista, olfato y tacto. Para este ensayo se utilizó la Escala de Karlsruhe. Ver Anexo N°1

2.3.4 DETERMINACIÓN QUÍMICA

2.3.4.1 Ensayo de ácido sulfhídrico

Los vapores del ácido sulfhídrico al reaccionar con el acetato de plomo dan una coloración negra. Se emplearon muestras duplicadas. Para este ensayo se utilizó la NTE INEN 790. Ver Anexo N°2

- La muestra 5 g finamente preparada y pesada se colocó en un matraz de 50 mL.
- Se adicionó 10 mL de H₂SO₄ al 10%.
- En la boca del matraz se colocó un tapón de algodón cubierto con papel filtro humedecido previamente en solución de acetato de plomo al 10%. Se dejó en un lugar oscuro durante 24 horas.
- Pasado ese tiempo se observó si el tapón fue manchado y de color negro.

2.3.4.2 Determinación de pH

La medición del pH se basa en la comparación del potencial hidrógeno de la solución problema con el de un electrodo de referencia, cuyo potencial depende en cada caso de la concentración de hidrogeniones que posee la solución en la que se sumerge. La muestras fueron por duplicado. Para este ensayo se utilizó la NTE INEN 783. Ver Anexo N°3

- Si la muestra corresponde a productos densos o heterogéneos, homogeneizarla con ayuda de una pequeña cantidad de agua (recientemente hervida y enfriada) con agitación.
- Se colocó en el vaso de precipitación aproximadamente 5g la muestra preparada, se adicionó 50 mL de agua destilada y agitó suavemente.
- Si existen partículas en suspensión, dejar en reposo el recipiente para que el líquido se decante.
- Se determinó el pH introduciendo los electrodos del potenciómetro, en el vaso de precipitación con la muestra, cuidando que estos no toquen las paredes del recipiente, ni las partículas sólidas.

2.3.5 DETERMINACIÓN MICROBIOLÓGICA

2.3.5.1 Ensayos microbiológicos en pechuga de pollo

2.3.5.2 Aislamiento, identificación y conservación de las cepas empleadas en el estudio

Las cepas utilizadas en el estudio (*Salmonella* spp. y bacterias proteolíticas) se aislaron a partir de carne fresca de pechuga de pollo recolectada y tomada en los mercados de la ciudad de Riobamba (San Alfonso, La Merced y La Condamine). Los microorganismos se identificaron por las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas en medios selectivos y por las respuestas positivas a pruebas metabólicas específicas.

Identificación de *Salmonella* spp.

Para la identificación de *Salmonella* spp. se emplearon medios de cultivo selectivos: XLD, Agar Sulfito Bismuto, Agar Mac Conkey, Agar Entérico de Hecktoen, Agar Verde Brillante.

Para la identificación además se realizó Tinción Gram y Prueba de la Oxidasa a partir del crecimiento en tubos de TSA. De las colonias típicas crecidas en medios selectivos se tomó el inóculo y se estirió en placas con PCA para obtener colonias aisladas para realizar pruebas bioquímicas en: TSI, Urea y LIA. (VER ANEXO N°4)

2.3.5.3 Aislamiento de proteolíticos

0.1mL de cada una de las diluciones del homogeneizado, se inocularon y extendieron en placas de agar leche, se incubaron a $30 \pm 2^\circ$ C durante 3 días.

Para la preparación del Agar Leche: Se pesó 10 g de leche en polvo; 0.5 g de extracto de levadura; 0.5 g de sulfato de amonio; 0.5 g de cloruro de calcio; 0.1 g de fosfato monobásico de potasio; 0.1 de fosfato dibásico de potasio; 15 g de Agar – Agar todo esto es para un litro de agua destilada.

Las colonias desarrolladas en agar leche que mostraron un halo de crecimiento a su alrededor se caracterizan como típicas bacterias proteolíticas. (VER ANEXO 5,6 y 7)

2.3.5.4 Conformación del banco de cepas

Las colonias que crecieron en cada uno de los agares selectivos correspondientes para cada bacteria, fueron conservados en tubos previamente sellados y codificados de agar TSA (BBL 211043) inclinados para ser guardados en refrigeración y de esta manera evitar la contaminación de las bacterias. (VER ANEXO 8)

2.3.4 SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Método de difusión de disco.

Una suspensión microbiana de 10^8 células/mL se diseminó en placas de Agar Müller Hinton, discos de papel filtro de 6 mm de diámetro se impregnaron con 20 μ L de aceite de tomillo y orégano por separado en cuatro concentraciones (10000, 5.000, 2.500 ppm) de aceite puro y Tween 80 al 10% y se colocaron en las placas de agar inoculadas, las placas permanecieron a 4°C por 2 h antes de ser incubadas a $37 \pm 2^\circ$ C por 24 horas. El diámetro de la zona de inhibición se midió en mm. La prueba se realizó por duplicado y se repitió en tres ensayos independientes, como control positivo se usó Streptomicina B (10 μ g/mL) (45) (VER ANEXO 9 y 10).

2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

Preparación de la serie de tubos

Se emplearon 13 tubos de 13 x 100 mm para este ensayo. Doce tubos contenían diluciones del antimicrobiano en una escala apropiada de concentración total, se usaron controles de crecimiento y de esterilidad.

Los tubos del 1 al 11 contenían diluciones del aceite, el tubo 12 fue el control de crecimiento (caldo Müller Hinton + microorganismo sin antimicrobiano), el tubo 13 el control de esterilidad (solo caldo Müller Hinton).

Se dispensó 1 mL de caldo Müller Hinton en los tubos 2 al 13 y 1.8 mL en el tubo 1 al que se adicionaron 200 μ L de la solución total del antimicrobiano, se mezcló con vortex.

- Preparación del inóculo

Se transfirieron 3 a 5 colonias (de similar morfología y purificadas a partir de los medios selectivos) a 5 mL de caldo Müller Hinton para obtener una suspensión equivalente al estándar de turbidez 0.5 McFarland, se transfirió 0.1 mL de la suspensión estandarizada a 5 mL de caldo Müller Hinton, se mezcló en vortex. por 15 a 20 segundos, se incubó a 35

$\pm 2^{\circ}$ C hasta turbidez visible pero no densa (determinar experimentalmente el tiempo de incubación).

Se ajustó la turbidez de la suspensión con NaCl al 0.85% hasta alcanzar la turbidez del estándar 0.5 MacFarland (aprox 1.5×10^8).

Se adicionó 0.3 mL de la suspensión estandarizada a 9.7 mL de caldo Müller Hinton (dilución 1:32) para obtener recuentos de 4 a 5×10^6 UFC/mL. El inóculo se uso en los 15 minutos siguientes de la preparación.

- **Inoculación e incubación**

Los tubos seriados conteniendo el aceite antimicrobiano se inocularón con 100 uL de la suspensión microbiana conteniendo 5×10^6 UFC/mL. Se mezcló 6 a 10 veces, se tomaron 100 uL para obtener una concentración final del microorganismo 5×10^5 UFC/mL. De esta solución estandarizada se pasó a un tubo con 9 mL de caldo Müller Hinton y se diluyeron sucesivamente otros 3 tubos más con 9mL de caldo Müller Hinton tomando 1mL. En otro tubo estéril se tomó 200 μ L de solución más 800 μ L de caldo Müller Hinton, se inoculó 100 μ L en una placa de agar se debería contar aproximadamente 100 UFC.

Los tubos seriados 1:2 se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}$ C por 20 horas, se mezclaron manualmente, se incubaron 4 horas adicionales.

- **Lectura de la Concentración Inhibitoria Mínima**

Se examinó el tubo 12 (control de crecimiento), se evaluó de la siguiente manera:

- $\pm 1+$: muy ligera niebla en el tubo; 2+ ligera niebla; 3+ a 4+, turbidez densa o crecimiento globular fino o precipitado denso con niebla en el sobrenadante.
- Se examinó el tubo 13 (solo caldo). Observando si hay crecimiento cuéctico
- Se examinó la placa para verificar el inóculo: se contaron las colonias crecidas, se multiplicó este número por el recíproco de la alícuota sembrada y por el factor de dilución. El resultado debería estar entre 75 a 150 UFC, si no están en este rango se debe repetir todo el ensayo de CIM.
- Se examinó los tubos del 1 al 11 buscando evidencia de crecimiento y se compararon con los tubos controles.
- Se determinó la CIM (concentración más baja del antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del microorganismo. (31) (Ver Tabla No 9)

2.3.6 Determinación de la concentración mínima bactericida

- **Preparación e incubación de cultivos**

A partir de los tubos seriados 1:2 con antimicrobiano se tomaron los tubos de crecimiento visible, de estos se tomaron y diseminaron inóculos de 10 μL y de 100 μL se incubó a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 24 horas para *Salmonella spp.*

- **Lectura de la Concentración Inhibitoria Mínima**

Se tomó en cuenta la densidad microbiana (UFC) del inóculo inicial para el ensayo de CIM, el punto final de la CIM será la concentración del antimicrobiano para que el inóculo inicial se reduzca en un 99.9%.

La CMB se define como la concentración más baja demostrando destrucción de la población en 99.9% o más. (30)

2.3.7 Tiempo de muerte

Este ensayo se utilizó para determinar la actividad antimicrobiana del aceite de tomillo y orégano dependiendo de la concentración y dependiendo del tiempo.

Un inóculo estandarizado se adicionó al caldo conteniendo varias concentraciones del antimicrobiano y a un caldo control de crecimiento (sin antimicrobiano), Se anotaron los viables al tiempo inicial de inoculación y a varios tiempos los resultados se graficaron versus tiempo (31).

Para aplicar este ensayo se debió conocer la CIM preferiblemente por el método de macrodilución, a partir de este valor se determinaron otras concentraciones del antimicrobiano, generalmente 2 veces la CIM y 4 veces la CIM, se determinó la tasa de crecimiento del microorganismo a 0, 4, 8, 24 horas luego de la inoculación (31).

- **Concentraciones a ensayar:**

CIM (mg/mL), 2 x CIM, 4 x CIM en tubos con 900 uL. de caldo Müller Hinton

Tiempos: 0, 4, 8, 24, 48 horas

Diluciones a sembrar: 10^{-1} a 10^{-8}

Concentración del antimicrobiano: A partir de la solución total 100%, luego se realizaron otras diluciones de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.097

mg/mL. Sabiendo que la CIM es 1.56 %, se emplearon también: 0.5 CIM, 1 CIM, 2 CIM y 4 CIM.

Se tomaron de 3 a 5 colonias se inocularon 5 mL de caldo Müller Hinton para obtener una suspensión de turbidez igual al estándar 0.5 MF, 0.1 mL de esta suspensión se pasó a 5 mL de CMH se agitó con vortex de 15 a 20 segundos, se incubó a 35 ± 2 °C turbidez visible, debería corresponder a la mitad de la fase logarítmica, se monitoreó el crecimiento en el caldo por 2 a 3 horas, tomando alícuotas del caldo cada 30 minutos y enumerando las UFC, se determinó el tiempo necesario para la incubación.

Se ajustó la suspensión con NaCl al 0.85% para alcanzar la turbidez del estándar 1 MF (3×10^8 UFC/mL), se diluyó esta suspensión mezclando 1 mL de la suspensión con 4 mL de caldo y se obtuvo aproximadamente 6×10^7 UFC/mL

- **Inoculación e incubación**

Se adicionó 0.1 mL del inóculo conteniendo 6×10^7 UFC/mL a cada tubo con 10 mL de CMH, excepto al control de esterilidad, la concentración final del microorganismo en cada tubo fue 6×10^5 UFC/mL, se tomó 0.1 mL del tubo y se sembró en placas de AMH para recuento de viables, se incubó a 35 ± 2 °C, al siguiente tiempo: 4 horas se repitió el ensayo, se mezcló con vortex, se removió 0.1 mL de alícuota (dentro de 5 a 10 minutos), se incubó y se repitió en los demás tiempos.

- **Lectura de resultados**

A las 24 horas se inspeccionaron visualmente los tubos y se anotó la CMI para el ensayo de tiempo de muerte, también se hicieron recuentos para todos los tubos incluyendo el control.

Se determinó la densidad del inóculo inicial al tiempo cero para confirmar que la densidad microbiana fue la apropiada: aproximadamente 6×10^5 UFC/mL.

Se realizó los recuentos y se convirtió las UFC/mL a log 10. Se graficó las UFC/mL (y) versus tiempo (x). Se determinó cual concentración resultará en una baja en 3 log 10 respecto al control de crecimiento. Se determinó el tiempo requerido para obtener disminución. Se reportaron: CIM y el tiempo cuando ocurrió la actividad bactericida. (31) (Ver Tablas N° 12, 13, 14, 15)

2.3.8 Efecto inhibitorio de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare L.*) y tomillo (*Thymus vulgaris L.*) estudio “*in situ*”

- **Preparación del inóculo**

Se tomaron de 3 a 5 colonias se incubaron en 5 mL de caldo Müller Hinton para obtener una suspensión de turbidez igual al estándar 0.5 MF, 0.1 mL de esta suspensión se pasó a 5 mL de CMH se agitó con vortex de 15 a 20 segundos, se incubó a 35 ± 2 °C hasta turbidez visible, debería corresponder a la mitad de la fase logarítmica, se monitoreó el crecimiento en el caldo por 3 horas, conteniendo una carga microbiana de 1.5×10^8 UFC/mL, se tomó una alícuota de 0.3 mL de la suspensión ajustada en 9.7 mL de caldo para obtener una concentración de 1.5×10^6 UFC/mL, después se colocó 100 µL de la suspensión en 9 mL caldo, se pasó 100 µL de la solución anterior a otro tubo con 9.9 mL de caldo y de ahí a otro tubo con 9.9 mL de caldo Müller Hinton para obtener la concentración aproximada de 1.5×10^3 UFC/mL.

- **Procedimiento del ensayo**

Para el efecto inhibitorio de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare L.*) y tomillo (*Thymus vulgaris L.*) se realizó un ensayo con una concentración de 15.6 % (10

veces mas de CMB). En esta prueba primeramente se cortó la pechuga de pollo en pedazos de 3x3 cm., se la hizo hervir por dos minutos y se colocó en fundas ziploc pequeñas, después se inoculó 100 µL del Caldo Müller Hinton a una concentración aproximada de bacterias a 10^3 UFC/mL, masajeando por un lapso de 1.5 min en cada uno de los pedazos, luego se añadieron por separado los aceites de orégano y tomillo a una concentración de 15.6% en cada una de las fundas ziploc, añadiendo 100 µL del aceite y se masajeó de igual forma por 1.5 min. Para el control se realizó el mismo procedimiento, pero la excepción de esto fue no aplicar el aceite de orégano y tomillo.

Se hizo el muestreo de cada una de las fundas ziploc, tanto para las que poseen el aceite de orégano y tomillo con la concentración de 15.6 mg/mL y para los controles correspondientes con cada bacteria *Salmonella* spp, y *Proteolíticos*; se incubaron todas las fundas ziploc en la refrigeradora a una temperatura de 4 a 7 °C, luego se tomó la muestra y se enumeraron viables a las 0, 6, 12, 18, 24 y 48 horas usando un medio de cultivo agar Müller Hinton e incubando a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C por 24 horas (31). (Ver Tablas 16,17)

2.3.9 Efecto Combinado

Se determinaron las CIM para cada aceite esencial para emplear estas concentraciones en el ensayo del efecto combinado. Se preparó un inóculo de 1.5×10^8 UFC/mL. Al conocer el halo de inhibición de cada aceite esencial frente a la bacteria los discos se colocaron separados por una distancia iguala la suma de la zona del radio para cada disco probado individualmente.(31) (Ver Tabla N° 18).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos que se reportan fueron obtenidos sobre la base de la metodología indicada.

3.1 ANÁLISIS SENSORIAL DE LA CARNE DE POLLO

El análisis sensorial de la pechuga de pollo se realizó a través de los sentidos de la vista, olfato y tacto, evaluándose color, olor y textura a temperaturas: 21 °C (ambiente), 4 °C (refrigeración) y 0 °C (congelación) y a 0, 10 y 15 días de almacenamiento.(74) aplicándose la Escala de Karlsruhe. Los resultados se reportan en la Tabla N° 1.

TABLA N° 1 EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LA PECHUGA DE POLLO

Trata.	Tiempo (Días)	Temperaturas °C	Características Sensoriales			Promedio
			Color	Textura	Olor	
T _{1Amb}	0	21	8	8	9	8.3
T _{2Ref}	0	4	8	8	9	8.3
T _{3Cong}	0	0	8	8	9	8.3
T _{1Amb}	10	21	5	4	6	5
T _{2Ref}	10	4	6	6	7	6.3
T _{3Cong}	10	0	7	7	8	7.3
T _{1Amb}	15	21	1	1	1	1
T _{2Ref}	15	4	4	3	3	3.3
T _{3Cong}	15	0	6	7	7	6.6

Fuente: Paola Solís

Del análisis de los resultados y en comparación con la Tabla No 2 se establece que la muestra de pechuga de pollo a 0 días y a temperatura ambiente está categorizada con un

valor de 8,3 y de acuerdo a la escala de Karlshure es una carne de color típico agradable, brillante se observó algunas estrías blancas (grasas); de olor específico, agradable, bueno, completamente intenso; de textura muy buena, tierna, firme, agradable y jugosa por lo que se puede decir que no presentó ningún tipo de alteración, por lo que ésta es analizada en el momento que se lleva al laboratorio, en cambio a los 10 días y a temperatura ambiente esta misma pechuga de pollo tiene un valor de 5 y de acuerdo a la escala de Karlshure la carne presenta un color aún típico, sin brillo, poco parejo, manchas iridiscentes verdosas; de olor atípico (a cecinas en general), olor propio aceptable; de textura no homogénea, ligeramente elástica y seca, esto se debe a que la pechuga está en proceso de descomposición, debido a que está invadida por una serie de microorganismos propios del animal; por último la pechuga de pollo a temperatura ambiente por 15 días de almacenamiento muestra un valor de 1, de acuerdo a la escala de Karlshure presentó un color completamente artificial, muy deteriorado; de olor francamente desagradable; de textura repugnante (VER ANEXO N° 1), esto indica que la pechuga de pollo está en estado de putrefacción debido a la proliferación de microorganismos como pueden ser *Enterobacter*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, etc., por lo que la muestra de pechuga de pollo en estas condiciones no es apta para el consumo humano.

TABLA N° 2 ANÁLISIS SENSORIALES DE LA PECHUGA DE POLLO A UTILZADA PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Párametro de análisis	Calidad	Resultado
Color	Grado 1	Excelente 9
Olor	Grado 1	Excelente 9
Textura	Grado 1	Excelente 9

Fuente: Tesista

La aplicación de la evaluación sensorial de la pechuga de pollo mediante la escala de Karlsruhe propuesta en esta investigación, indica una buena calidad de la muestra a

utilizar porque presentó un color natural, excepcionalmente agradable, brillante, típico, diferentes tonalidades rosáceas en diferente intensidad, ausencia de zonas blancas (grasas); de olor específico, excepcionalmente agradable en todo el corte; de textura excelentemente buena, tierna, jugosa y firme. (VER TABLA 2) (VER ANEXO N° 1)

Por lo tanto, la muestra de pechuga de pollo al presentar buena calidad sensorial, cumplió con los requisitos para ser empleada en los ensayos microbiológicos.

3.2 DETERMINACIÓN QUÍMICA

3.2.1 Ensayo de ácido sulfhídrico

Los resultados en esta prueba evidenciaron que las muestras a tiempo cero a 21 °C fueron negativas para el ensayo de H₂S debido a que la carne es fresca y no hay degradación de proteínas en la pechuga de pollo (la muestra es apta para su uso en las determinaciones microbiológicas).

En las muestras mantenidas por 10 días a 21 °C +/- 2 °C el resultado fue positivo, igual ocurrió en las muestras conservadas por 15 días en las condiciones ya especificadas. Es decir, hubo presencia de sulfuro de hidrógeno indicando la degradación de la proteína de la pechuga de pollo.

TABLA N° 3 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO EN PECHUGA DE POLLO

TRATAMIENT	TIEMPO (DIAS)	TEMPERATURAS °C	DETERMINACION DE ÁCIDO SULFÚRICO
T _{1Amb}	0	21	Negativo
T _{1Ref}	0	4	Negativo
T _{1Cong}	0	0	Negativo
T _{2 Amb}	10	21	Positiva
T _{2 Raf}	10	4	Negativo
T _{2 Cong}	10	0	Negativo
T _{3 Amb}	15	21	Positivo
T _{3 Ref}	15	4	Positiva
T _{3 Cong}	15	0	Negativo

Fuente: Paola Solís

3.2.2 Determinación de pH

Las características de calidad de la carne dependen no sólo de factores inherentes al propio animal como son la edad, sexo, raza, alimentación, etc., sino también, de la naturaleza y extensión de los cambios químicos que tienen lugar durante el metabolismo *post mortem*. Luego de realizar numerosos estudios para conocer la realidad existente entre estos cambios y las características de calidad de la carne se ha comprobado que la velocidad del descenso del pH, son factores que tienen influencia decisiva sobre las características fisiológicas del animal y de las condiciones de sacrificio (41)

TABLA N° 4 DETERMINACIÓN DE pH EN PECHUGA DE POLLO

TRATAMIENT	TIEMPO (DIAS)	TEMPERATURAS °C	pH
T _{1Amb}	0	21	5.58
T _{1Ref}	0	4	5.68
T _{1Cong}	0	0	5.70
T _{2Amb}	10	21	6.7
T _{2Ref}	10	4	5.90
T _{2Cong}	10	0	5.87
T _{3Amb}	15	21	7.1
T _{3Ref}	15	4	6.3
T _{2Cong}	15	0	5.96

Fuente: Paola Solis

El pH es un factor muy importante para permitir o no el crecimiento de microorganismos alteradores en los alimentos, la pechuga de pollo a una temperatura ambiente a cero días presenta un pH promedio de 5,58 que indica que la carne no permite el fácil crecimiento de bacterias, por lo tanto es de buena calidad ya que se encuentra dentro de los rangos de aceptabilidad. Mientras que al pasar 10 y 15 días de conservación a temperatura ambiente, el pH ha aumentado y eso indica la proliferación de microorganismos en especial para la proliferación de bacterias proteolíticas que ocasionan la descomposición de la carne (41).

3.3 DETERMINACIÓN MICROBIOLÓGICA

3.3.1 Obtención de microorganismos

Para la presente investigación se utilizó *Salmonella* spp., la cual se mantuvo aislada y conservada en agar Müller Hinton. La identidad de los aislamientos se con

al evidenciar en los cultivos las características morfofisiológicas correspondientes al género *Salmonella*. Estas bacterias son bacilos Gram-negativos de 0,7-1,5 x 2,0-5 µm, no fermentadoras de lactosa, anaerobios facultativos, no esporulados (Terragno et al.2003); generalmente móviles por flagelos, peritricos- con la excepción de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, responsables de la tifoidea aviar y pulloris respectivamente (Stanchi 2007, Terragno et al, 2003). Crecen en rango de temperatura de (7-28 °C), el rango de pH ideal para su crecimiento está entre 6,6 y 8,2. En los cultivos crecen en medios simples o comunes donde se presentan colonias: lisas, rugosas y mucosas capsuladas (65).


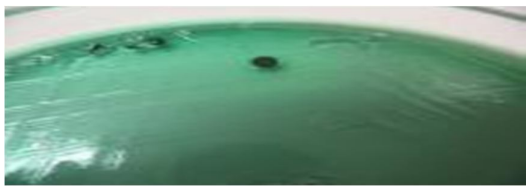
3.3.2 Reactivación de *Salmonella* spp.

Luego de la obtención y conservación de la cepa de *Salmonella* spp., antes de realizar cada prueba se reactivó la cepa cultivándola en caldo soya ptipticasa por 18 a 24 horas a 37 ° C +/- 2 °C. Se tomó un inóculo del caldo y se sembró en Agar Müller Hinton. Con esto se logró obtener siempre bacterias frescas y libres de contaminación. (VER ANEXO N° 11)

3.2.3 Identificación de *Salmonella* spp.

Salmonella spp., se desarrolló en medios selectivos formando colonias con morfología macroscópica típica como se observa los resultados en la tabla N° 5.

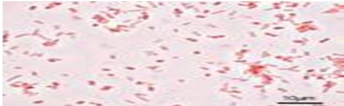
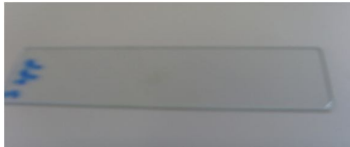
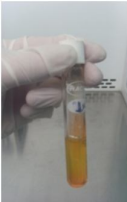


Tabla N° 5 RESULTADO DE IDENTIFICACIÓN DE LA *SALMONELLA* spp. EN MEDIOS SELECTIVOS

MEDIOS SELECTIVOS PARA <i>SALMONELLA</i> spp.	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA DE LAS COLONIAS
<p style="text-align: center;">Agar XLD</p> 	<p><i>Salmomella</i> spp. presentó colonias típicas de color rojo con el centro negro debido a la producción de H₂S. La degradación de la xilosa, lactosa y sacarosa generan la producción de ácido cambiando el color del medio de rojo a amarillo. La producción de H₂S bajo condiciones ácidas, la descarboxilación de la lisina en ausencia de fermentación de lactosa o sacarosa ocasiona la reversión del medio alcalino y el medio regresa a su color inicial (65).</p>
<p style="text-align: center;">Agar Sulfito Bismuto</p> 	<p><i>Salmomella</i> spp. presentó colonias típicas de color negro características en este agar. Se presenta colonias de color marrón o negras a veces tienen brillo metálico alrededor de las colonias (65).</p>
<p style="text-align: center;">Agar Mac Conkey</p> 	<p><i>Salmomella</i> spp. presenta colonias transparentes sin precipitado negro. La diferenciación de organismos entéricos se lleva a cabo con la combinación de lactosa con el indicador rojo neutro. Se producen colonias rosas o rojas, si el aislado es capaz de fermentar la lactosa y sin color en caso contrario (65).</p>
<p style="text-align: center;">Agar Entérico de Hecktoen</p> 	<p><i>Salmomella</i> spp. presenta colonias de color verde sin punto negro. Inhiben crecimiento de coliformes y bacterias no fermentadoras de lactosa, así facilita la identificación de <i>Salmonella</i> donde se presentan colonias verde-azuladas con o sin centro negro (65).</p>
<p style="text-align: center;">Agar Verde Brillante</p> 	<p><i>Salmomella</i> spp. presenta colonias de color rosado. En el medio la pluripectona y el extracto de levadura, constituye la fuente de nitrógeno, vitamina y minerales. La lactosa y la sacarosa son los carbohidratos fermentables, el rojo fenol es el indicador de pH que vira a amarillo cuando hay producción de ácido a partir de la fermentación de azúcares, el NaCl mantiene el balance osmótico y el verde brillante actúa como agente selectivo (65).</p>

Las colonias desarrolladas en cada uno de los medios selectivos evidenciaron una morfología macroscópica correspondiente al género *Salmonella* características como el color, formación de precipitado, apariencia, etc., resultaron de carbohidratos fermentables o del uso de componentes presentes en el medio nutritivo, donde los agentes selectivos inhiben a la microbiota o acompañante que se puede presentar.

Características morfológicas de *Salmonella* spp.

TABLA N° 6 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Salmonella* spp.

ENSAYOS	CARACTERÍSTICAS
<p>Tinción GRAM</p> 	<p>Bacilos Gram- negativos no esporulados.</p>
<p>Prueba de la oxidasa</p> 	<p>Negativo</p> <p>Los citocromos son proteínas que contienen hierro y actúan como último eslabón de la cadena de la respiración aerobia; transfieren electrones de hidrógeno al oxígeno, con la formación de agua. El sistema citocromo se encuentra presente en microorganismo aerobios, microaerobios y en algunos anaerobios facultativos. <i>Salmonella</i> no contiene citocromo oxidasa (66).</p>
<p>Fermentación de azúcares en TSI</p> 	<p>Rojo/amarillo</p> <p>La fermentación de la lactosa y sacarosa se observa en la superficie y de la glucosa en el fondo, con formación de ácido que se manifiesta por cambio de color del indicador rojo de fenol que vira de anaranjado rojizo a amarillo.(66)</p>
<p>Crecimiento en LIA</p> 	<p>Violeta/ morada o violeta púrpura</p> <p>Se observa la fermentación de glucosa, producción de ácido sulfhídrico, descarboxilación de la lisina y alcalinización del medio.(66)</p>
<p>Producción de ureasa</p> 	<p>Negativo</p> <p>La enzima ureasa hidroliza la urea en amoníaco y anhídrido carbónico.(66)</p>

La cepa de *Salmonella* spp. empleada en el ensayo presentó características morfofisiológicas típicas para el género de *Salmonella* (65).

3.2.4 SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El mayor efecto inhibitorio contra *Salmonella* correspondió al aceite esencial de tomillo sin diluir con un halo de 18mm superando al patrón Streptomycin de 10 µg/µL que formó un halo de 17 mm las concentraciones de 10.000, 5.000, 2.500, 1.250 mg/mL no presentaron inhibición frente a *Salmonella* spp. (VER TABLA N° 7)

TABLA N° 7 SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.) FRENTE A *Salmonella* spp.

Concentraciones mg/ml	Diámetro del halo de Inhibición en (mm)						Desviación estándar
10.000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5.000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2.500	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.250	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aceite puro	18	18	18	18	19	19	0,52
TW 80 al 10%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Streptomycin 10µg/µl	17	17	17	17	18	17	0,41

FUENTE: Paola Solis

Para el aceite esencial de orégano el mayor efecto inhibitorio fue el del aceite sin diluir con un halo de 10 mm siendo este inferior al patrón Streptomycin de 10 µg/µL que formó un halo de 17mm las concentraciones de 10.000, 5.000, 2.500, 1.250 mg/mL no presentaron inhibición frente a *Salmonella* spp. (VER TABLA N° 8)

TABLA N° 8 SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*) FRENTE A *Salmonella* spp.

Concentraciones mg/ml	Diámetro del halo de Inhibición en (mm)						Desviación estándar
10.000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5.000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2.500	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.250	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aceite puro	10	10	10	10	9	10	0.41
TW 80 al 10%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Streptomina 10µg/µl	17	17	18	18	17	17	0,54

FUENTE: Paola Solis

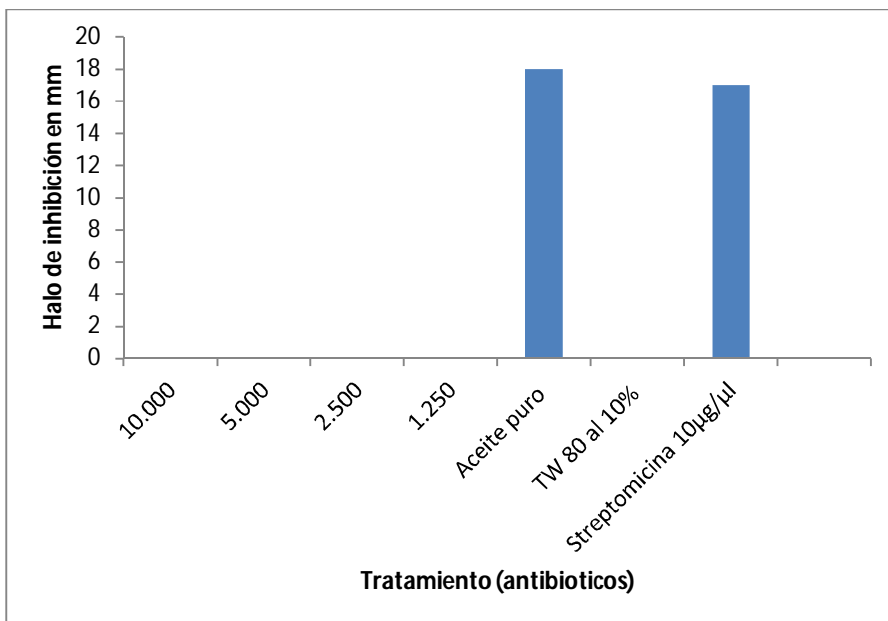
La actividad antimicrobiana podría darse por componentes fenólicos con acción principal sobre la membrana bacteriana (42), siendo las bacterias gram positivas más sensibles que las gram negativas (9).

En la actividad antimicrobiana, de compuestos naturales es posible que el componente principal esté modulado por otras moléculas que se encuentran en menor proporción, y es probable que varios componentes jueguen un rol en los atributos de los productos naturales tales como la fragancia, densidad, textura, color y sobre todo la penetración celular de aceites esenciales; las atracciones lipofílicas o hidrofílicas y fijación en las paredes celulares y membranas y la distribución celular. Esta característica es muy importante porque la distribución del aceite en la célula determina los diferentes tipos de reacciones producidas dependiendo de su compartimentalización en la célula. En este sentido da más información el estudio de un aceite completo antes en lugar de sus componentes individuales (Bakkali, F. et al, 2008), en este estudio los productos

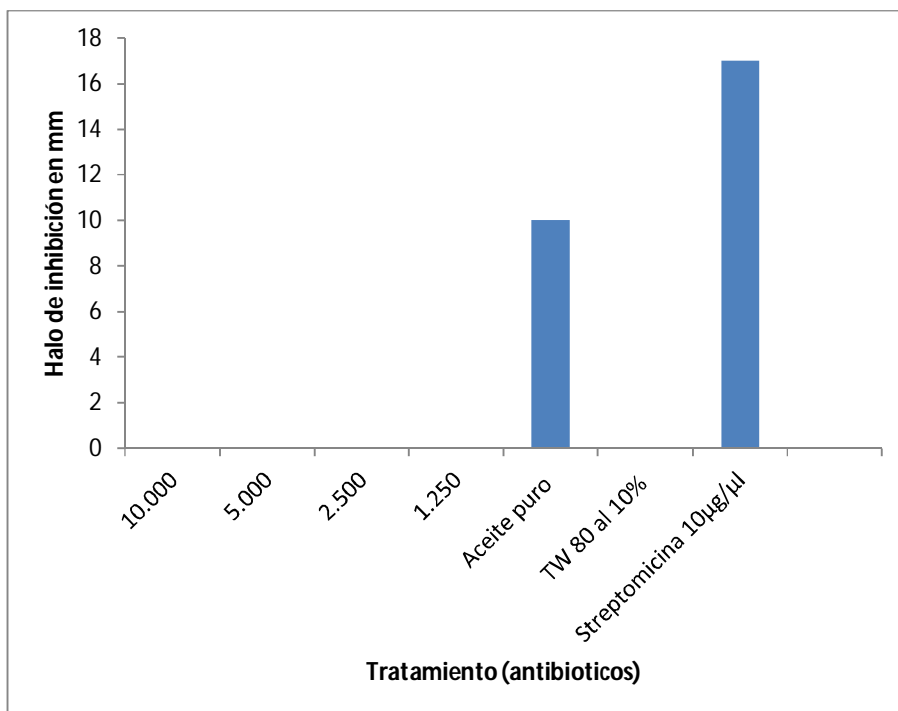
ensayados fueron el aceite de tomillo extraído de hojas y tallo de la planta y del aceite de orégano extraído de las hojas (8).

Otras publicaciones sobre la composición química del aceite esencial de *Origanum vulgare*, informan diferentes rendimientos según el tiempo y modo de proceso desde su recolección hasta su extracción. Donde se presentó fenoles y compuestos relacionados metabólicamente con el carvacrol. Con respecto a su actividad antimicrobiana, el resultado de la investigación confirma que el aceite esencial del orégano, posee efecto antimicrobiano frente a bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias gram negativas. La bacteria *Pseudomona auriginosa* no mostró sensibilidad frente al aceite esencial. Investigaciones similares demuestran la acción antibacteriana de la familia de las labiadas, sin embargo, existe una diferencia en cuanto al diámetro de inhibición de *Salmonella cholerae suis*. Hay resultados contradictorios de los métodos utilizados en las evaluaciones de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales pudiéndose deber a las variaciones metodológicas y de los materiales empleados, señalando que puede deberse a diversos factores como la técnica de valoración, medio de crecimiento, microorganismos empleados y la composición química de los aceites esenciales (54):

En conclusión, las diferencias cuantitativas pueden atribuirse a los métodos de obtención, fecha y tiempo transcurrido entre la recolección y el proceso de obtención del aceite esencial. La naturaleza de las bacterias sensibles al aceite de orégano justifica su uso popular en la preparación y conservación de los alimentos. (54)



GRAFICA N° 1: SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*) FRENTE A *Salmonella spp**



GRAFICA N° 2: SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*) FRENTE A *Salmonella spp**

3.2.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima

En la tabla No 9 de la determinación de la concentración inhibitoria mínima se clasifica la turbidez en tubos con distintas concentraciones de aceite de tomillo, para este ensayo se utilizaron trece tubos con caldo Müller Hinton incluidos un caldo más bacteria *Salmonella* spp. a (4 a 5×10^6 UFC/mL) y otro caldo sin bacterias que serán los controles para nuestro ensayo, las concentraciones de aceite serán en porcentajes preestablecidos anteriormente es decir al 100% para las tres repeticiones. Se determinó la clasificación de la turbidez con tres cruces (lo que e visible que tiene una turbidez densa o crecimiento globular fino o una niebla en el sobrenadante), la presencia del aceite en estas concentraciones fueron altas y en contacto con el Tween 80 al 10% al hacer la mezcla se tornó lechoso lo que no permitió distinguir la presencia o ausencia de los microorganismos en el tubo.

Para las concentraciones de 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 % se clasificó la turbidez con dos cruces por presentar una niebla ligera en el tubo, igual que en el caso anterior tampoco se pudo determinar la presencia o no de las bacterias. La comprobación de esto se lo hizo por siembra de inóculos en Agar Müller Hinton incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

En la última concentración de 0.09 % la turbidez disminuyó y en estas concentraciones hay mayor cantidad de microorganismos debido a que las concentraciones de aceite esencial de tomillo fueron muy bajas lo que hace que pierda la eficacia de la actividad antimicrobiana del aceite. (Ver Anexo N° 14)

Este ensayo es muy importante debido a que por medio de esto podemos identificar cual va hacer la concentración inhibitoria mínima bactericida utilizada para los siguientes ensayos.

TABLA Nº 9: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

Num. Tubos	Aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.) Concentración %	CLASIFICACIÓN DE LA TURBIDEZ		
		Primera Repetición	Segunda Repetición	Tercera Repetición
1	100	(+++)	(+++)	(+++)
2	50	(+++)	(+++)	(+++)
3	25	(+++)	(+++)	(+++)
4	12.5	(+++)	(+++)	(+++)
5	6.25	(+++)	(+++)	(+++)
6	3.12	(+++)	(+++)	(+++)
7	1.56	(++)	(++)	(++)
8	0.78	(++)	(++)	(++)
9	0.39	(++)	(++)	(++)
10	0.19	(++)	(++)	(++)
11	0.09	(+)	(+)	(+)
12	MH+ mo	(+++)	(+++)	(+++)
13	CMH	Claro	Claro	Claro

*± a 1+: Muy ligera niebla en el tubo*2+ ligera niebla

*3+: Turbidez densa o crecimiento globular fino o precipitado denso con niebla en el sobrenadante.*CMH: C

El ensayo de macrodilución en tubos para determinar la concentración inhibitoria mínima CIM está diseñado para indicar cual es la concentración más baja del agente antimicrobiano capaz de inhibir completamente la multiplicación del inóculo bacteriano (acción estática), lo que se evidencia por la claridad del caldo. En el presente estudio no fue posible la lectura directa de la CIM por cuanto el aceite de tomillo usado como antimicrobiano ocasionó el desarrollo de turbidez en mayor o menor grado en todos los tubos de la prueba, (Ver Tabla N° 10)

Sin embargo, el ensayo permitió determinar la concentración mínima bactericida CMB del aceite de tomillo mediante subcultivo de inóculo de los tubos en placas de agar Müller Hinton, usando el rango de concentraciones de 1.56 a 0.09% con los respectivos controles positivo y negativo (Ver Tabla No 10). Los resultados de este ensayo mostraron que el aceite de tomillo fue efectivo en las concentraciones de 100 a 3.12% para eliminar *Salmonella* spp. quizás por la presencia de compuesto de timol, carvacrol, borneol, linaol, cimeno, pineno, dipenteno y acetato de bornila, un principio amargo, tanino y materias resinosas y pépticas. En contraste, en las concentraciones sucesivas de orden 1.56 a 0.09% se recuperaron más de 30×10^2 UFC /mL de *Salmonella* spp. lo que indica que el aceite fue muy diluido y no ejerció control sobre la población bacteriana. Estas pruebas determinaron que el aceite esencial de tomillo en concentración de 3.12% sería bactericida para *Salmonella* spp. Los estudios de actividad antimicrobiana de productos naturales, no se han estandarizado como en el caso de estudios clínicos, por tanto sus resultados son difíciles de comparar, tomando en cuenta que emplean metodologías de análisis que incluyen diferentes solventes y concentraciones de las cepas microbianas (Hammer, Carson) (39).

Para el ensayo del tiempo de muerte, se emplearon las concentraciones mínimas bactericidas en lugar de concentraciones inhibitorias mínimas que en la práctica no se determinaron por la interferencia de turbidez de las disoluciones del aceite esencial en las lecturas de los tubos (Ver Tabla 11).

Estudios realizados por Conner sobre la actividad antimicrobiana de los aceites de tomillo y orégano determinaron que son aceites esenciales de actividad inhibitoria fuerte. Se han identificado a terpenos carvacrol, *p*-cimeno y timol como los principales componentes volátiles de estas especias, siendo el timol el que se encuentra en mayor proporción (en el orégano hasta en un 50% y en el tomillo hay 43% de timol y 36% de *p*-cimeno) (Conner, 1993). Un análisis realizado por Draughon en pechuga de pollo determinó que la concentración inhibitoria mínima del aceite esencial de tomillo sobre *Salmonella* fue de un 0,3% ocasionando una reducción significativamente de la población de ensayo en 3 log UFC/g ($P < 0,05$). (Draughon, 2004) (48).

En contraste en el presente estudio se determinó una concentración inhibitoria mínima de 1,56% y bajo condiciones similares para el ensayo. La diferencia de actividad antimicrobiana del aceite se explicaría por efecto de factores intrínsecos y externos asociados a la planta o por el método de extracción de los aceites esenciales.

3.3.6 Determinación de la concentración mínima bactericida

TABLA NO 10: CONCENTRACIÓN MINIMA BACTERICIDA DEL ACEITE DE TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*) FRENTE A *Salmonella spp.**

METODO DE MACRODILUCIÓN

Inseng, H.D 1995 Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol I Guide to Regulatory Requirements. ASM press. Washintong, D.C. USA pp 5.16.1 a 5.20.20

Aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>) en %	CONCENTRACIONES											Inoculación: 4 a 5x10 ⁶ UFC/mL	
												CONTROLES	
	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	(MH + mo) Control positivo	CMH Control negativo
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

* : ≥30 x 10² UFC/mL* : No himiento

Tabla No 11: DETERMINACIÓN DE LA TURBIDEZ EN TUBOS A DIFERENTES TIEMPOS

Lectura de tubos controles: CMH + 10uL de bacterias 6*10 ⁵ UFC					Lectura de tubos inoculados con: CMH + Aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.) + 10uL de bacterias 6*10 ⁵ UFC			
Tiempos	0.5MIC (1.56 %)	1MIC (3.12 %)	2MIC (6.25 %)	4MIC (12.5 %)	0.5MIC (1.56 %)	1MIC (3.12 %)	2MIC (6.25 %)	4MIC (12.5 %)
t ₀	No hubo turbidez	No hubo turbidez	No hubo turbidez	No hubo turbidez	(+)	(+)	(++)	(+++)
t ₄	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(++)
t ₈	(++)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
t ₂₄	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)

*± a 1+: Muy ligera niebla en el tubo

*2+ ligera niebla

*3+ a 4+: Turbidez densa o crecimiento globular fino o precipitado denso con niebla en el sobrenadante

3.3.7 Tiempo de muerte

El tiempo de muerte es otro método para evaluar la capacidad de un agente antimicrobiano para matar un aislamiento bacteriano y para examinar la tasa y cual es la concentración del agente.

En este estudio el tiempo de muerte determinó la actividad bactericida del aceite de tomillo contra *Salmonella* spp. dependiente de la concentración: 0.5, 1, 2, y 4 CIM y del tiempo de actuación 0, 4, 8 ó 24 horas.

Los resultados indican que mientras el cultivo control a 0 horas de la inoculación de *Salmonella* spp. va aumentando en población con el tiempo de incubación, los otros cultivos tratados con las distintas concentraciones del aceite de tomillo experimentaron una reducción del 100% de la carga microbiana, con un decrecimiento variable de 1-5 log₁₀- UFC/mL.

Generalmente, una disminución de 3 unidades logarítmicas en el recuento de viables revela una adecuada respuesta bactericida del material de ensayo y los organismos son típicamente muertos cuando hay una reducción aproximada de 1 log₁₀-UFC/mL. A una CIM a 2 y 4 veces la CIM pueden decrecer 2 y 3 unidades logarítmicas en la primera hora de incubación (42). Nuestros resultados guardan coherencia con lo anteriormente mencionado por tanto el aceite de tomillo muestra actividad bactericida contra *Salmonella* spp. La concentración más baja ensayada de 1.56% fue tan efectiva como la solución de 4CIM y tendrían un tiempo de actuación mínimo de 4 horas.

TABLA N° 12: RESULTADOS DEL TIEMPO DE MUERTE DE *Salmonella* spp. FRENTE UNA CONCENTRACIÓN DE 0.5 MIC (1.56 %) ACEITE DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)

			Aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)		
<i>Salmonella</i> spp.			0.5 CIM (1.56%)	Actual* Log UFC	% de Reducción
Tiempo en (Horas)	<i>Salmonella</i> spp. crecimiento microbiano UFC/mL	Log de los viables			
0	14x10 ²	3	0	0	100%
4	20x10 ³	4	0	0	100%
8	22x10 ³	4	0	0	100%
24	31x10 ⁴	5	0	0	100%

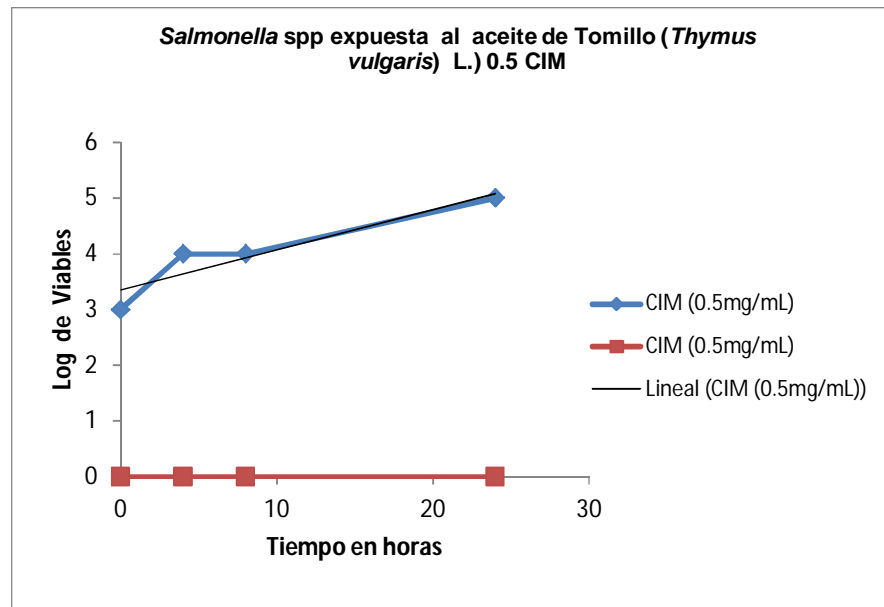
CIM: Concentración inhibitoria mínima

UFC: Unidades formadoras de colonia

En los ensayos “*in vitro*” realizados para el tiempo de muerte de *Salmonella* spp. en este estudio se emplearon cuatro tiempos 0, 4, 8 y 24 horas de incubación a 35 C° por 24 horas, y diferentes concentraciones de aceite como 0.5, 1, 2 y 4 CIM en %, aumentado 10 veces la concentración mínima inhibitoria. Al tiempo cero de inoculación con 24 horas de incubación el crecimiento en el control fue de 3 logaritmos de viables, en cambio a cuatro horas de incubación presenta 4 logaritmos de viables , a ocho horas presenta 4 logaritmos de viables y a veinte y cuatro horas de incubación existe 5 logaritmos de viables, la concentración 0.5 CIM de aceite de tomillo más *Salmonella* spp. presentó reducción de viables lo que indica la actividad antibacteriana frente a *Salmonella* spp.

Como se puede observar en el Gráfico N.º3 la actividad antibacteriana del aceite de tomillo es una tendencia recta esto se debe a que presenta eficacia frente a *Salmonella*

spp. la bacteria propuesta para el ensayo “*in vitro*”, indicando que a medida que va pasando las horas de incubación de la bacteria va haciendo efecto el aceite produciendo la muerte de las mismas.



GRAFICA N°3: *Salmonella* spp. EXPUESTA AL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.) 0.5 CIM

TABLA N° 13: RESULTADOS DEL TIEMPO DE MUERTE DE *Salmonella* spp. FRENTE UNA CONCENTRACIÓN DE 1 CIM (3.12 %) ACEITE DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)

			Aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)		
<i>Salmonella</i> spp.			1 CIM (3.12%)	Actual* Log UFC	% de Reducción
Tiempo en (Horas)	<i>Salmonella</i> spp. crecimiento microbiano UFC/MI	Log de los viabes			
0	18x10 ²	3	0	0	100%
4	40x10 ³	5	0	0	100%
8	64x10 ⁴	6	0	0	100%
24	56x10 ⁴	6	0	0	100%

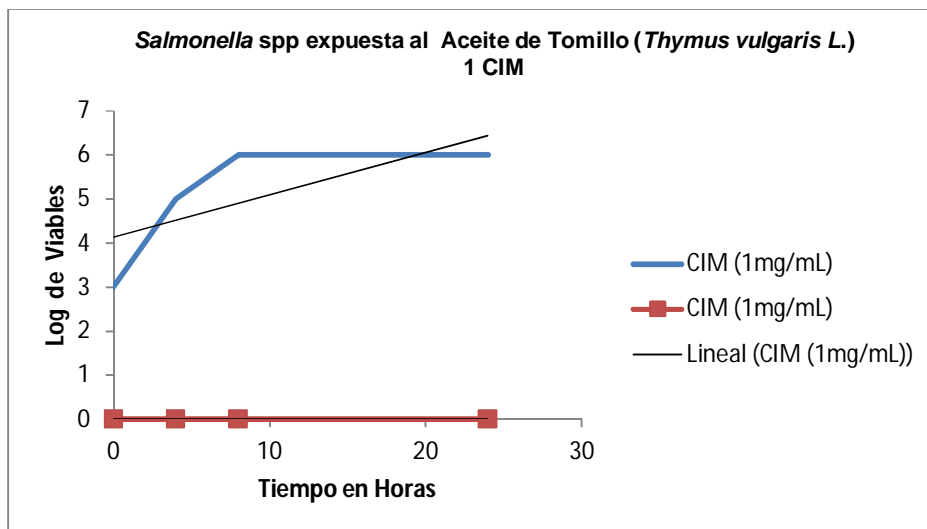
CIM: Concentración inhibitoria mínima

UFC: Unidades formadoras de colonia

Para este ensayo de igual manera se utilizó la misma bacteria y con los mismos tiempos determinados con anterioridad, es decir que al tiempo cero de inoculación con 24 horas de incubación el crecimiento en el control fue de 3 logaritmos de viabes, en cambio a cuatro horas de incubación presentó 5 logaritmos de viabes , a ocho horas presenta 5 logaritmos de viabes y a veinte y cuatro horas de incubación existe 6 logaritmos de viabes, puesto que en la concentración de 1 CIM actual de aceite de tomillo más *Salmonella* spp. el conteo se redujo a cero unidades formadoras de colonias, se deduce una efectividad antibacteriana de aceite de tomillo “*in vitro*” del 100%.

En la gráfica No 4 la tendencia que presenta la actividad del aceite de tomillo frente a la bacteria es una recta, se debe a que medida que va pasando las horas las bacterias van desapareciendo. En relación a la otra tendencia se observó que, a medida que va pasando

las horas van aumentando la población bacteriana, esto es porque no existe el antibacteriano el cual inhibe el crecimiento.



GRÁFICA No 4: *Salmonella* spp. EXPUESTA AL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*) 1MIC

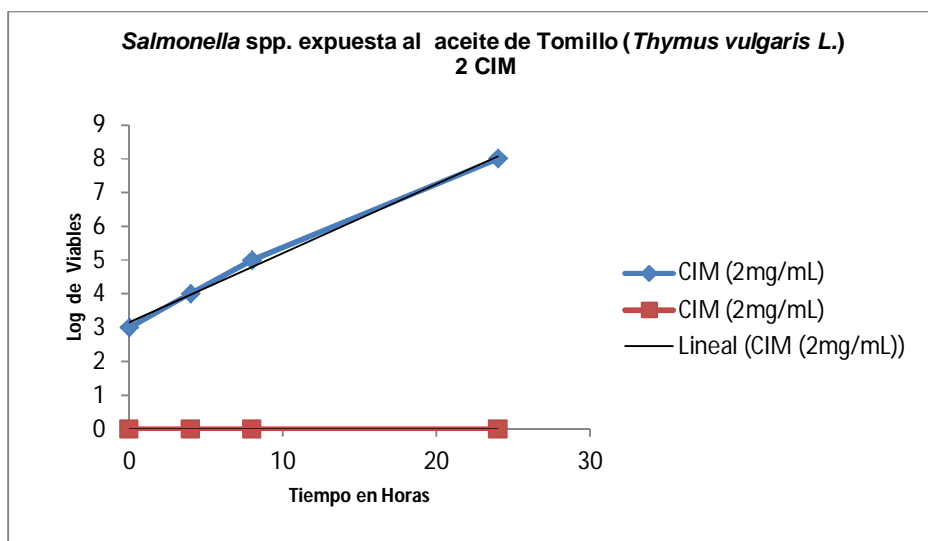
TABLA N° 14: RESULTADOS DEL TIEMPO DE MUERTE DE *Salmonella* spp. FRENTE UNA CONCENTRACIÓN DE 2 MIC (6.25 %) ACEITE DE TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*)

			Aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris L.</i>)		
<i>Salmonella</i> spp.			2 CIM (6.25%)	Actual* Log UFC	% de Reducción
Tiempo en (Horas)	<i>Salmonella</i> spp. crecimiento microbiano UFC/mL	Log de los viables			
0	13x10 ²	3	0	0	100%
4	15x10 ³	4	0	0	100%
8	23x10 ⁴	5	0	0	100%
24	67x10 ⁶	8	0	0	100%

CIM: Concentración inhibitoria mínima

UFC: Unidades formadoras de colonia

En esta tabla 14 se observa que conforme aumenta el tiempo de incubación, se eleva el número viables, en el cultivo control sin antimicrobiano, al adicionar el aceite de tomillo en 2 CIM hubo una reducción del 100% viables en cada período de incubación.



GRÁFICA No 5: *Salmonella* spp. EXPUESTA AL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*) 2 CIM

TABLA N° 15: RESULTADOS DEL TIEMPO DE MUERTE DE *Salmonella* spp. FRENTE UNA CONCENTRACIÓN DE 4 CIM (12.5 %) ACEITE DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)

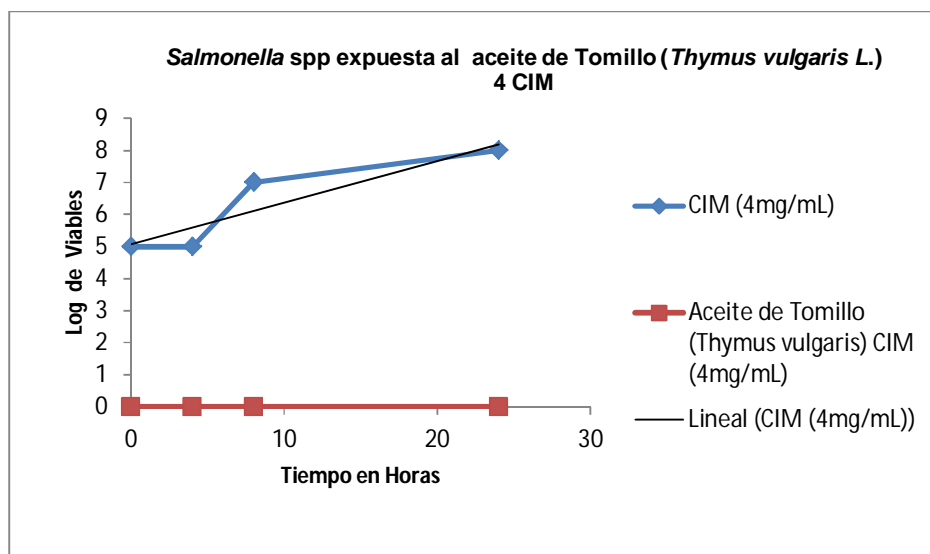
			Aceite de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)		
<i>Salmonella</i> spp.			4 CIM (12.5%)	Actual* Log UFC	% de Reducción
Tiempo en (Horas)	<i>Salmonella</i> spp. Crecimiento microbiano UFC/mL	Log de los viables			
0	16x10 ⁴	5	0	0	100%
4	27x10 ⁴	5	0	0	100%
8	45x10 ³	7	0	0	100%
24	84x10 ⁶	8	0	0	100%

CIM: Concentración inhibitoria mínima

UFC: Unidades formadoras de colonia

En la tabla N° 15, tiempo de muerte de *Salmonella* spp. en el ensayo “*in vitro*” al tiempo cero se presentó 5 logaritmos de viables, a las cuatro horas hay 5 logaritmos de viables, a las ocho horas presentó 7 logaritmos de viables y a las veinte y cuatro 8 logaritmos de viables, para el ensayo de la concentración 4 CIM de aceite esencial de tomillo en cada tiempo determinado existe una reducción total a cero logarítmico de unidades formadoras de colonias, indicando el 100% de efectividad del aceite frente a *Salmonella* spp.

Es por esta razón que los extractos de hierbas, aceites esenciales y especias son utilizados por la industria alimentaria como agentes naturales para extender la vida útil de los alimentos. Una variedad de antimicrobianos presentes en plantas y en especias se emplean para reducir o eliminar las bacterias patógenas, atribuyendo el aumento de la calidad general de los productos alimenticios.

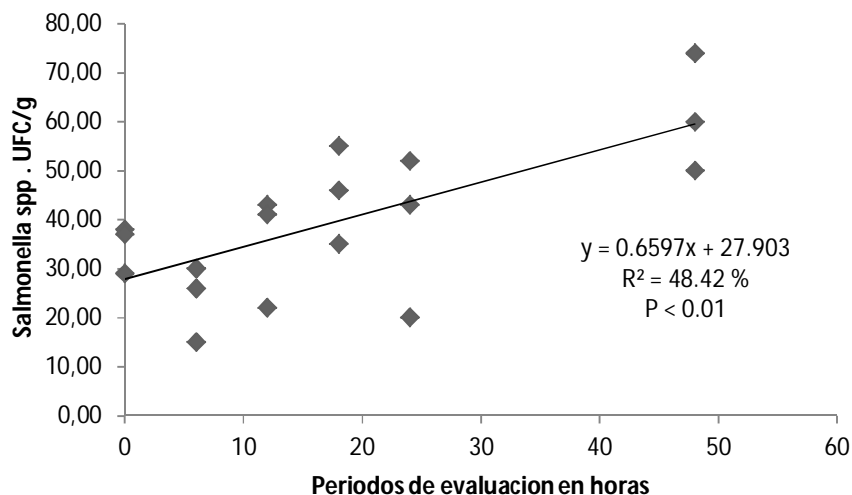


**GRÁFICA No 6: *Salmonella* spp. EXPUESTA AL ACEITE DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)
4 CIM**

3.3.8 EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)” *in situ*”

TABLA NO 16: TRATAMIENTOS UTILIZADOS “*IN VIVO*” PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.) FRENTE A *Salmonella* spp.

F. Var	gl	S. cuad	C. Medio	Fisher		
				cal	0,05	0,01
Total	17	3883,11				
Tramientos	5	2409,11	481,82	3,92	3,11	5,06
Error	12	1474,00	122,83			
CV %			27,86			
Media			39,78			



GRÁFICA No 7: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO(*Thymus vulgaris L.*) FRENTE A *Salmonella* spp. EN PECHUGA DE POLLO

En la Tabla No 16 el coeficiente de variación es de 27.86%, indicando que mientras más bajo posible sea el coeficiente más confiable se hacen los resultados de la actividad del aceite esencial de tomillo frente a la bacteria propuesta.

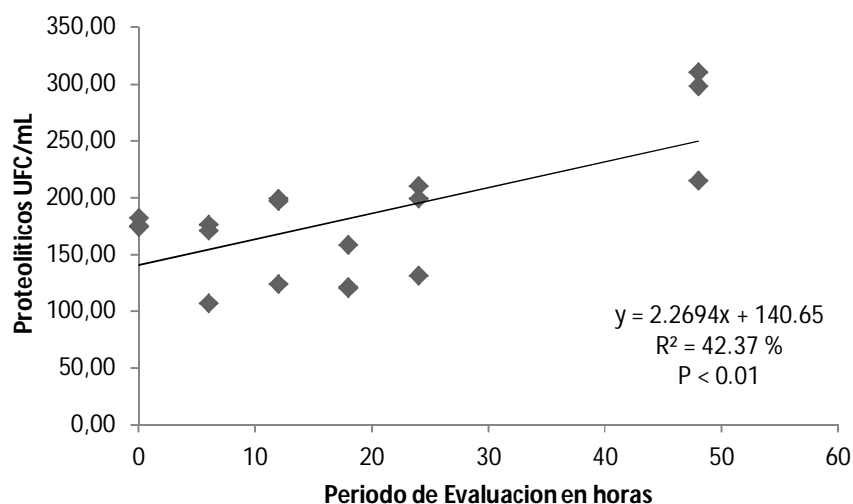
La Gráfica No 7 indica que *Salmonella* spp. presente en la pechuga de pollo conservada con el aceite de tomillo, en promedio registró 39,78 UFC/g, al someter los resultados de varianza se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de almacenamiento.

Al almacenar durante 48 horas la pechuga de pollo con el aceite de tomillo presentó una carga microbiana de *Salmonella* spp. de 61.33 UFC/g, el cual difiere significativamente del resto de periodos de almacenamiento, principalmente cuando se evalúa a las 6 horas se encontró 23.67 UFC/g.

La presencia de *Salmonella* spp. está relacionada significativamente con el período de almacenamiento con una regresión lineal, 48.42% de *Salmonella* spp. depende del período de almacenamiento y por cada hora que se almacena la pechuga de pollo con el antimicrobiano, el crecimiento de la bacteria fue en 0.6597 UFC/g.

TABLA NO 17: TRATAMIENTOS UTILIZADOS “IN VIVO” PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.) FRENTE A *Proteolíticos*.

F. Var	Gl	S. cuad	C. Medio	Fisher		
				cal	0,05	0,01
Total	17	52512,50				
Tramientos	5	35908,50	7181,70	5,19	3,11	5,06
Error	12	16604,00	1383,67			
CV %			20,49			
Media			181,50			



GRÁFICA No 8: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.) FRENTE A BACTERIAS *PROTEOLÍTICAS* EN PECHUGA DE POLLO

En la Tabla No 17 el coeficiente de variación es de 20.49%, indicando que mientras más bajo posible sea el coeficiente más confiable se hacen los resultados de la actividad del aceite esencial de tomillo frente a la bacteria propuesta.

La Gráfica No 8 indica que bacterias proteolíticas presentes en la pechuga de pollo conservada con el aceite esencial tomillo, en promedio registró 181.50 UFC/g, al someter los resultados de varianza se encontró diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los diferentes tiempos de almacenamiento.

Al almacenar durante 48 horas la pechuga de pollo con el aceite esencial de tomillo presentó una carga microbiana proteolíticos de 274.33 UFC/g, el cual difiere significativamente del resto de periodos de almacenamiento, principalmente cuando se evalúa a las 18 horas en el cual se encontró 133 UFC/g.

La presencia de bacterias proteolíticas están relacionados significativamente con el período de almacenamiento con una regresión lineal, 42.37% de microorganismos proteolíticos, la población depende del período de almacenamiento y por cada hora que se almacena la pechuga de pollo, el crecimiento de la bacteria fue en 2.2694 UFC/g.

En resumen, la actividad del aceite de tomillo es fundamentalmente por sus componentes fenólicos, timol y carvacrol, que tienen una actividad antibacteriana tanto frente a gérmenes gram positivos como gram negativos. Este efecto es debido a su acción sobre la membrana bacteriana (75). Este estudio confirma que el tomillo así como varias hierbas y especias poseen actividad antibacteriana "*in vitro*". En particular el hallazgo de la actividad antimicrobiana de algunos extractos de agua puede ser útil para la industria alimentaria ya que los compuestos solubles en agua penetran más fácilmente en la matriz del alimento que el solvente las oleorresinas de extracción o aceites esenciales. Estas

hierbas y extractos de especias por lo tanto tienen el potencial para extender la vida útil o mejorar la seguridad de los alimentos (39).

3.3.9 Efecto combinado

TABLA N° 18 EFECTO COMBINADO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*) SOBRE *Salmonella spp.*

MUESTRA		HALO DE INHIBICIÓN
Tomillo		12mm
Orégano		0,00 mm
Streptomycin		17 mm
Tomillo + orégano		Ausencia de efecto combinado

Los datos obtenidos de la tabla N° 18 indican que el aceite esencial de orégano no presentó actividad antimicrobiana frente a *Salmonella spp.* Se ensayó un efecto combinado entre los dos aceites al 100 % de concentración y se considera en este caso el halo de inhibición que presentó antes el aceite esencial de orégano. El aceite esencial de tomillo presentó un halo de inhibición de 12 mm se puede observar que ha disminuido la actividad antimicrobiana del aceite de tomillo esto puede deberse a que haya afectado el tiempo de almacenamiento del aceite y las condiciones climáticas pero no se descarta la actividad antimicrobiana del aceite. El ensayo del efecto combinado tiene como fin determinar efectos de sinergismo, antagonismo o de indiferencia entre los compuestos responsables de la actividad antibacteriana. Al determinar el efecto combinado de los aceites esenciales de tomillo y orégano se encontró que el orégano en presencia del

tomillo pierde eficacia pues no presenta halo de inhibición; mientras que en el screening presentaba un halo de inhibición de 10 mm, igual ocurre en el caso del tomillo que formó un halo de inhibición de 12mm. menor a los 18 mm. obtenidos en el screening. (VER TABLA N° 7 y 8), por consiguiente no se observó el desarrollo de un efecto combinado de estos aceites.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris L.*) en concentración total sin diluir, presentó un efecto antibacteriano sobre *Salmonella* spp. y frente a bacterias proteolíticas en pechuga de pollo, en otras dosis probadas no inhibió a *Salmonella* spp.

2.- El aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*) presentó un efecto antibacteriano mínimo sobre *Salmonella* spp. y fué inactivo para proteolíticos en el ensayo de screening y para concentraciones entre 10.000 a 1.250 mg/mL. Factores intrínsecos y externos tales como la variedad vegetal, el tipo de suelo, la temperatura ambiental, su cultivo, su cosecha y el método de extracción, pueden afectar la composición química de los aceites esenciales. De otro lado la actividad antimicrobiana estará condicionada por la composición química, la pureza, la concentración adecuada del aceite para producir efecto biológico, se requiere además que estos productos sean biodisponibles para ser considerado aditivos en la alimentación.

3.- A diferencia del aceite de orégano, el aceite de tomillo fue activo “*in vitro*” contra *Salmonella* spp. y proteolíticos al emplear el producto sin diluir. *Salmonella* spp. (10^3 UFC/mL) puede morir con 1.56% de aceite de tomillo.

4.- El estudio sobre tiempo de muerte evidencia adecuada actividad bactericida del aceite de tomillo contra *Salmonella* spp. pues se determinó una disminución poblacional de 1 a 5 unidades logarítmicas; empleando concentraciones entre 1.56% a 12.5% de aceite, con un tiempo mínimo de actuación de 4 horas.

5.- El tratamiento “*in situ*” del aceite de tomillo presentó una reducción de carga microbiana de *Salmonella* spp. y bacterias proteolíticas, se utilizó una concentración de 15.6% a una temperatura de refrigeración de 4 ° C lo que determinó la eficacia del aceite de tomillo indicando el uso de este producto como bioconservador en pechuga de pollo, se considera que a mayor concentración del aceite es mayor la reducción de las bacterias.

CAPÍTULO V

RECOMENDACIONES

1. Determinar si los aceites esenciales de orégano y tomillo a concentraciones más altas de las ensayadas afectan a las características sensoriales de la pechuga de pollo.
2. Determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de Orégano y Tomillo a diferentes concentraciones y con diferentes cepas causantes de la contaminación y pudrición de la pechuga de pollo.
3. Evaluar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de Orégano y Tomillo para determinar su poder conservante en otros cortes de pollo.
4. Determinar la rentabilidad del uso de los aceites esenciales de Orégano y Tomillo para combatir la contaminación de la carne.
5. Se recomienda estudiar en un futuro otras aplicaciones antimicrobianas el uso de los extractos del Orégano y Tomillo, así como las ventajas y desventajas económicas del uso en nuestro país como conservante natural en carnes frescas.
6. Obtener los aceites esenciales por diferentes métodos de extracción y purificación para optimizar la concentración de compuestos activos y metabolitos responsables de la actividad antibacteriana, conocer su lugar de origen, su cultivo, la cosecha, la extracción y su purificación para tener buenos resultados para la aplicación como bioconservadores.

CAPÍTULO VI

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de orégano y tomillo como conservantes naturales, con el propósito de reducir la carga microbiana durante el almacenamiento de la pechuga de pollo. Los métodos utilizados en el ensayo fueron inductivo-deductivos y científico-experimentales. Los microorganismos de ensayo fueron *Samonella* spp y microorganismos *proteolíticos*; se aplicaron pruebas de Screening, Concentración Mínima Bactericida “*in vivo*” y tiempo de muerte “*in vitro*” e “*in situ*”. El Screening determinó actividad antimicrobiana con concentraciones al 100 % sin diluir. La concentración mínima bactericida frente a *Salmonella* spp fue de 1.56%.

In vitro, el tratamiento más efectivo frente *Salmonella* spp. fue obtenido con el aceite esencial de tomillo en concentración total mientras que el aceite esencial de orégano presentó una inhibición mínima. En el tiempo de muerte se determinó la eficacia de la actividad antibacteriana del aceite de tomillo ya que presentó una reducción significativa de *Salmonella* spp. Los ensayos “*in situ*” mostraron que el aceite esencial de tomillo en el almacenamiento de la pechuga de pollo a temperatura de refrigeración (4°C) hasta 48 horas, fue el tratamiento más efectivo para reducir la contaminación bacteriana y la pérdida de las características de calidad de la carne, logrando dar un producto de mejor calidad y libre de contaminación. Por lo que se recomienda el uso de los aceites esenciales en carne de pollo como una alternativa natural a los antibacterianos sintéticos para controlar la contaminación de la misma.

SUMMARY

This investigation deals with the anti-bacterial effect of essential oils of wild marjoram and thyme as natural preservers, to reduce the microbial load during the chicken breast storage. The methods used in the essay were inductive-deductive and scientific-experimental. The essay microorganisms were *Salmonella* spp. and proteolytic ones; Screening, Minimum Bactericidal Concentration *in vivo* and death time *in vitro* and *in situ* test were applied. The Screening determined the anti-microbial activity with 100% concentrations without diluting. The minimum bactericidal concentration against the *Salmonella* spp. was 1.56%. the most effective *in vitro* treatment against *Salmonella* spp. was obtained with thyme essential oil in total concentration while the wild marjoram essential oil presented a minimum inhibition. In the death time, the efficacy of the anti-bacterial activity of the thyme oil was determined as it presented a significant reduction of the *Salmonella* spp. the *in situ* essays showed that the thyme essential oil in the chicken breast storage at (4°C) refrigeration temperature up to 48 hours, was the most effective treatment to reduce the bacterial contamination and the loss of meat quality characteristics, attaining a better-quality and contamination-free product. This is why it is recommended to use the thyme oil in the chicken meat as a natural alternative of the synthetic anti-bacterial products to control its contamination.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

1. **AGRIOS, G.N.** Fitopatología. México, Limusa, pp 83. Febrero 1999
2. **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.).**
Oficial Methods of Analysis. 16a. ed. Washington. D.C, A.O.A.C., 2000.
pp. 376 – 384.
3. **BARTELS, H.** Inspección Veterinaria de la Carne. Zaragoza-España. ed.
Acribia, pp 425-426. Marzo 1980
4. **BOQUET, E.,** y otros., Manual de técnicas de Microbiología Clínica., 3a.
ed., Zaragoza-España., pp. 225. Mayo 1995
5. **BRUNETON, J.** Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales. 2da. ed.
Zaragoza-España: Acribia., pp 331, 533. Octubre 1997
6. **BURBANO, J.** Plantas Medicinales, Hierbas y Vitaminas., 3a. ed.,
Guayaquil- Ecuador., pp. 41. Septiembre 1998
7. **CABALLERO, A.** Protección Sanitaria de Alimentos., S. ed., Riobamba-
Ecuador., Pp. 60,63. Enero 1999
8. **DE LAS CUEVAS, V.** APPCC BASICO: Funcionamiento de un Sistema
de Peligros y Puntos de Control., Madrid - España., pp. 4,5. Enero 2000

9. **DOMÍNGUEZ X.** Métodos de Investigación Fitoquímica., Chiros- México., pp. 229. Abril 1997
10. **FARREST. J., y OTROS.** Fundamentos de la Ciencia de la Carne. Zaragoza-España., ed. Acribia 1975, pp 197-198. Junio 1999
11. **FRAZIER, W y WESTHOFF, D.** Microbiología de los alimentos. 3era ed. Zaragoza-España. ed Acribia, pp 159-163, 213-215, 266-272. Marzo 1985
12. **GALLEGOS J.** Manual de Prácticas de Microbiología de Alimentos: Texto Básico . Riobamba., 2003. pp 98- 99. 2003
13. **GENDERS. R., NILEA S., HAZELTON P.** Guia Práctica Ilustrada Hierbas y Especies. Barcelona. ed Blume, pp 69. Abril 1983
14. **GROSSKLAUS. D.** Inspección Sanitaria de la Carne de Ave. Zaragoza-España. Ed. Acribia, pp 22. Septiembre 1979
15. **GRUPO LATINO.** Ciencia, Tecnología e Industria de Alimentos. Bogota-Colombia., ed. Latino. pp 485-486, 503-504. Mayo 2008
16. **HERNANDEZ, M.** Cultivos de Exportación No Tradicionales. Barcelona, ed. Temistocles. 80p. Enero 1995
17. **Homero Herrera;** (información personal; supervisor de ventas en (DESPENSAS AKI)
18. **JAMES, J.,** Microbiología Moderna de los Alimentos., 2 a. ed., Zaragoza-España., Pp. 138,139. Octubre 1997
19. **JÁTIVA, C.,** Texto Básico de Fitoquímica., Riobamba- Ecuador., pp. 16,17. 2000
20. **MULLER, G.** Microbiología de los Alimentos Vegetales. Zaragoza – España.,ed. Acribia. pp. 151. Febrero 1981.

- 21. ARASHISAR. S,** y otros., Effects of modied atmosphere and vacuum packaying on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchusi mikiss*). International Journal of Food Microbiology., Vol. 97., 2004., Pp. 209- 214
- 22. AKGUL, A. y KIVANC, M.** Inhibitory Effect of Six Turkish Thymelike Spices on Some Common Food-Borne Bacteria.Molecular Nutrition & Food, octubre 2006, vol. 32, n°001, pp. 201-203.
- 23. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.).** Oficial Methods of Analysis. 16a. Ed. Washington. D.C,A.O.A.C., 2000. pp. 376 – 384.
- 24. BARRERA, L.; et al.**In VitroAntifungal Activity of Essnetial Oils and Their Compounds on Mycelial Growth of *Fusarium Oxisporum* sp.Plant Patology Journal, diciembre 2009,vol.8,n°3, pp. 17-21.
- 25. BASSOLE IHN, Y OTROS.** Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. Phytochem. 2003; 62(2): 209-212.
- 26. BAKKALIA F.** y otros., Biological effects of essencial oils., Food and Chemical Toxicology., Vol. 46., 2008., Pp. 446-475
- 27. BURT, S.,** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology., Vol. 2 No 94., 2004., Pp. 223-253.
- 28. BURT SA, REINDERS RD,**Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Lett Applied Microbiol. 2003; 36: 162-167.
- 29. COSENTINO S, y OTROS.** *In-vitro* antimicrobial activity and composition of Sardinian Thymus essential oils. Lett. Appl. Microbiol. 1999; 29: 130-135.
- 30. BLOEMBERG, GV., Lugtenberg and Kolter.,** Department of Microbiology., and Molecular Genetics, Harvard Medical School., Vol. 63. No. 11., 1997.Pp. 4543-4551

- 31. CHYTIRI S.** y otros., Microbiology, chemical and sensory assensment of whole and letedaqua cultured rain bown trout. Food Microbiology., Vol. 21., 2004., Pp 157-165
- 32. ELGAYYARI M, DRAUGHON F., GOLDEN DA, MOUNT JR.** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food Protect. 2001; 64 (7): 1019-1024.
- 33. FAN, W.,** y otros., The use of tea polyphenol dip to extend the sehelf life silves corp during storage in ice. Food chemisty.,Vol. 6., 2008.,Pp 108, 148- 153
- 34. GUTIERREZ, J., BARRY, R., BOUKE, P.,** Antimicrobial Activity of Plant Essencial Oils using Food model media: Efficacy synergistic potencial and interaction with food components. International Journal of food Microbiology., Vol. 26., 2009., Pp. 142-150
- 35. HAMMER KA, CARSON CF, RILEY TV.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 1999; 86 (6): 985-990.
- 36. HE L, MO H, HADISUSILO S, QURESHI AA, ELSONI CE.** Isoprenoids suppress the growth of Murine B16 melanoma *in vitro* and *in vivo*. Biochemical and molecular roles of nutrients. Am. Soc. Nutr. Sci. 1997; 127(5): 668-674.
- 37. HOLLEY, R.,** Improvement in Shelf-Life and Safety of Perishable foods by Plant Essential Oils and Smoke Antimicrobials. International Journal – rewie Food Microbiology., No. 22., 2005., Pp. 273–292
- 38. ISENBERG, H.,** Clinical Microbiology Procedures Handbook. Guideto Regulatory Requirementsa Special Supplementfor Usersor the Clinica

Microbiology Procedures Handbook., WASHINGTON, D.C. USA., Vol. 1.,
1995. Pp. 5.16.1 a 5.20.20

- 39. NIMSHA, S. WEERAKKODY, A.,** In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria School of Land, Crop and Food Science, University of Queensland, St. Lucia 4072, Australia. *Internacional Journal of Food Microbiology.*, No. 22., Pp 1410-1414
- 40. KANAZAWA K, y OTROS.,** Specific desmutagens (antimutagens) in oregano against a dietary carcinogen, Trp-P-2, are galangin and quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 404-409.
- 41. KUBECZKA K. H.** Essential Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 nmr Spectroscopy. 2a. Ed. Nueva York, John Wiley, 2002. 461p.
- 42. LOZA-TAVERA H.** Monoterpenes in essential Oils. Biosíntesis and properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 464: 49-62.
- 43. TAJKARIMI, M., IBRAHIM, D., CLIVER, B.,** Food Microbiology and Biotechnology Laboratory., Carolina-Estados Unidos., 2010., Pp. 27411-1064
- 44. TAYLOR, S., SUMMER, S.,** Determination of histamine, Putrescine and cadaverine. Seafood Quality Determination. Proceeding of an International Symposium., Santa Lucia Australia., 1986., Pp. 253-255.
- 45. TURGIS, M., HAN, J., CAILLET, S., & LACROIX, M.,** Antimicrobial Activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control* Vol. 5 No. 20., 2009., Pp. 1073–1079.
- 46. WILLEY J, SHERWOOD, L., WOOLVERTON, C.,** Antimicrobial Chemotherapy in Prescott, Harley, and Klein's. 2008.

Microbiology.McGraw-Hill International Edition, Seventh Ed 1997., Pp:
837,840

47. ACEITE DE ORÉGANO

<http://www.oxypowder.net/salud-natural/aceite-oregano.html>

2010/01/25

**48. ACEITES ESENCIALES: BIOCONSERVADORES CON ALTO
POTENCIAL EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

http://www.alfaeditores.com/web/index.php?option=com_content&task=view&id=2598&Itemid=66

2010/06/24

49. ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO

<http://www.otramedicina.com/aceite-esencial-de-tomillo/>

2010/07/01

50. ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO

<http://www.cepvi.com/medicina/aromaterapia/tomillo.shtml>

2009/06/10

**51. ALIMENTOS SU CONSERVACION, ALMACENAMIENTO Y
DISTRIBUCION**

<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/revistas/index/assoc/HASH6c0e/96d6d631.dir/doc.pdf>

2010/05/03

52. Carne de pollo (I): su composición nutricional

<http://www.vitonica.com/proteinas/carne-de-pollo-i-su-composicion-nutricional>

2008/10/27

53. CARNES Y SUS DERIVADOS

<http://www.monografias.com/trabajos15/contaminacion-carne/contaminacion-carne.shtml>

2008/04/03

**54. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* (ORÉGANO).**

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2001000100004

2001/01/04

55. EL CULTIVO DEL TOMILLO

<http://www.infoagro.com/aromaticas/tomillo.htm>

2006/10/13

56. EL ORÉGANO: PROPIEDADES; COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE SUS COMPONENTES

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222004000100015&script=sci_arttext

2010/09/28

57. EL TOMILLO

<http://www.notasverdes.com/blog/el-tomillo/>

2010/02/01

58. IMPORTANCIA DE LAS PROTEINAS

<http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/Vejez/proteinas.htm>

2009/05/21

59. INTRODUCCIÓN A LA ESTADÍSTICA

www.aprendeenlinea.udea.edu.com/

2010/10/01

60. LA CARNE DE POLLO

http://213.134.46.62/pesalud/Main;jsessionid=F2A08AF128A1077101ED0F1CC8A18980?ISUM_ID=Groups&ISUM_SCR=serviceScr&ISUM_CIPH=NO4nynRwy0Mcr1u81ZzTGYZh1kYA1hS3HNzAxNNzfdE

2011/01/09

61. LA CARNE DE POLLO

<http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/guia-alimentos/carnes-huevos-y-derivados/35415.php>

2001/10/15

62. LA INDUSTRIA AVÍCOLA ECUATORIANA

http://www.engormix.com/industria_avicola_ecuatoriana_s_articulos_2606_AVG.htm

2009/08/14

63. LOS ADITIVOS CONSERVANTES

http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MA015_CONSERVANTES_F.pdf

2010/10/20

64. LOS ADITIVOS CONSERVANTES

<http://www.suite101.net/content/aditivos-colorantes-y-conservantes-en-los-alimentos-a17333>

2010/05/19

65. LOS CONSERVANTES EN LOS ALIMENTOS

<http://www.alimentacionsana.com.ar/Portal%20nuevo/actualizaciones/conservantes.htm>

2008/06/17

66. Manual de procedimientos para la caracterización de Salmonella

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-LevelI/Manual_procedimientos_Salmonella.pdf

2001/08/23

67. Mr. POLLO

http://macrovisionmedia.com/superbrandsecuador/pdf_casos/mrpollo.pdf

2008/08/10

68. ORÉGANO

<http://www.oeidrus-tamaulipas.gob.mx/oeidrus/files/Oregano.htm>

2008/03/05

69. *Origanum vulgare L.*

<http://www.asturnatura.com/especie/origanum-vulgare.html>

2007/02/26

70. PROPIEDADES DEL ACEITE DE ORÉGANO

<http://propiedadesdelaceite.jaimaalkauzar.es/propiedades-del-aceite-de-oregano.html>

2007/05/31

71. PROPIEDADES DEL ORÉGANO

<http://www.botanical-online.com/medicinalsoreganocastella.htm>

2006/10/15

72. SEGURIDAD ALIMENTICIA

<http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/pollo2.htm>

2009/07/03

73. TOMILLO

http://www.bedri.es/Libreta_de_apuntes/T/TO/Tomillo.htm

2010/06/03

74. TOMILLO: PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS E INDICACIONES TERAPÉUTICAS

<http://www.macroestetica.com/articulos/tomillo-propiedades-farmacologicas-e-indicaciones-terapeutica>

2009/04/23

75. TOMILLO, TREMONCILLO

<http://fichas.infojardin.com/condimentos/thymus-vulgaris-tomillo-tremoncillo.htm>

2011/08/22

76. TOXICIDAD DEL TOMILLO

<http://www.plantasparacurar.com/toxicidad-del-tomillo/s/>

2010/05/16

**77. USOS MEDICINALES Y APLICACIONES CURATIVAS DEL
ORÉGANO**

<http://www.plantasparacurar.com/toxicidad-del-oregano/>

2010/01/13

Olor	Específico. Excepcional mnte agradable, pronuncia, muy bueno, homogéneo en todo el corte.	Específico. Agradable. Bueno. Completamente. Intenso.	Específico. Agradable. Poco Intenso.	Levemente perludicada, normal. Mas intenso en algunas zonas.	Atípico (a cecinas en genera). Dano del olor propio aceptable.	Atípico. Insípido. Algo danado a quemado, anejo, rancio, penetrante, intenso, picante, a humo, amoniacal.	No típico. Completamente disminuido. Claramente alterado, rancio, fermentado.	Muy alterado. Desagradable. Putrefacto. A fermentado	deteriorado. Repugnante
Textura	Excepcional mente buena. Tierna jugosa. Firme homogénea en el corte	Muy buena. Tierna. Firme. Agradable. jugosa	Buena. En general tierna. No tan homogénea. Jugosidad variada.	Normal. Falta homogeneidad . Agradable. Leve deterioro: algo seca, algo fibrosa, algo blanda, algo dura, algunos poros pequeñas, nervios, cartílagos, tendones	No homogénea. Ligeramente elástica, seca.regular cantidad de nervios, trozos de carilagos y tendones	Claramente alterada. Seca. Fibrosa. Desuniforme. Plástica en algunas zonas. Abundantes cartílagos, aponeurosis, tendones, nervios	Muy desuniforme. Muy blanda. Muy dura. Muy seca. Muy fibrosa	Desagradable deshecha o intensamente dura, reseca, muy fibrosa	Repugnante

ANEXO N° 2: CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS ENSAYO DE ÁCIDO SULFHÍDRICO NTE INEN 790

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece el método para efectuar el ensayo de ácido sulfhídrico en carne y productos cárnicos.

2. ALCANCE

2.1 Esta norma permite establecer cualitativamente la presencia o ausencia de ácido sulfhídrico en la muestra.

3. RESUMEN

3.1 Detectar la presencia de ácido sulfhídrico por reacción con plumbito de sodio o con acetato de plomo.

4. INSTRUMENTAL

4.1 **Picadora mecánica de carne (molido).** Tipo de laboratorio provisto de una placa criba con orificios de diámetro máximo de 4 mm, u otro equipo que produzca una pasta homogénea.

4.2 **Matraz Erlenmeyer** de 125 cm³

4.3 **Papel filtro.**

4.4 **Baño de agua**

4.5 **Balanza analítica**, sensible al 0,1 mg

5. REACTIVOS

5.1 **Solución saturada de acetato de plomo**

5.2 **Solución al 10% de hidróxido de sodio**

5.3 **Solución de plumbito de sodio.** Preparación con 50 cm³ de la solución saturada de acetato de plomo, añadiendo la solución al 10% de hidróxido de sodio hasta disolver el precipitado.

5.4 Solución al 5% de acetato de plomo

5.5 Acido acético glacial

5.6 Solución reactivo de acetato de plomo. Preparar mezclando 100 cm de la solución al 5% de acetato de plomo con 1 cm de ácido acético glacial.

5.7 Solución de sulfuro de sodio

6. PREPARACION DE LA MUESTRA

6.1 La preparación de la muestra se realizará de acuerdo al Anexo A, de la Norma INEN 776. Carne y productos cárnicos. Muestreo.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 El ensayo debe efectuarse, por lo menos, por triplicado sobre la misma muestra preparada.

7.2 Colocar 10 g de muestra preparada, pesados con aproximación al 0,1 g, en un matraz Erlenmeyer de 125 cm³.

7.3 Cerrar el matraz Erlenmeyer con un pedazo doble de papel filtro, previamente embebido en la solución de plumbito de sodio o en la solución reactivo de acetato de plomo.

7.4 Colocar el matraz Erlenmeyer sobre el baño de agua, de modo que el fondo de éste quede suspendido a 3 cm del nivel de agua; calentar durante 10 minutos.

7.5 Observar la formación de una mancha negra sobre el papel filtro.

7.6 Como referencia efectuar las operaciones indicadas desde 7.2 hasta 7.5, utilizando 0,1 mg de sulfuro de sodio en medio ácido, en lugar de la muestra.

7.7 Comprobar las manchas obtenidas en los ensayos con muestra y con sulfuro de sodio; si la mancha correspondiente a la muestra, denota una reacción menor a la de la referencia (sulfuro de sodio), se considerará el producto en buen estado de conservación.

8. INFORME DE RESULTADOS

8.1 En base a la comparación efectuada según 7.7, debe indicarse si la reacción es positiva o negativa.

8.2 Deben indicarse el método usado y cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

8.3 Deben incluirse todos los detalles para la completa identificación de la muestra.

amoníaco. Oficina Sanitaria Panamericana. Washington, 1968.

APENDICE Z

Z.1 NORMAS A CONSULTAR

INEN 776 Carne y productos cárnicos. Muestreo.

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma Peruana ITINTEC 101.023. *Carne y Productos Cárnicos. Detección del estado de conservación. Acido Sulfidrico*. Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas. Lima, 1980.

Norma Sanitaria Panamericana OFSANPAN-IALUTZ 013-01-00. *Reacción de Eber: gas sulfhídrico y*

ANEXO N° 3 : CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS DETERMINACIÓN DE pH NTE INEN 783

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece el método para determinar el pH en carne y productos cárnicos.

2. ALCANCE

2.1 Se establecen dos procedimientos, uno para productos que pueden ser homogenizados y otro para productos que no pueden ser homogenizados.

3. TERMINOLOGIA

3.1 **pH de la carne y productos cárnicos.** Es el resultado de las mediciones realizadas de acuerdo al procedimiento descrito en esta norma (ver nota 1).

4. RESUMEN

4.1 Se mide la diferencia de potencial entre un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia, que son colocados en la muestra de carne o del producto cárnico a analizar.

5. INSTRUMENTAL

5.1 **Potenciómetro**, con electrodos de vidrio (o pincha carne), con precisión de $\pm 0,05$ unidades de pH.

5.1.1 *Electrodo de vidrio.* Se pueden usar electrodos de vidrio de diversas formas geométricas, por ejemplo: esféricos, cónicos, cilíndricos o de forma de aguja.

5.1.2 *Electrodo de referencia.* Por ejemplo electrodo de calomel o electrodo de cloruro de plata conteniendo una solución saturada de cloruro de potasio.

5.2 **Picadora mecánica de carne (molino).** Tipo de laboratorio, provisto de una placa cribada con orificios de un diámetro máximo de 4 mm, u otro equipo que produzca una pasta homogénea.

5.3 **Balanza analítica**, sensible a 0,1 g.

NOTA 1. Debido a que el contenido electrolítico de la fase acuosa de muchos productos cárnicos es relativamente alto y al hecho de que el potenciómetro es calibrado con soluciones amortiguadoras de 1 contenido electrolítico bajo, en general, el valor medido no

5.4 Vasos de precipitación, de 250 cm³

5.5 Vasos de precipitación, de 100 cm³

5.6 Papel absorbente.

6. REACTIVOS

6.1 Líquidos para la limpieza de los electrodos.

6.1.1 Etanol, al 95% (V/V).

6.1.2 Eter dietílico, saturado con agua.

6.1.3 Agua destilada, o de pureza equivalente.

6.2 Soluciones para calibración del potenciómetro.

6.2.1 Solución amortiguadora de pH 4,00 a 20°C. Pesar 10,211 g de biftalato ácido de potasio, con aproximación a 1 mg, y disolver en agua destilada, llevando a 1 000 cm³. El biftalato ácido de potasio debe ser previamente secado a 125°C, hasta masa constante. (El pH de esta solución es 4,00 a 10°C y 4,01 a 30°C).

6.2.2 Solución amortiguadora de pH 5,45 a 20°C. Mezclar 500 cm³ de solución acuosa 0,2N de ácido cítrico con 375 cm³ de solución acuosa 0,2N de hidróxido de sodio. (El pH de esta solución es 5,42 a 10°C y 5,48 a 30°C).

6.2.3 Solución de pH 6,88 a 20°C. Pesar 3,402 g de ortofosfato diácido de potasio y 3,549 g de ortofosfato ácido de sodio, pesados con aproximación a 1 mg, y disolver en agua destilada, llevando a 1 000 cm³. (El pH de esta solución es de 6,92 a 10°C y 6,85 a 30°C).

6.2.4 Solución saturada de cloruro de potasio.

6.2.5 Solución reguladora a pH 7.

7. CALIBRACIÓN DEL APARATO

7.1 Limpiar los electrodos del potenciómetro frotándoles con trozos de algodón humedecido con éter dietílico y etanol, luego lavarlos con agua destilada.

7.2 Calibrar el potenciómetro con una de las soluciones indicadas en 6.2, procurando hacerlo con la solución cuyo pH sea más cercano al de la muestra y trabajando a 20 ± 2°C (o corrigiendo la temperatura mediante tablas).

puede ser identificado con el valor teórico del pH.

8. PREPARACION DE LA MUESTRA

8.1 La preparación de la muestra se realizará de acuerdo a lo indicado en la norma INEN 776. *Carne y productos cárnicos. Muestreo.*

9. PROCEDIMIENTO

9.1 La determinación debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra, preparada.

9.2 Pesar aproximadamente 10g de carne o productos cárnicos preparado y colocar en el vaso de precipitación de 250 cm³

9.3 Agregar 90 cm³ de agua destilada. Agitar y dejar en maceración durante 1 hora.

9.4 Introducir los electrodos del potenciómetro (previamente calibrado) en la muestra, que debe encontrarse a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y efectuar la lectura respectiva.

9.4.1 Si no se trabaja a 20°C , debe hacerse la corrección de temperatura correspondiente.

9.5 En caso de trabajar con pincha carne, efectuar dos mediciones adicionales sucesivas en distintos puntos de la muestra, para obtener un valor promedio.

9.6 Cuando se trate de carnes en canales o en piezas, la lectura se realizará directamente.

9.7 Caso de no disponer de potenciómetro, se usarán soluciones múltiples.

9.8 Una vez concluido el ensayo, limpiar los electrodos y colocarlos en un vaso de precipitación de 100 cm³ que contenga agua destilada.

9.9 Cuando el ensayo ha concluido, limpiar bien los electrodos y colocarlos en un vaso de precipitación de 100 cm³ que contenga agua destilada.

10. ERRORES DE METODO

10.1 La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder de 0,1 unidades de pH; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

11. INFORME DE RESULTADOS

11.1 Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los resultados de la determinación.

11.2 En el informe de resultados, debe indicarse el método usado y el resultado obtenido. Debe mencionarse, además, cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

11.3 Debe incluirse todos los detalles para la completa identificación de la muestra.

APENDICE Z

Z.1 NORMAS A CONSULTAR

INEN 776. *Carne y productos cárnicos. Muestreo.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Manual de laboratorio de la Industria Cárnica. CITECA. *pH determinación potenciométrica.* Centro de Investigación y Tecnología de Carnes, INTI, Buenos Aires, 1982.

Norma Cubana NC 79-06. *Productos cárnicos. Carne y productos cárnicos. Métodos de ensayo. Determinación del índice de pH. Método potenciométrico.* Comité Estatal de Normalización. Nivel Central. Habana, 1982.

Norma Centro Americana ICAITI 34125 h 8. *Carne y productos cárnicos. Medición del pH.* Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. Guatemala, 1977.

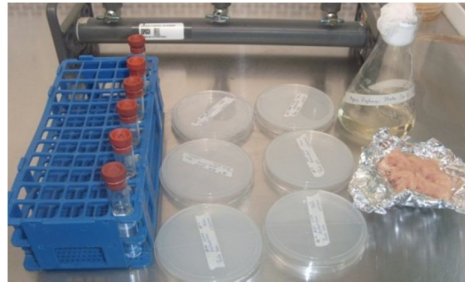
Proyecto de Norma COPANT 7:13-008. *Carne y sus productos. Medición del pH. Método de referencia.* Comisión Panamericana de Normas Técnicas. Buenos Aires, 1976.

Norma Francesa NF V 04-408. *Viandes et produits a base de viande. Mesurage du pH.* Association de Normalisation (AFNO R). París. 1964.

ANEXO N° 4: *Salmonella* spp. en PCA



ANEXO N° 5: SIEMBRA DE BACTERIAS PROTEOLITICAS EN AGAR LECHE



ANEXO N° 6: BACTERIAS PROTEOLITICAS EN CALDO LECHE



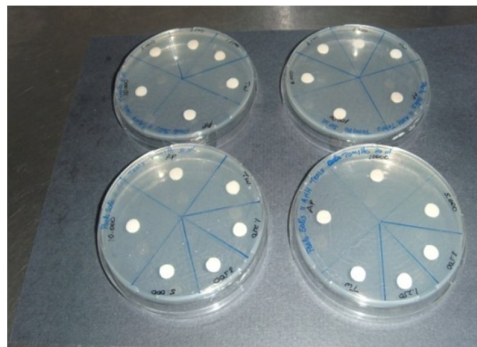
ANEXO N° 7: BACTERIAS PROTEOLITICAS EN AGAR LECHE



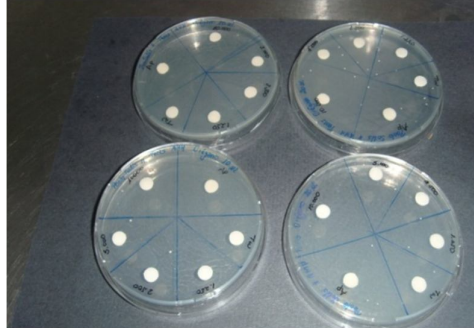
ANEXO 8: BANCO DE CEPAS DE *Salmonella* spp. EN AGAR SOYA TRIPTICASA PARA CONSERVACIÓN DE LA CEPA



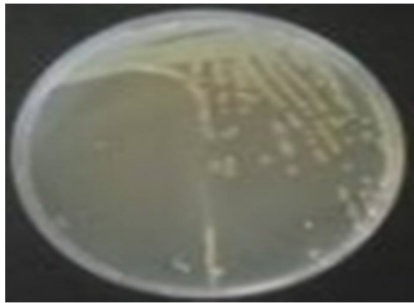
ANEXO 9: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.) SOBRE LAS BACTERIAS AISLADAS CAUSANTES DE LA DEGRADACIÓN DE LA PECHUGA DE POLLO.



ANEXO 10: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*) SOBRE LAS BACTERIAS AISLADAS CAUSANTES DE LA DEGRADACIÓN DE LA PECHUGA DE POLLO.



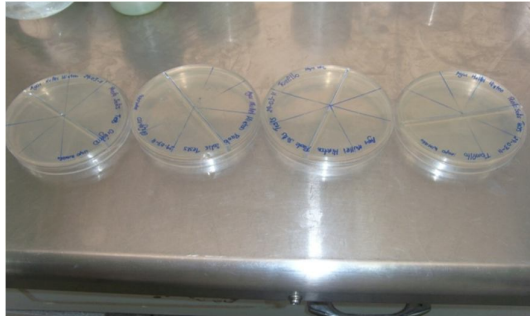
ANEXO 11: *Salmonella* spp EN AGAR MULLER HINTON PARA CONSERVACIÓN DE LA CEPA



ANEXO 12: MORFOLOGIA DE *Salmonella* spp.



ANEXO 13: SIEMBRA DE *Salmonella* spp. EN AGAR MULLER HINTON PARA REALIZAR EL SCREENING.



ANEXO N° 14: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA



ANEXO 15: PREPARACIÓN DEL MEDIO Müller Hinton



**ANEXO 16: PURIFICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO CON
SULFATO DE SODIO HIDRATADO**



**ANEXO 17: PURIFICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO CON
SULFATO DE SODIO HIDRATADO**



ANEXO 18: EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO



ANEXO 19: MUESTRAS DE PECHUGA DE POLLO COCINADAS PARA ANÁLISIS DE TIEMPO DE MUERTE



ANEXO 20: ENSAYO DE ÁCIDO SULFHDIRICO



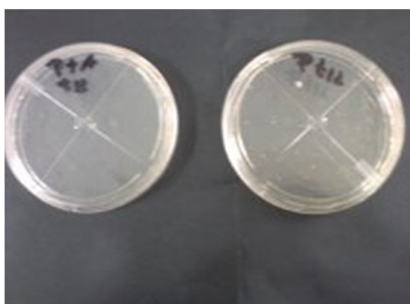
ANEXO 21: DETERMINACIÓN DE pH



ANEXO 22: TIEMPO DE MUERTE DE *Salmonella* spp. POR EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)



ANEXO 23: TIEMPO DE MUERTE DE BACTERIA PROTEOLITICA POR EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)



ANEXO 24: EFECTO COMBINADO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.) SOBRE *Salmonella* spp.



ANEXO N° 25 RESULTADOS DE TRATAMIENTOS UTILIZADOS “IN VIVO” PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*) FRENTE A *Salmonella* spp.

TIEMPO	Repeticiones			Media	Desvest
	I	II	III		
t0	29,00	38,00	37,00	34,67	4,93
t6	30,00	15,00	26,00	23,67	7,77
t12	43,00	22,00	41,00	35,33	11,59
t18	46,00	55,00	35,00	45,33	10,02
t24	20,00	52,00	43,00	38,33	16,50
t48	74,00	50,00	60,00	61,33	12,06

ANEXO N° 26 RESULTADO DE TRATAMIENTOS UTILIZADOS “IN VIVO” PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*) FRENTE A *Proteolíticos*.

TIEMPO	Repeticiones			Media	Desvest
	I	II	III		
t0	174,00	182,00	175,00	177,00	4,36
t6	176,00	107,00	171,00	151,33	38,48
t12	199,00	124,00	197,00	173,33	42,74
t18	121,00	158,00	120,00	133,00	21,66
t24	131,00	210,00	199,00	180,00	42,79
t48	310,00	215,00	298,00	274,33	51,73