

**EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DEL TOMILLO (*Thymus vulgaris*), SOBRE  
EL CRECIMIENTO DE *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Paratyphi EN  
SUPERFICIES DE CARNE CRUDA BOVINA REFRIGERADA**

**KAREN PIEDAD MARTÍNEZ MARCIALES**  
Microbióloga con Énfasis en Alimentos  
Especialista en Protección de alimentos

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**  
**PAMPLONA, 2017.**

**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DEL TOMILLO (*Thymus vulgaris*), SOBRE  
EL CRECIMIENTO DE *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Paratyphi EN  
SUPERFICIES DE CARNE CRUDA BOVINA REFRIGERADA**

**KAREN PIEDAD MARTÍNEZ MARCIALES**

**Tesis de grado para optar al título de Magister en Ciencia y Tecnología de  
Alimentos**

**Director**

**Ph.D. ENRIQUE ALFONSO CABEZA HERRERA**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS  
PAMPLONA, 2017.**

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Pamplona, 2017.

## **DEDICATORIA**

A Dios por permitirme vivir experiencias tan hermosas en mi vida, y dentro de ella mi hermosa familia, a quien dedico este nuevo escalón, y por supuesto resaltar la huella de mi padre amado José Orlando Martínez Cáceres.

A mi madre, hermosa, Carmen Piedad Marciales.

A mis hermanos, Dixon Orlando, y Angie, a mis amados sobrinos: Evolet, Santiago y Adelle, a mis cuñados Erika y por supuesto mi apreciado Daniel.

No podían quedarse lo más preciado, lo que hace parte de mis ser, mis amados, hijos, Miguel y Gabriela, mis tesoros, mi vida, mis amores.

Y por supuesto, todos esos amigos y amigas, por los cuales sacrifique tiempo, compañía, para la dedicación a este trabajo de investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Ph.D. Enrique A. Cabeza Herrera, por su valioso apoyo y acompañamiento de principio a fin en el desarrollo de esta investigación.

A la Universidad de Pamplona, sede Villa del Rosario, y en su nombre a Wilson Moyano, Oscar, Claudia Ivonne Arambula , por su apoyo en la etapa de inicio de extracción y obtención del aceite esencial.

A la UDES, Sede Cúcuta, por sus aportes en equipos y algunos materiales.

A Microlab del Norte, por el apoyo en el desarrollo de la fase de análisis microbiológicos.

Al Laboratorio de Cromatografía de gases de la UIS, por su aporte en el análisis de los constituyentes de los aceites esenciales empleados.

A mis estudiantes del semillero de investigación Orugas, quienes de una u otra manera me han dado el entusiasmo y la energía para dar por hecho este nuevo paso de mi vida.

## RESUMEN

Los aceites esenciales (AE) son en su mayoría compuestos terpénicos y fenólicos, que se almacenan en tejidos secretores de los órganos vegetales aromáticos. Se ha demostrado la actividad antibacteriana de diversos aceites esenciales, los cuales pueden contener más de 150 componentes. La acción antimicrobiana del timol y el carvacrol obtenidos del Tomillo (*Thymus vulgaris*), ha sido estudiada con el fin de controlar riesgos de contaminación en productos. La mayoría de trabajos de investigación en esta área solo abordan aspectos de composición química y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, pero muy pocos han explorado el efecto de los AE aplicados directamente como conservantes en alimentos y evaluado su acción conjunta con la temperatura.

En la presente investigación, se evaluó el efecto del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) de dos fuentes: un aceite comercial (AEc) y otro extraído en laboratorio (AEe) sobre el crecimiento de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Paratyphi en superficies de carne cruda bovina refrigerada. Se analizó químicamente la composición de cada AE mediante GC-MS encontrando que en el AEc los compuestos predominantes fueron el Timol, *p*-Cimeno y  $\gamma$ -Terpineno, mientras que en AEe predominó el *p*-Cimeno, *Trans*- $\beta$ -Cariofileno y el Timol. Su actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar, encontrando que los dos AE presentaron efecto significativo en la reducción de *S. Enteritidis* y *S. Paratyphi* en todas las concentraciones evaluadas (10% – 50%).

La concentración mínima inhibitoria mediante el método de macro dilución en caldo demostró que se requiere una mayor concentración tanto de AEc como de AEe para reducir el crecimiento de *S. Enteritidis* que *S. Paratyphi*. Así mismo, se requiere de mayor concentración del AEe que del AEc para reducir las dos especies de salmonelas evaluadas. Estos resultados también fueron observados cuando se aplicó tres concentraciones de AEc y AEe (30%, 40% y 50%) sobre piezas de carne de res previamente inoculadas con  $10^4$  ufc/ml de las dos especies de salmonelas y mantenidas a 0°C, 4°C y 10°C durante 72 horas. Los resultados finales *in vivo* demostraron también que *S. Paratyphi* es más sensible a la acción de los AE que *S. Enteritidis*, pero su sensibilidad parece disminuir cuando incrementa la temperatura, caso contrario

observado con *S. Enteritidis* cuya sensibilidad frente a los AE aumentó con la disminución de la temperatura. Independiente del resultado del efecto de la temperatura, el AEc resultó ser más efectivo que el AEe para la reducción de las dos especies bacterianas mostrando en todos los casos una reducción mayor al 10% para *S. Paratyphi* a la concentración del 50% (v/v) y superior al 7% a las concentraciones de 40 y 30% (v/v), siendo esta variación significativa a un valor  $p < 0,05$ . En contraparte, el AEe presentó en todas las concentraciones una reducción de *S. Paratyphi* cercana al 6% no siendo significativa a un nivel  $p < 0,05$ . En cuanto a *S. Enteritidis*, los porcentajes de reducción se encontraron cercanos a un 4,5% para 0 y 4°C y de 3,5% a 10°C para el AEc y ligeramente superior al 1% para el AEe. A pesar de los porcentajes de reducción bajos y estrechos en algunos casos, la aplicación de AE de tomillo sobre superficies de carne, ayuda a reducir la presencia de *Salmonella* spp. en su superficie, en especial *S. Paratyphi*.

Palabras Clave: Aceites esenciales, Antimicrobianos, *Thymus vulgaris*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Paratyphi , contaminación de productos.

## ABSTRACT

Essential oils (EO) are mostly phenyl-propane and terpene substances, which are stored in secretory tissues of the aromatic plant organs. It has been demonstrated antibacterial activity of various essential oils, which may contain more than 150 components. The antimicrobial action of thymol and carvacrol obtained from thyme (*Thymus vulgaris*), has been studied in order to control risks of contamination products. Most research in this area only address aspects of chemical composition and antimicrobial susceptibility testing but very few have explored the effect of EO applied directly as preservatives in foods and evaluated their joint action with temperature. In the present investigation, the effects of essential oil of thyme from two sources were evaluated: a commercial essential oil (EOc) and other extracted laboratory (EOe) on the growth of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Paratyphi on surfaces of raw meat refrigerated.

The chemical composition of EO were analyzed by GC-MS and found that in EOc the predominant compounds were Thymol, *p*-Cymene and  $\gamma$ -Terpinene, while EOe predominant *p*-Cymene, Trans- $\beta$ -Caryophyllene and Thymol. The antimicrobial activity was evaluated by agar diffusion method, finding that the two EOs showed significant effect in reducing *S. Enteritidis* and *S. Paratyphi* at all concentrations tested (10% - 50%).

The minimum inhibitory concentration by the method of macro broth dilution showed that a higher concentration of EOc and EOe is required as to reduce the growth of *S. Enteritidis* what *S. Paratyphi*. Likewise, it requires more concentration than the EOc to reduce the two species of *Salmonella* evaluated. These results were also observed when three concentrations EOc and EOe (30%, 40% and 50%) on parts beef previously inoculated with  $10^4$  cfu / ml of the two species of *Salmonella* and maintained at 0°C, 4°C and 10°C for 72 hours. Results also showed that in vivo *S. Paratyphi* is more sensitive to the action of EO that *S. Enteritidis*, but its sensitivity seems to decrease with increasing temperature, otherwise observed with *S. Enteritidis* whose sensitivity to EO increased with decreasing the temperature. Independent of the result of effect of temperature, the EOc proved more effective than the reduction EOe two bacterial species in all cases showing a greater than 10% for *S. Paratyphi* concentration of 50% (v/v) and more than

7% at concentrations of 40 and 30% (v/v), this being significant variation at  $p < 0.05$ . In contrast, the EOe presented at all concentrations reduced *S. Paratyphi* close to 6% not being significant at  $< 0.05$ . As for *S. Enteritidis*, the reduction percentages were found near 4.5% for 0 and 4°C and 3.5% at 10°C for EOc and slightly more than 1% for the EOe. Although the percentages of low and narrow in some cases reduction, the application of EO thyme meat surfaces helps reduce the presence of *Salmonella* spp. in its surface, especially *S. Paratyphi*.

Key Words: Essential oils, Antimicrobials, *Thymus vulgaris*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella Paratyphi*, product contamination.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN E INFORMACIÓN GENERAL	1
GENERALIDADES.	1
MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.	4
Carne.	4
Consumo de carne a nivel mundial.	6
Consumo de carne a nivel nacional.	7
Bacterias patógenas presentes en carnes.	8
Generalidades de <i>Salmonella</i> spp.	11
Características de <i>Salmonella</i> spp.	13
Brotos de <i>Salmonella</i> spp. a nivel nacional.	15
Compuestos antimicrobianos como conservantes de alimentos.	18
Antimicrobianos.	18
Efecto de la adición de antimicrobianos.	20
Modo de acción de los agentes antimicrobianos.	20
Antimicrobianos de origen natural.	21
Ácidos orgánicos y ésteres.	21
Especias y hierbas.	22
Aceites esenciales (Aes o EOs).	23
Método de extracción de los aceites esenciales - Destilación de arrastre por vapor de agua.	25
Pruebas de sensibilidad.	25
Difusión en disco.	27
Dilución en caldo o agar.	28
Bioautografía.	29
Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> L.).	30
Taxonomía.	30
Generalidades del tomillo.	31
Composición química del tomillo.	32
Propiedades y usos del tomillo.	32
Estado del arte del uso de tomillo y otras especias como antimicrobianos.	34
OBJETIVOS.	41

Objetivo General.	41
Objetivos Específicos.	41
MATERIALES Y MÉTODOS.	42
Obtención de los Aceites Esenciales (Ae).	42
Aceite comercial.	42
Aceite experimental.	42
Determinación de la Composición Química de los Aceites Esenciales.	45
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana.	46
Microorganismos y condiciones de desarrollo.	47
Determinación de la actividad antibacteriana por método de difusión en disco.	48
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (CMB).	49
Evaluación del Efecto de los Aceites Esenciales y la Temperatura de Refrigeración Sobre <i>Salmonella</i> en Carne.	50
Preparación de la carne.	50
Microorganismos y condiciones de desarrollo.	51
Inoculación de <i>Salmonella</i> spp. en carne de res.	51
Efecto de los aceites esenciales.	52
Análisis microbiológico.	53
Análisis de los datos.	53
Análisis Estadístico.	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	55
Caracterización Físicoquímica de los Aceites Esenciales del Tomillo.	55
Determinación de la Composición Química de los Aceites Esenciales del Tomillo.	56
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana.	65
Pruebas de Difusión en Agar.	66
Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida.	69
Evaluación del Efecto de los Aceites Esenciales y la temperatura de Refrigeración Sobre <i>Salmonella</i> Spp. en Carne Cruda.	71
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	82
Conclusiones	82
Recomendaciones	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	84
ANEXOS	100

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición nutricional de las carnes y otras fuentes de alimentos por 100g.	4
<b>Tabla 2.</b> Panorama del mercado mundial de la carne 2012-2014.	5
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de especies, subespecies y serotipos de <i>Salmonella.</i> , de acuerdo al esquema de Kauffmann-White.	13
<b>Tabla 4.</b> Distribución de aislamientos de <i>Salmonella</i> spp. por procedencia y año de aislamiento, durante el periodo 2008 a 2011.	16
<b>Tabla 5.</b> Algunas especias, hierbas y condimentos evaluados como posibles antimicrobianos.	20
<b>Tabla 6.</b> Posición taxonómica del tomillo vulgar.	30
<b>Tabla 7.</b> Clasificación de la sensibilidad individual de aceites esenciales por el diámetro de zonas de inhibición.	49
<b>Tabla 8.</b> Características físicas, y organolépticas del AEc de tomillo.	55
<b>Tabla 9.</b> Características físicas, y organolépticas del AEe de tomillo.	55
<b>Tabla 10.</b> Identificación presuntiva y cantidad relativa (% abundancia) de los componentes presentes en las muestras de aceites esencial de tomillo comercial y experimental.	57
<b>Tabla 11.</b> Diseño experimental para la determinación de la actividad antimicrobiana del AE de tomillo sobre <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Paratyphi</i> .	66
<b>Tabla 12.</b> Resultados de pruebas de difusión en agar para cada especie de <i>Salmonella</i> estudiada.	67
<b>Tabla 13.</b> CMI de aceite esencial comercial de tomillo sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis.	70
<b>Tabla 14.</b> CMI de aceite esencial experimental de tomillo sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis.	70
<b>Tabla 15.</b> CMI de aceite esencial comercial de tomillo sobre <i>Salmonella</i> Paratyphi.	70
<b>Tabla 16.</b> CMI de aceite esencial experimental de tomillo sobre <i>Salmonella</i> Paratyphi.	70
<b>Tabla 17.</b> Velocidad de muerte de <i>S. Paratyphi</i> para cada tratamiento evaluado en trozos de carne de res refrigerada.	74
<b>Tabla 18.</b> Velocidad de muerte de <i>S. Enteritidis</i> para cada tratamiento evaluado en trozos de carne de res refrigerada.	77

- Tabla 19.** Porcentajes de reducción de *Salmonella* Paratyphi y *Salmonella* Enteritidis en trozos de carne refrigerada a 0°C durante 72 horas. 78
- Tabla 20.** Porcentajes de reducción de *Salmonella paratyphi* y *Salmonella* Enteritidis en trozos de carne refrigerada a 4°C durante 72 horas. 78
- Tabla 21.** Porcentajes de reducción de *Salmonella paratyphi* y *Salmonella* Enteritidis en trozos de carne refrigerada a 10°C durante 72 horas. 78

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Presentación comercial del aceite esencial de tomillo blanco obtenido de dos variedades <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Thymus zygis</i> .	43
<b>Figura 2.</b> Selección y pesaje del tomillo por paquetes de 500 gramos.	43
<b>Figura 3.</b> Montaje de la planta piloto para extracción de aceite esencial del tomillo en Laboratorio de Química de la Universidad de Pamplona, extensión Villa del Rosario.	44
<b>Figura 4.</b> Montaje de destilación por arrastre de vapor.	44
<b>Figura 5.</b> Preparación de los trozos de carne, antes de la inoculación.	51
<b>Figura 6.</b> Inoculación de las piezas de carne.	52
<b>Figura 7.</b> Corriente iónica total reconstruida (cromatograma) de los compuestos volátiles del aceite esencial comercial de tomillo.	61
<b>Figura 8.</b> Espectros de masas del $\gamma$ -Terpineno, (a) obtenido de la muestra de AEc y (b) obtenido de la base de datos wiley 275.L.	62
<b>Figura 9.</b> Halos de inhibición del aceite esencial experimental frente a <i>Salmonella</i> Paratyphi.	67
<b>Figura 10.</b> Evolución de <i>S. Paratyphi</i> en trozos de carne de res refrigerada a 0°C durante 72 horas.	72
<b>Figura 11.</b> Evolución de <i>S. Paratyphi</i> en trozos de carne de res refrigerada a 4°C durante 72 horas.	72
<b>Figura 12.</b> Evolución de <i>S. Paratyphi</i> en trozos de carne de res refrigerada a 10°C durante 72 horas.	73
<b>Figura 13.</b> Evolución de <i>S. Enteritidis</i> en trozos de carne de res refrigerada a 0°C durante 72 horas.	75
<b>Figura 14.</b> Evolución de <i>S. Enteritidis</i> en trozos de carne de res refrigerada a 4°C durante 72 horas.	75
<b>Figura 15.</b> Evolución de <i>S. Enteritidis</i> en trozos de carne de res refrigerada a 10°C durante 72 horas.	76

**LISTA DE ANEXOS**

	Pág.
<b>Anexo 1.</b> Gráfico de medias y 95% de confiabilidad de Fisher LSD para los halos de inhibición de cada tratamiento frente a <i>Salmonella</i> Paratyphi.	101
<b>Anexo 2.</b> Gráfico de medias y 95% de confiabilidad de Fisher LSD para los halos de inhibición de cada tratamiento frente a <i>Salmonella</i> Enteritidis.	101

## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN E INFORMACIÓN GENERAL

#### Generalidades

“La carne es uno de los productos finales de la agroindustria bovina que por sus ingredientes sensibles es considerado como uno de los alimentos de mayor riesgo en salud pública” (Fernández y Quiñonez, 2003, p. 47). Al respecto Bibek (2010) señala que “la biota de descomposición predominante en la carne se determina por la disponibilidad de nutrientes, de oxígeno, temperatura de almacenamiento, pH, tiempo de almacenamiento del producto, y tiempo de proliferación de los microorganismos presentes en un ambiente dado”. (p.147) Si bien “la carne contiene nutrientes necesarios para una adecuada alimentación; también puede ser portadora de peligros, que dependiendo de la concentración, la resistencia del individuo consumidor y otros factores puede constituir riesgos para la salud humana” (Delgado, y Cols., 2015, p. 1).

Después de sacrificar a los animales y curtir la piel, los cadáveres de animales y aves contienen muchos tipos de microorganismos, sobre todo bacterias provenientes de la piel, las plumas y el tracto gastrointestinal, entre otros, como el ambiente en que se alimentó y de la pastura (alimento, agua y estiércol); y del ambiente en los mataderos (equipo, agua, aire y el hombre). Diferentes patógenos entéricos, se pueden encontrar en la carne, como *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, y *Staphylococcus aureus* (Bibek, 2010, p.147).

Rodríguez y Cols. (2016), explican que “*Salmonella* spp., es un enteropatógeno que se transmite a los humanos a través de alimentos o agua contaminada, por lo que se clasifica como una enfermedad transmitida por alimentos (ETA)”. (p.2) Agregan los

autores mencionados que dentro del género *Salmonella* spp, se han descrito más de 2.600 serovares en 2 especies, a saber:

*S. bongori* y *S. enterica*, esta última se subdivide en 7 subespecies, y los serovares patógenos para el humano pertenecen a la subespecie entérica. Los serovares Typhimurium y Enteritidis se recuperan a nivel mundial de cuadros de gastroenteritis y tienen un amplio rango de hospederos, mientras que los serovares Typhi (restringido al humano como único hospedero), Sendai y Paratyphi A, B, C causan fiebre tifoidea (ibíd., p.2).

Los conservantes químicos sintéticos han sido usados en la industria alimentaria en las últimas décadas. Sin embargo, el uso de componentes químicos artificiales en el control de deterioro de los alimentos y de bacterias patógenas ha sido un tópico de controversia. “Estos han sido reportados por ser causa de enfermedades respiratorias y otros riesgos de salud. Como resultado, esto ha llevado a la necesidad de usar agentes antibacterianos naturales para extender la vida útil de los alimentos” (Zhang y Cols., 2016, p. 282).

Las investigaciones actuales han enfocado sus estudios en la búsqueda de compuestos que posean usos como agentes terapéuticos, con la finalidad de controlar las diferentes enfermedades que derivan de los microorganismos. Para ello el uso de los aceites esenciales ha tomado un papel importante en esta búsqueda, porque muchas veces la mezcla de componentes terpénicos (oxigenados varios de ellos), presentan algún tipo de actividad frente a bacterias comunes (Coy y Acosta, 2013, p. 238).

“Los aceites esenciales (AE) son líquidos volátiles extraídos de las plantas, de los cuales numerosos AE se han usado por sus propiedades organolépticas en considerables industrias. Las propiedades antimicrobianas de los AE han sido reconocidas desde mucho tiempo” (Dussault y Cols, 2014, p. 515). Entre ellas existen las “especies de tomillo que se encuentran entre las plantas aromáticas que biosintetizan compuestos con una amplia gama de propiedades biológicas” (Kasrati y Cols., 2014, p.339). De acuerdo a lo anterior

se plantea como objetivo de esta investigación evaluar el efecto del aceite esencial experimental y de un aceite esencial comercial obtenidos a partir del tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre el crecimiento de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella paratyphi* en superficies de carne cruda bovina refrigerada.

## Marco Teórico y Estado Del Arte

### *Carne*

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO - por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization) en 2015, el Codex Alimentarius define la carne como “*todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin*”. La carne se compone de agua, proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición nutricional de las carnes y otras fuentes de alimento por 100 g

<b>Producto</b>	<b>Agua (%)</b>	<b>Proteínas (%)</b>	<b>Grasas (%)</b>	<b>Cenizas (%)</b>	<b>Calorías (KJ)</b>
Carne de vacuno (magra)	75.0	22.3	1.8	1.2	485
Canal de vacuno	54.7	16.5	28.0	0.8	1351
Carne de cerdo (magra)	75.1	22.8	1.2	1.0	469
Canal de cerdo	41.1	11.2	47.0	0.6	1975
Carne de ternera (magra)	76.4	21.3	0.8	1.2	410
Carne de pollo	75.0	22.8	0.9	1.2	439
Carne de venado (ciervo)	75.7	21.4	1.3	1.2	431
Grasa de vaca (subcutánea)	4.0	1.5	94.0	0.1	3573
Grasa de cerdo (tocino dorsal)	7.7	2.9	88.7	0.7	3397
Leche (pasteurizada)	87.6	3.2	3.5	--	264
Huevos (cocidos)	74.6	12.1	11.2	--	661
Pan (centeno)	38.5	6.4	1.0	--	1000
Patatas (cocidas)	78.0	1.9	0.1	--	301

Fuente: Heinz y Hautzinger, 2010.

Desde el punto de vista nutricional, y de acuerdo a la información de la Tabla 1, la importancia de la carne deriva de sus proteínas de alta calidad, que contienen todos los aminoácidos esenciales, así como de sus minerales y vitaminas de elevada biodisponibilidad, además es rica en vitamina B12 y hierro.

En conformidad a la FAO, en el análisis de consumo de carne en 2014, la carne puede formar parte de una dieta equilibrada, aportando valiosos nutrientes beneficiosos para la salud. La carne y los productos cárnicos contienen importantes niveles de proteínas, vitaminas, minerales y micronutrientes, esenciales para el crecimiento y el desarrollo. La elaboración de la carne supone una oportunidad para añadir valor, reducir los precios, fomentar la inocuidad alimentaria y ampliar la vida útil. Esto a su vez puede generar un aumento de los ingresos del hogar y una mejora de la nutrición.

La FAO, sostiene que mientras que el consumo de carne per cápita en algunos países industrializados es alto, en los países en desarrollo un consumo per cápita de carne inferior a 10 kg debe considerarse insuficiente y con frecuencia causa subnutrición y malnutrición. Así mismo, se estima que en el mundo más de 2000 millones de personas sufren carencias de vitaminas y minerales fundamentales, en particular vitamina A, yodo, hierro y zinc. Dichas carencias se producen cuando las personas tienen un acceso limitado a alimentos ricos en micronutrientes como carne, pescado, frutas y hortalizas.

**Tabla 2.** Panorama del mercado mundial de la carne 2012 - 2014.

	<b>2012</b>	<b>2013</b> <i>estimado</i>	<b>2014</b> <i>pronóstico</i>	<b>Variación de 2014 a 2013</b>
	<i>millones de toneladas</i>			<i>%</i>
<b>BALANZA MUNDIAL</b>				
<b>Producción</b>	<b>304.2</b>	<b>308.5</b>	<b>311.8</b>	<b>1.1</b>
Carne de bovino	67.0	67.7	68.0	0.5
Carne de ave	105.4	107.0	108.7	1.6
Carne de cerdo	112.4	114.3	115.5	1.1
Carne de ovino	13.7	13.9	14.0	0.5
<b>Comercio</b>	<b>29.7</b>	<b>30.9</b>	<b>31.3</b>	<b>1.4</b>
Carne de bovino	8.0	9.1	9.4	3.5
Carne de ave	13.0	13.2	13.5	2.4
Carne de cerdo	7.5	7.4	7.2	-2.1

Carne de ovino	0.8	1.0	1.0	-3.7
<b>INDICADORES DE LA OFERTA Y LA DEMANDA</b>				
Consumo humano per cápita: (kg/año)				
Mundial	<b>42.9</b>	<b>42.9</b>	<b>42.9</b>	<b>-0.1</b>
Desarrollados	76.2	75.9	76.1	0.3
En desarrollo	33.5	33.7	33.7	0.0
<b>ÍNDICE DE LA FAO PARA LOS PRECIOS DE LA CARNE</b>				
	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b> abril a enero	<b>Variación: de enero - abril 2014 a enero-abril 2013</b>
	182	184	184	-1.0%

Fuente: FAO, 2014.

### *Consumo de carne a nivel mundial*

En la dieta y hábitos alimenticios de las personas existen diferentes factores que la determinan, tal como lo refiere Énfasis Logística (2012), al señalar que “factores como la disponibilidad, precios, niveles socioeconómicos, las estaciones e inclusive religiones practicadas, son determinantes en la configuración de las respectivas dietas, hábitos y tradiciones alimentarias alrededor del planeta”. (p.1) Agrega que este incremento a nivel mundial se refleja desde el año 2009, en el que se produjeron 272.7 millones de toneladas, triplicando a lo producido en el año 1970 donde se alcanzó 95.2 millones de toneladas. Explica que tal incremento se debió principalmente al aumento del consumo de carne de ave, “que triplicó su tasa de crecimiento en el periodo, lo cual puede estar asociado con el crecimiento poblacional, mucho mayor en los países pobres, en combinación con el mayor precio de la carne de res”. (ibíd. p. 2)

De acuerdo con el boletín de prensa del SAGARPA (2012) el consumo de carne a nivel mundial se ha incrementado, refiriendo las cifras siguientes:

El consumo de carne per cápita a nivel mundial experimentó cambios importantes en las últimas décadas, pasando de una media de 26 kilos en 1970 a 41 kilogramos en los últimos años. El consumo por persona muestra variaciones significativas según la región. África, por ejemplo, registra el menor consumo (16

kilogramos) y Oceanía los mayores consumos (33 kilogramos). El principal incremento de 1970 a la fecha lo registra el continente asiático con un aumento en el consumo de 23 kilogramos, seguido por América (20 kg) y Europa (18 kg). En las distintas regiones el poder adquisitivo principalmente y el nivel de producción determinan el tipo de carne con que se alimenta la población. (p.1)

En el mundo hay más de 20 países en desarrollo cuyo consumo per cápita de carne es inferior a 13 kilogramos, en comparación con el promedio de 80 entre los países desarrollados. Estados Unidos registra el mayor consumo anual por persona de carne con 119,4 kilogramos; Bangladesh y Burundi por ejemplo, no alcanzan los cuatro kilogramos de consumo por persona al año pues el nivel adquisitivo es muy bajo. En la India el consumo es también muy bajo pero más bien debido a prohibiciones de tipo religioso. Según el tipo de carne, el país que registra el mayor consumo por persona de carne de ave es Kuwait con 97,5 kilogramos; de carne de res, Argentina con 54,1 kg; de carne de cerdo, Austria con 65,6 kg, y de carne de ovino y caprino, Mongolia con 49,3 kilos. (p.2).

### ***Consumo de carne a nivel nacional***

En Colombia contrario al contexto americano el consumo de carne ha disminuido, tal como lo refiere Zartha y Cols. (2007), sustentándolo con las cifras siguientes:

En Colombia el consumo per. Cápita de carne bovina en el año 1999 fue calculado en 20,6 kilos pasando a casi 16 kilos en el año 2002; para el Observatorio de Agrocadena, la caída en el consumo per. Cápita de carne bovina en Colombia, puede estar asociada con crisis económicas de años anteriores y en parte, por una mejora en el posicionamiento de las carnes competidoras. (p.119)

Agregan que el consumo per. Cápita de carne de res de Colombia, según cálculos propios sobre los datos de la FAO en el 2003, si bien se encuentra por encima del promedio mundial, 15,5 kg/Hab, contra 9,4 kg/Hab, es muy baja con respecto al

hemisferio americano de 33 kg/Hab. y a la UE-15, 18,9 kg/Hab. La tasa de crecimiento del consumo per. Cápita del país es negativa, indicando una caída al -1% promedio anual para el período 1990-2003. (ibíd., p.119)

Tales cifras evidencian un bajo consumo de carne bovina respecto a las cifras de consumo en el hemisferio americano, argumentan los referidos autores que este hecho se debe entre otras razones “por la imagen negativa proveniente de ser un producto rico en grasas saturadas y colesterol, además porque sus productos sustitutos han obtenido una mejora genética gracias a su ciclo de producción más corto”. (ibíd., p. 119)

La proteína de pollo sigue en el puesto número 1 de preferencia de los colombianos, seguido de la de res, cerdo y pescados. Mientras la tendencia de crecimiento del consumo de las carnes en general ha sido notorio desde 2010, la ingesta de bovino tuvo una leve caída en los 2 últimos años, puesto que en 2012 las estadísticas, basadas en el sacrificio de reses, muestran que se consumían 21 kilos por persona al año y en 2014 la cifra cayó a 18 kilos.

Las razones por las cuales se muestra una tendencia a la baja en el consumo de carne de res son el contrabando de animales y de la proteína que ingresan desde las fronteras, lo que indicaría que los colombianos pueden estar comiendo más carne pero de deficiente calidad e inocuidad, por elegir precios más bajos.

### **Bacterias patógenas presentes en carnes**

Durante el sacrificio y procesamiento, todos los tejidos potencialmente comestibles pueden estar sujetos a contaminación por diversas fuentes, ya sea interna o externa al animal. En animales vivos, las superficies en contacto con el medio ambiente albergan una variedad de microorganismos, por lo que en muchas ocasiones los contaminantes se derivan de la piel del animal, o bien, de aquellos presentes en heces. (Heredia y Cols., 2014, p.21). Puntualizan que las “carnes procesadas son más susceptibles a contaminarse con microorganismos patógenos durante las diferentes etapas de su

procesamiento” (ibíd., p). La existencia de “patógenos en la cadena de producción de un alimento, aún en bajos números, es indeseable y se considera como la mayor causa de enfermedades gastrointestinales alrededor del mundo” (McDonald y Sun, Citados en Heredia y Cols. 2014, p.21).

Refieren los mencionados autores que los microorganismos patógenos que históricamente se han asociado a brotes por el consumo de carne, son:

*Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y no-O157 productoras de toxina shiga (STEC), *Listeria*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens* y *Yersinia*, aunque los primeros tres se ha reportado que actualmente son los más importantes como patógenos en carne de res (Koohmaraie y cols. Citados en Heredia y Cols. 2014, p.21). Se ha establecido que para algunos *microorganismos tales como Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium spp*, las principales medidas para lograr su control se enfocan en intervenciones durante las últimas etapas de la producción de la carne (Nørrung y cols. Citados en Heredia y Cols. 2014, p.21).

Comentan los mencionados autores que algunos de los patógenos presentes en carne (*Campylobacter spp* y *Salmonella spp*) pueden ser más controlados efectivamente por los principales procesos de intervención aplicados en la producción primaria combinados con la optimización de la higiene durante el sacrificio del animal. Enfatizan los referidos autores que para lograr un control adecuado de microorganismos, deteriorantes y patógenos, es fundamental la higiene, así como el conocimiento de aquellos factores que pudieran permitir el establecimiento o desarrollo de los microorganismos. Agregan que se han avanzado en la aplicación de métodos no térmicos de control o preservación que han sido efectivos, “tales como altas presiones hidrostáticas, radiación, uso de compuestos naturales, empaques activos e inteligentes, pulsos eléctricos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes, ultrasonido, entre otros” (Chen y cols. Citados en Heredia y Cols. 2014, p.21).

Señalan los mencionados autores que a fin de lograr el control o minimización de la contaminación de las carnes se han utilizado diferentes tecnologías para la prevención

de la contaminación, en este sentido señalan la biopreservación (antimicrobianos naturales), explicando lo siguiente:

Diferentes estudios han demostrado la efectividad en la reducción de patógenos en cárnicos al adicionarse extractos de plantas o compuestos aislados de estos. Tales compuestos se caracterizan por presentar diferentes propiedades como antibacterianos e incluso algunos autores han presentado modelos de su posible mecanismo de acción a nivel planctónico, mencionando que su efecto principal radica en provocar daño a la membrana celular microbiana causando como consecuencia poros y permitiendo el paso de algunos de estos compuestos al citoplasma donde pueden interactuar con proteínas e inhibir la síntesis de compuestos necesarios para el mantenimiento y reproducción de la bacterias, o bien, por su carácter ácido pueden afectar la homeostasis en el interior. (ibíd. p. 31)

En este sentido Bajpai y cols. (Citados en Heredia y Cols. 2014, p.31), mencionan que “los aceites esenciales derivados de plantas Aromáticas y Medicinales (AE) han evidenciado un notable potencial contra el crecimiento de microorganismos causantes de deterioro y patógenos presentes en carne y otros productos cárnicos”. (p.31) Así se ha demostrado en “poseer actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, etc.” (Hygreeva y col., Citados en Heredia y Cols. 2014, p.31). Los AE comprenden los “compuestos aromáticos y volátiles obtenidos a partir de materiales de plantas como flores, brotes, raíces, corteza y hojas y se clasifican en dos grupos, el grupo principal contiene terpenos y terpenoides, mientras que el otro consiste en compuestos aromáticos (fenilpropanoides).

En carne y productos cárnicos, se han realizado diversos estudios para examinar el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales obtenidos a partir de orégano, romero, tomillo, albahaca, cilantro, ajo, clavo de olor, canela entre otros (solos o en combinación) encontrando actividad antimicrobiana en diferentes grados, la cual se han relacionado a la presencia de compuestos como carvacrol, eugenol,

timol,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -citral,  $\beta$ -citral, citronelol, citronelal, linalool, geraniol, limoneno, cinamaldehído, etc. (Jayasena y Jo, Citados en Heredia y Cols., p. 32).

Heredia y Cols. (2014), señalan que estos compuestos han mostrado muy buena actividad antimicrobiana, no obstante su uso y aplicación en la industria de alimentos es limitado debido a su intenso aroma, además que al aplicarlo directamente sobre los productos cárnicos produce una reducción de la actividad antimicrobiana; lo cual se puede atribuir a la presencia de grasas, hidratos de carbono, proteínas y sales en tales sistemas. Mas la efectividad de esta tecnología puede mejorarse si se utiliza en combinación con otras tecnologías a fin de mejorar la estabilidad microbiana y la calidad sensorial. El panorama de estos compuestos naturales es incrementar su uso en un futuro en el procesamiento de carnes debido a las restricciones sobre el uso masivo de conservadores químicos.

### ***Generalidades Salmonella spp.***

De acuerdo con Bajpai y Cols. (2012), durante los últimos años el límite de infecciones por *Salmonella* se ha superado dramáticamente. A pesar de presentarse una baja tasa por *Salmonella* spp., este microorganismo se ha convertido en un reto en la industria alimentaria debido a su amplia distribución en todo el mundo. Según Li, Wang y otros en 2013, afirman que *Salmonella* spp. puede adaptarse a las condiciones de temperatura, pH y actividad del agua ( $A_w$ ) más allá de su rango de crecimiento normal, presentando riesgos para la seguridad alimentaria. Aunque las salmonelas son generalmente considerados mesófilos por naturaleza, algunas cepas de *Salmonella* spp. pueden crecer a temperaturas elevadas de hasta 54 ° C, y otros son capaces de crecer en alimentos almacenados entre 2 ° C y 4 ° C; la adaptabilidad fisiológica de *Salmonella* spp. está más demostrada por su capacidad para proliferar a valores de pH, variando de 3,99 a 9,5 con un pH óptimo para el crecimiento de 6,5 a 7,5. Los estudios han revelado que *Salmonella* puede crecer en sopas secas rehidratadas con  $a_w$  tan bajo como 0,93 después de 3 días de incubación a 30 ° C.

Explican Bajpai y Cols. (2012), que también las alteraciones en la sociedad humana con la reciente metodología de procesamiento y comercialización de alimentos con reproductores vivos contribuyen a facilitar estos brotes. Cepas de *Salmonella* spp., resistentes a los antibióticos comerciales ha surgido como un gran problema de salud para los consumidores. Conforme a la Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN) (2015), se ha revelado que la infección con *Salmonella* resistente a los antibióticos ha desempeñado un rol vital en el aumento de la tasa de enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos. El uso extensivo de antibióticos en la industria alimentaria contra los patógenos transmitidos por los alimentos o los modelos alimentarios ha dado como resultado una resistencia antibiótica adicional a *Salmonella* spp., que se ha convertido en un asunto de interés primordial para la salud pública.

### ***Características de Salmonella spp.***

*Salmonella* spp. es un bacilo gram negativo que hace parte de la familia *Enterobacteriaceae*, “actualmente contempla cerca de 2463 serovares de *Salmonella*, ya que anualmente son definidas nuevas serovariedades por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en colaboración con el Centro de Referencia e Investigación en *Salmonella* del Instituto Pasteur – Francia” (Brenner y Cols., 2000, p. 2465). Este género bacteriano se divide en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. A su vez, *Salmonella enterica* se subdivide en siete subespecies como se observa en la tabla 3.

**Tabla 3.** Clasificación de especies, subespecies y serotipos de *Salmonella*., de acuerdo al esquema de Kauffmann-White.

<b>Especies de <i>Salmonella</i></b>	<b>Subespecies de <i>Salmonella</i></b>	<b>No. de serotipos dentro de las subespecies.</b>
<i>Salmonella enterica</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1454
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94

	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70
	<i>S. enterica</i> supsp. <i>indica</i> (VI)	12
	<i>S. enterica</i> supsp. (VII)*	5
<i>Salmonella bongori</i>	<i>S. bongori</i> (V)	20
<b>Total</b>		<b>2468</b>

Fuente: Adaptado de Brenner y Cols. 2000. NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

Braden y Cols. (2007), señalan que a causa de la diversidad de los serovares identificados, la OMS planteó una clasificación fundamentada en las combinaciones de los antígenos que posee: somático (O), flagelar (H) y capsular (K), este sistema se conoce como el Kauffman-White. No obstante, (Brenner et al., 2000), comentan que los científicos sostienen la complejidad de la nomenclatura de *Salmonella* spp., y por consiguiente aplican diferentes sistemas para referirse y para informar acerca de este género. Sin embargo, la uniformidad en la nomenclatura de *Salmonella* es necesaria para la comunicación entre científicos, funcionarios de salud y el público. No obstante, en la actualidad se combina varios sistemas de nomenclaturas que dividen inconsistentemente el género en especies, subespecies, subgéneros, grupos, subgrupos y serotipos (serovares), lo que causa confusión. Es importante destacar que aunque existen solo “dos especies de salmonelas según su hibridación de DNA, tanto las especies como las subespecies mencionadas se encuentran constituidas por más de 2400 variedades serológicas, determinadas según las distintas asociaciones de los antígenos somáticos O y flagelares H” (Pachón, D. 2009, p. 22).

En este contexto Braden y Cols, (2007) comentan que los serovares de *Salmonella enterica* son normalmente escritos por su nombre corto, el cual incluye el nombre del serovar, por ejemplo, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium se denota como *S. Typhimurium*. Adicionalmente, los subtipos son útiles para conocer la distribución geográfica de este microorganismo y estos se realizan mediante fagos

específicos. Esta clasificación se escribe con números de fagotipo (PT) o fagotipo definitivo (DT). Los dos términos son intercambiables en la literatura y pueden usarse indistintamente.

Reafirman este hecho Kingsley y Bäumlér (2000) quienes apuntan que los serovares de *Salmonella* han evolucionado y se han adaptado a infectar huéspedes específicos, sin embargo, Callaway y Cols. (2007) señalan que algunos serovares tales como Typhimurium, pueden infectar muchas especies incluido el hombre. Así lo declara el Ministerio de la Protección Social (2013) refiriendo que *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi son serovares responsables de causar fiebres entéricas (denominadas fiebre tifoidea y fiebre paratifoidea respectivamente), estos serovares se han adaptado a los tejidos humanos, difieren sustancialmente de los otros serovares en su ecología.

Según el Instituto Nacional de Salud -INS- (2014), en Colombia se refiere que la fiebre tifoidea causada por *Salmonella* Typhi y en menor grado la fiebre paratifoidea por *Salmonella* Paratyphi A, B o C; se trata de una enfermedad bacteriana sistémica prevenible. La transmisión de este evento se hace por agua o alimentos contaminados, y una enfermedad que predomina en los países subdesarrollados donde las condiciones higiénicas y sanitarias son deficientes, no existe un proceso adecuado para diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Estos factores son importantes en la perpetuación de la enfermedad porque facilitan la contaminación de agua y alimentos por portadores crónicos que eliminan *Salmonella* Typhi en sus deposiciones, manteniendo la cadena de transmisión hacia nuevos huéspedes susceptibles.

Según Pérez y Cardozo (2014), *Salmonella* spp., se transmite por la ingestión de alimentos infectados, incluyendo huevos crudos o parcialmente cocidos y sus subproductos; carnes y sus derivados, leche y productos lácteos; agua contaminada; aves de corral, especialmente pollo y pavo; frutas, jugo de frutas y hortalizas crudas contaminadas. *Salmonella* spp., es un enteropatógeno que se transmite a los humanos a través de los alimentos o agua contaminada, por lo que se clasifica como una enfermedad

transmitida por alimentos (ETA). Las personas infectadas con *Salmonella* spp., presentan síntomas como diarrea, fiebre y dolor abdominal.

La estructura antigénica de *Salmonella* spp. es similar a la de otras enterobacterias, con dos clases de antígenos principales presentes: antígenos somáticos O y antígenos flagelares H. En algunas cepas se encuentra un tercer tipo como antígeno de superficie, siendo análogo funcionalmente a los antígenos K de otros géneros; ya que anteriormente se pensó, que se relacionaba con la virulencia, este antígeno se denominó antígeno Vi. (Pérez y Cardozo, 2014, pp. 77).

### ***Brotos de Salmonella spp., a nivel nacional***

Señalan Pérez y Cardoso (2014) que la Salmonelosis es una Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA) en continuo aumento en el mundo. “El Ministerio de la Protección Social a través de los registros individuales de prestación de servicios de salud (RIPS) durante el periodo 2005-2008 informó que en el país se presentaron 275 hospitalizaciones asociadas a *Salmonella* spp” (Pérez y Cardoso, 2014, p. 78). En los resultados de Pérez y Cardozo (2014), se determina que los departamentos que más registraron casos de salmonelosis durante el periodo 2008-2011 fueron: Antioquia, Bogotá, Valle, Norte de Santander, Huila y Santander con el 88,5% de los brotes en Colombia durante el referido periodo.

El conocimiento de los serotipos de *Salmonella* spp. es de gran importancia en salud pública, ya que permite la intervención para controlar y vigilar la salmonelosis. Durante el periodo de enero del 2000 a diciembre de 2011 el grupo de microbiología del INS y los laboratorios de salud pública del país, realizaron un estudio de vigilancia en la red de susceptibilidad antimicrobiana y de los serotipos de *Salmonella* spp., encontrando 780 aislamientos de enfermedad diarreica aguda (EDA) de origen bacteriano, de los cuales 389 (49,9%), fueron remitidos como *Salmonella* spp.

**Tabla 4.** Distribución de aislamientos de *Salmonella* spp. por procedencia y año de aislamiento, durante el periodo 2008 a 2011.

Departamento	Año de aislamiento								Total	
	2008		2009		2010		2011			
	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Antioquia	166	34.3	206	28.0	264	31.4	256	29.7	892	30.6
Bogotá	154	31.8	220	29.9	249	29.6	245	28.4	868	29.7
Valle	25	5.1	39	5.3	59	7.0	47	5.5	170	5.8
Nariño	5	1.0	14	1.9	44	5.2	27	3.1	90	3.1
Córdoba	0	0.0	0	0.0	3	0.4	16	1.9	19	0.7
Santander	22	4.5	21	2.9	16	1.9	48	5.6	107	3.7
Huila	28	5.7	42	5.7	27	3.2	22	2.5	119	4.1
Tolima	6	1.2	9	1.2	5	0.6	4	0.5	24	0.8
Caldas	3	0.6	21	2.9	10	1.2	12	1.4	46	1.6
Cauca	15	3.1	6	0.8	3	0.3	11	1.3	35	1.2
Caquetá	2	0.6	3	0.4	2	0.2	4	0.5	11	0.4
Norte de S/der	8	1.6	17	2.3	50	5.9	62	7.2	137	4.7
Risaralda	3	0.6	18	2.5	28	3.3	26	3.0	75	2.6
Guainía	0	0.0	0	0.0	1	0.1	3	0.3	4	0.1
Atlántico	0	0.0	45	6.1	10	1.1	11	1.3	66	2.3
Boyacá	16	3.3	25	3.4	31	3.7	24	2.8	96	3.3
Cundinamarca	1	0.2	0	0.0	0	0.0	2	0.2	3	0.1
Magdalena	2	0.4	1	0.1	0	0.0	1	0.1	4	0.1
Arauca	2	0.4	1	0.1	3	0.3	4	0.4	10	0.3
Cesar	3	0.6	3	0.4	2	0.2	0	0.0	8	0.3
Amazonas	1	0.2	1	0.1	4	0.5	1	0.1	7	0.2
Putumayo	0	0.0	3	0.4	0	0.0	1	0.1	4	0.1
Quindío	0	0.0	5	0.6	4	0.5	3	0.3	12	0.4
La Guajira	0	0.0	0	0.0	0	0.0	5	0.6	5	0.2
Vaupés	1	0.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.0
Meta	13	2.6	30	4.1	20	2.4	16	1.9	79	2.7
Chocó	3	0.6	0	0.0	6	0.7	0	0.0	9	0.3
Bolívar	0	0.0	1	0.1	1	0.1	1	0.1	3	0.1

Vichada	2	0.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	0.0
Casanare	0	0.0	2	0.3	0	0.0	0	0.0	2	0.0
Sucre	0	0.0	0	0.0	0	0.0	9	1.0	9	0.3
Guaviare	0	0.0	1	0.1	0	0.0	0	0.0	1	0.0
<b>TOTAL</b>	<b>483</b>	<b>99.2</b>	<b>734</b>	<b>99.6</b>	<b>842</b>	<b>99.8</b>	<b>861</b>	<b>99.8</b>	<b>2918</b>	<b>100</b>

Fuente: Pérez y Cardozo, 2014.

En estudios realizados durante el periodo 2002-2003 en la región Caribe colombiana, se analizaron 1300 muestras de alimentos provenientes de mercados y ventas callejeras, las cuales se recuperaron 74 aislamientos de *Salmonella* spp., en carne de res (40,5%), embutidos (17,6%), pollo (16,2%), queso (12,25%), y cerdo (8,1%), donde los serotipos más frecuentes fueron: *S. Anatum* (18,9%), *S. Uganda* (17,6%), *S. Newport* (12,2%), y *S. Typhimurium* (9,5%). (ibíd. p. 80)

En conformidad con los datos publicados por la Unidad de evaluación de riesgos para la inocuidad de los alimentos, (Ministerio de la protección Social, UERIA, INS 2013) sobre “la incidencia de salmonelosis en Colombia durante el periodo de 1997 a 2010, se reportó que la tasa de casos de salmonelosis en el país viene en ascenso, pasando de 0,23% en 1997 a 1,76% en 2010”. (ibíd., p. 81)

“El Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) reportó que durante los años 2005 a 2007 se presentaron 17 muertes en el país a causa de salmonelosis, evidenciándose un aumento en la muerte a causa de enfermedad por este microorganismo”. (ibíd. p. 81)

El INS (2014), a partir de 1036 aislamientos de *Salmonella* provenientes de 24 departamentos del país, reportó que los tres serotipos más frecuentes en Colombia fueron: *S. Typhimurium* (35%), *S. Enteritidis* (24,5 %) y *S. Typhi* (9,5%), el restante 31% se distribuyó en 34 serotipos diferentes.

## **Compuestos Antimicrobianos Como Conservantes De Alimentos**

El uso de plantas medicinales como fuente para el alivio de enfermedades, se remonta más de cinco milenios a las plantas superiores, esto se encuentra por escrito en documentos de la civilización temprana en China e India. Neandertales que vivieron hace 60.000 años describieron que las plantas medicinales representaban una rica fuente como el “*hollyback*” con agentes antimicrobianos. Las plantas se usan con fines medicinales siendo ampliamente utilizado en la etnomedicina en torno a los diferentes países del mundo y son una fuente de drogas de gran alcance. Los aceites esenciales son los aceites que se obtienen de diferentes partes de las plantas aromáticas como las hojas, flores, cortezas, raíces y semillas, aplicando diferentes métodos de obtención, tales como la destilación. También se pueden definir como la fuerza de vida de la planta, pues conservan sus principios activos y propiedades. Según Hernández-Urzúa, en el 2016, las sustancias antimicrobianas “naturales”, son constitutivas de los alimentos de origen vegetal y animal; las investigaciones demuestran que las hierbas y especias usadas comúnmente, como el ajo, comino negro, canela, tomillo, pimienta de Jamaica, hojas de bahía, mostaza y romero, poseen propiedades antimicrobianas.

### ***Antimicrobianos***

Con base a Rodríguez (2011), el uso de antimicrobianos (conservantes) es una práctica común en la industria de los alimentos, por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente (en algunos casos han causado daño en la salud de los consumidores, si se utilizan a grandes dosis como en el caso de los sulfitos), redundando en un rechazo por parte de los consumidores de productos procesados, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones. En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados.

Algunos antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias. Lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad. La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos o aceites esenciales, y se ha observado que la grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos.

Igualmente, Zhang y Cols. (2016) definen que la seguridad alimentaria está relacionada de manera crítica con la salud pública y esta área ha recibido una creciente atención en los últimos años. La aparición de nuevos brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos causados por el deterioro de los mismos y las bacterias patógenas es uno de los principales retos en materia de inocuidad de los alimentos.

De acuerdo a esto, se presenta en la tabla 5, los ejemplos de especias, hierbas y condimentos empleados como antimicrobianos:

**Tabla 5.** Algunas especias, hierbas, y condimentos evaluados

Nombre común (Español/Ingles)	Nombre científico
Albahaca / Basil	<i>Ocimum basilicum</i>
Laurel / Bay	<i>Laurus nobilis</i>
Cilantro / Coriander	<i>Coriandrum sativum</i>
Canela / Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
Clavo / Clove	<i>Syzygium aromaticum</i>
Comino / Cumin	<i>Cuminum cyminum</i>
Eneldo / Dill	<i>Anethum graveolens</i>
Hinojo / Fennel	<i>Foeniculum vulgare</i>
Ajo / Garlic	<i>Allium sativum</i>
Jengibre / Ginger	<i>Zingiber officinale</i>
Te-limón / Lemongrass	<i>Cymbopogon citratus</i>
Mejorana / Marjoram	<i>Origanum majorana</i>
Menta / Mint	<i>Mentha vulgaris, M. spicata</i>
Mostaza / Mustad	<i>Brassica hirta, B. juncea, B. nigra</i>
Cebolla / Onion	<i>Allium cepa</i>
Orégano / Oregano	<i>Origanum vulgare</i>

Perejil / Parsley	<i>Petroselinum crispum</i>
Pimienta / Pepper	<i>Piper nigrum</i>
Romero / Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Tomillo / Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>
Vainilla / Vanilla	<i>Vanilla planifolia, V. pompona, V. tahilensis</i>

Fuente: Rosas y López (2011).

### ***Efecto de la adición de antimicrobianos***

Según reporta Adarme y Rincones (2008), los antimicrobianos o conservantes pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo:

- 1) Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- 2) Daño a la integridad de las membranas.
- 3) Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

Consecuentemente, algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitor más reducido. Del mismo modo, algunos antimicrobianos pueden ser directamente microbicidas, mientras que otros actúan como microbiostáticos. Con todo, este último mecanismo también acarrea la muerte celular, excepto en el caso de las esporas de *Bacillaceae*.

### ***Modo de acción de los agentes antimicrobianos***

El modo de acción de éstos compuestos fenólicos no ha sido determinado ciertamente, ya que éstos pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético y se ha observado que las grasas, proteínas, concentraciones de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos. Los componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que ésta puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo de la

planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas

Explica Goni y Cols. (2009) que el mecanismo de ataque de los antimicrobianos dentro de una célula se lleva a cabo en partes o funciones importantes para la sobrevivencia de la célula. Puede llevarse a cabo en la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteína, en su genética y en la síntesis de su genética. Esto puede causar daños irreparables a una célula. De varios de los antimicrobianos no se conoce aún su modo de acción, pero al actuar de forma diferente, las combinaciones de estos pueden llevar a mejores resultados.

### *Antimicrobianos de origen natural*

#### *Ácidos orgánicos y esteres*

Según Zhang y Wang, en 2013, refieren que los antimicrobianos son ampliamente utilizados en la medicina humana, la producción agrícola y la elaboración de alimentos y ha sido esencial para garantizar la salud humana y animal, así como la seguridad de nuestro suministro de alimentos. Desgraciadamente, la resistencia de los microbios (tanto comensales como patógenos) a los antimicrobianos de uso común está aumentando a escala global.

En esta perspectiva de pensamiento Rosas y López (2011) refieren que la actividad de los ácidos orgánicos utilizados como agentes antimicrobianos es totalmente dependiente del pH y de la capacidad de disociación del ácido (pKa), ya que la forma no disociada del ácido es la responsable de la actividad antimicrobiana.

### *Especias y hierbas*

Muchas especias y hierbas exhiben actividad antimicrobiana; entre las usadas en alimentos se encuentran por ejemplo el apio, cilantro, laurel, almendra, albahaca, café, angélica, puerro, rábano picante, hierbabuena, tomillo, entre otros. Los compuestos presentes en especias y hierbas que tienen actividad antimicrobiana son derivados simples y complejos del fenol, los cuales son volátiles a temperatura ambiente. Las especias son raíces, cortezas, semillas, brotes, hojas o frutos de plantas aromáticas que se añaden a los alimentos como agentes saborizantes. Sin embargo, se sabe desde tiempos antiguos que las especias y sus aceites esenciales tienen diferentes grados de actividad antimicrobiana. Según Rodríguez (2011), el primer reporte del uso de las especias como conservadores se remonta a unos 1550 años a.c., cuando los antiguos egipcios las empleaban para conservar alimentos y embalsamar a los muertos.

Ciertas especias inhiben el crecimiento de microorganismos. En general son más efectivos las especias frente a organismos Gram-positivos, que frente a bacterias Gram-negativas. De acuerdo con Burt (2004), entre las principales especias con alguna o amplia acción frente a microorganismos presentes en alimentos se tiene:

- 1) Canela, clavo y mostaza: gran poder conservante.
- 2) Pimienta negra/roja, jengibre: inhibidores débiles frente a una gran variedad de microorganismos.
- 3) Pimienta, laurel, cilantro, comino, orégano, romero, salvia y tomillo: actividad intermedia.
- 4) Otros: anís, menta, hinojo, apio, eneldo, cúrcuma.

La función conservadora de estas especias se debe a los aceites esenciales que poseen, y en cuya composición tienen compuestos de tipo eugenol o aldehído cinámico

con poder antimicrobiano. También presentan actividad antimicrobiana las oleorresinas de estas especias.

Como antimicrobianos, muchas hierbas y especias han sido reportadas por poseer propiedades antimicrobianas. Sin embargo existe una gran desventaja en su uso como antimicrobiano: una alta concentración es necesaria para obtener un efecto de preservación *in vivo* y por lo tanto, existen alteraciones en el sabor; es por esto, que, tanto el uso de hierbas como agentes antimicrobianos está limitado principalmente a los alimentos en los cuales el cambio en el sabor es considerado deseado.

Respecto a la composición química García y Herrera (2007), comentan que en la actualidad se conoce sólo de manera parcial, la composición química de las sustancias antimicrobianas de las especias. Se sabe que dentro de sus componentes se encuentran alcaloides como en la pimienta; taninos, aldehídos y ácidos orgánicos como en el clavo y la canela. Se ha descubierto que las sustancias antimicrobianas de la mayoría de las especias son los propios aceites esenciales, mezclas de diferentes productos volátiles, entre los que se incluyen alcoholes, cetonas- éteres fenólicos, fenoles, ácidos y sus ésteres. Muchos de los hidrocarburos, alcoholes y cetonas son terpenoides.

### ***Aceites esenciales (AEs o EOs)***

Tajkarimi *et al.*, 2010; Fisher y Phillips (2006), refiriéndose a los aceites esenciales señalan que son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. Son mezclas complejas de terpenoides, sesquiterpenoides y posiblemente diterpenos con diferentes grupos de hidrocarburos alifáticos, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres acíclicos o lactonas. Además son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua. Para la extracción de estos compuestos se pueden utilizar distintos solventes (acetato, etanol, y cloruro de etileno). Los aceites esenciales derivados de plantas

son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos.

En este sentido, Palomino (2001) define que los aceites esenciales constituyen la fracción volátil de los principios activos contenidos en una planta, y por tanto, se obtienen mediante técnicas de destilación, en la que se volatilizan estos principios por calor, se condensan en frío y se recogen.

Los extractos consisten en la fracción no volátil de los principios activos, es decir, aquellos que por no ser volatilizables o ser inestables con la temperatura, no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante diversas técnicas de extracción.

En general, la fracción volátil o aceite esencial se analiza posteriormente mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS ó CG-EM), ya que esta técnica es válida para compuestos volatilizables, y los extractos o fracción no volátil, se recomienda por HPLC.

Burt (2004), estipula que los aceites esenciales con altas concentraciones de terpenos, son más eficaces contra los microorganismos, debido a que poseen capacidad de alterar y penetrar en los lípidos de la estructura de la pared de las células de las bacterias lo que lleva a la desnaturalización y destrucción de proteínas de la membrana celular que genera fugas del citoplasma, lisis celular. En general, los mecanismos por los cuales un aceite esencial ejerce efecto antibacteriano son:

- 1) Se presenta interferencia en la membrana celular, provocando una mayor pérdida de la permeabilidad y disminución de los constituyentes celulares.
- 2) Deterioro del sistema enzimático, incluyendo los que participan en la producción de energía celular y síntesis de componentes estructurales.
- 3) Destrucción o inactivación del material genético.

***Método de extracción de los aceites esenciales:***

***Destilación de arrastre por vapor de agua.***

De acuerdo a lo expuesto por Peredo-Luna y Cols. (2009), en la destilación de arrastre por vapor de agua, se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por éste y otros “no volátiles”. Lo anterior se logra por medio de la inyección de vapor de agua directamente en el seno de la mezcla, denominándose este “vapor arrastre”, pero en realidad su función no es “arrastrar” el componente volátil, sino condensarse formando otra fase inmiscible que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporación. De esta manera, se tendrá la presencia de dos fases inmiscibles a lo largo de la destilación (orgánica y acuosa), por lo tanto, cada líquido se comportará como si el otro no estuviera presente. Es decir, cada uno de ellos, ejercerá su propia presión de vapor y corresponderá a la del líquido puro a una temperatura de referencia. La destilación por arrastre de vapor es un método sencillo y de bajo costo, pero su inconveniente es que requiere largos periodos de tiempo y tiene rendimientos bajos en comparación con otros métodos, controlando variables como la temperatura y el tiempo, punto de ebullición.

***Pruebas de sensibilidad***

Las pruebas de sensibilidad deben realizarse sobre microorganismos asociados a infecciones cuando su sensibilidad no se pueda predecir a partir de su identificación. La determinación de la sensibilidad está indicada en los casos en que el microorganismo causal de la infección pertenezca a una especie capaz de exhibir resistencia a los antibióticos de uso clínico. Los mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos incluyen: producción de enzimas inactivantes, alteraciones en el sitio de acción y modificaciones en el ingreso o el eflujo de los medicamentos.

Para los microorganismos que posean sensibilidad antibiótica predecible se recomienda la aplicación de la terapia empírica adecuada. Las pruebas de sensibilidad también son importantes en estudios de epidemiología de la resistencia y de nuevos agentes antimicrobianos. Para realizar pruebas de sensibilidad e identificación se debe partir de un cultivo primario en medio sólido y se debe procesar colonias aisladas de cada tipo de microorganismo que pueda tener rol patógeno. No se deben realizar pruebas de sensibilidad sobre mezclas de diferentes tipos de microorganismos, ni sobre el material clínico sin procesar, excepto para emergencias clínicas donde la coloración de Gram sugiera la presencia de un sólo patógeno.

Cuando la prueba de sensibilidad haya sido realizada a partir del material clínico, se debe informar como resultado preliminar y se debe repetir utilizando la metodología estandarizada. No es aconsejable la realización de pruebas de sensibilidad cuando no es clara la naturaleza de la infección y la muestra contiene flora normal o polimicrobiana, en la cual el o los microorganismos aislados probablemente tengan poca relación con el proceso infeccioso. En estos casos los resultados obtenidos pueden conducir a errores en el tratamiento.

La necesidad de pruebas de sensibilidad se evidenció tan pronto como los antibióticos se volvieron comercialmente disponibles. Fue menester desarrollar algún método para predecir si un antibiótico podría potencialmente curar a un individuo que tuviera una enfermedad infecciosa. Así fue como se establecieron patrones de susceptibilidad de varios antibióticos diferentes contra diversos microorganismos.

Fleming desarrolló el primer método para llevar a cabo pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. Su técnica de la placa-surco consistió en quitar una tira de agar formándose así un surco donde se colocaba un medio que contenía penicilina. Los organismos en estudio se inoculaban en forma de estrías múltiples perpendiculares al surco. Las que se desarrollaban hasta el surco se consideraban como cepas RESISTENTES, mientras que las que presentaban zonas de inhibición del desarrollo adyacente al surco eran consideradas SUSCEPTIBLES.

Ríos y Cols. (1988) explican que a nivel de laboratorio (*in vitro*), existen diferentes métodos que permiten determinar la susceptibilidad de bacterias ante agentes antimicrobianos. Afirman que la sensibilidad de estos métodos es diferente al igual que los principios en los cuales se basan, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos utilizados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. Sintetizan señalando que los métodos para evaluar la actividad antibacteriana se clasifican en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía.

### ***Difusión en disco***

La metodología empleada en la actualidad para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos es el producto de importantes esfuerzos internacionales que, desde hace más de tres décadas, están enfocados a estandarizar la técnica. Un comité de expertos de la OMS y grupos colaborativos internacionales dirigidos por Bauer y col, Sherris en 1996, sugirieron recomendaciones que fueron seguidas por la mayor parte de los países europeos.

Sin embargo, la falta de un acuerdo general sobre los puntos de corte para la interpretación de estas pruebas continúa siendo un tema de discusión a nivel internacional. Europa está dividida en varias regiones de influencia con diferentes recomendaciones para la determinación de sensibilidad antimicrobiana: Grupo Sueco de Referencia en Antimicrobianos, el Sistema DIN (Deutsches Institut für Normung – Instituto Alemán de Normalización), el de los países bajos, la Sociedad Británica de Antimicrobianos, la Sociedad Francesa de Microbiología y el Comité de Estandarización de Laboratorios Clínicos (ex NCCLS, hoy denominado CLSI).

En la mayoría de los países de Latinoamérica se siguen las pautas del CLSI, en algunos casos, con pocas modificaciones. La metodología referida habitualmente como "Método de la OMS", que no difiere substancialmente del conocido "Kirby-Bauer" es la más

ampliamente usada en estudios de sensibilidad antimicrobiana. El documento que se ha tomado como base es el M2 – A9 del Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, del año 2006 y las tablas de interpretación corresponden al suplemento M100 – S17 del año 2007.

El método recomendado por el Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing del CLSI se basa en los estudios desarrollados por Bauer *et al.* (1966.) Esta metodología está descrita detalladamente y cuenta con tablas de interpretación que están respaldadas por una gran cantidad de datos clínicos y de laboratorio.

Las tablas para la interpretación de los diámetros de inhibición recomendadas por el CLSI (M100-S17) se pueden utilizar para cualquiera de las dos metodologías descritas. La difusión con discos es una metodología muy sencilla pero requiere un estricto control de calidad interno de cada uno de los pasos y los insumos que intervienen en su realización. El control de calidad interno de las pruebas de sensibilidad por difusión es un requisito indispensable para validar los resultados de los aislamientos clínicos. En muchos casos, variaciones pequeñas en la calidad de los reactivos o en algunos detalles metodológicos, se traducen en resultados totalmente distintos a los reales. El American Type Culture Collection (ATCC, USA) dispone de todas las cepas patrones necesarias para llevar a cabo este proceso.

### ***Dilución en caldo o en agar***

Respecto al método de dilución en agar o en caldo Delasquis y Cols., (2012), señalan que este método como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria CMI y agregan Canillac y Mourey (2001) que también se utiliza en la concentración mínima bactericida –CMB-, las cuales son definidas respectivamente como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir

el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas y la concentración más baja de sustancia donde el 99,9% o más de la población inicial es destruida. Tanto la CMI como la CMB, constituyen herramientas para investigar nuevos antimicrobianos. Explican Bassole y Cols. (2003) que en la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos (macrodilución) o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto a analizar. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación. Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar CMI, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático.

Agregan Colorado y Cols. (2007) que en el método de dilución en agar, se utiliza la siembra en placa profunda con una determinada concentración del extracto a evaluar, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, examinando posteriormente si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas. La principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar.

### ***Bioautografía***

Respecto a esta técnica de Bioautografía Colorado y Cols. (2007), afirman que es una técnica sencilla y rápida que combina las ventajas de la cromatografía en capa fina y la detección de actividad antimicrobiana, logrando visualizar directamente las fracciones con actividad antimicrobiana. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde la sustancia a evaluar es absorbida dentro de una placa de cromatografía de capa fina CCP. Explican Botz y Cols. (2007) que el método consiste en colocar las muestras en placas de CCP, seleccionar la fase móvil que de mejor separación y después llevar la placa y colocarla en forma invertida sobre una caja de petri previamente

inoculada con el microorganismo. Se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, se retira la placa y luego se lleva la caja a incubación de acuerdo a las necesidades del microorganismo. Posteriormente, se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo.

### Tomillo (*Thymus vulgaris* L.)

#### *Taxonomía*

El tomillo es una especie perteneciente a la familia *Lamiaceae* (labiadas), de amplia distribución global y que se comercializa en fresco o seco, principalmente para la extracción de su aceite esencial, que se encuentra en mayor cantidad en las hojas. Su clasificación taxonómica se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6.** Posición taxonómica del tomillo vulgar.

CATEGORÍA	TAXÓN
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Subdivisión	Magnoliophytina
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Nepetoideae
Tribu	Mentheae
Género	<i>Thymus</i>
Especie	<i>T. vulgaris</i> L.

Fuente: [Royal Botanic Gardens, Kew](#). 2010.

### ***Generalidades del tomillo***

El tomillo de la familia de las labiadas es un arbusto muy rústico, perenne, de pequeño porte que alcanza de 15 a 30 cm de altura, leñoso, muy ramificado, con tallos sarmentosos y nudosos; si no se lo controla tiende a tener un crecimiento desordenado en cuanto a su diámetro, muestra hojas opuestas, lanceoladas, con los bordes enrollados y densamente pilosas. Sus pequeñísimas hojas le dan la capacidad de reducción de transpiración de la planta por lo que le permite soportar fuertes sequías. Las flores del tomillo son diminutas, agrupadas en racimos terminales muy densos, rosados o blanquecinos. El nombre científico del tomillo (*Thymus*) deriva del griego *thym*, que significa perfumar, en relación al intenso aroma que desprenden sus hojas. Según Costa y Cols. (2013), el género *Thymus* que comprende cerca de 350 especies de hierbas y arbustos perennes y aromáticos, predominantemente se ha encontrado en la región mediterránea, Asia, el sur de Europa, y el norte de África. Hay varios ecotipos de tomillo, que difieren en sus características morfológicas y en la composición de sus AE, aunque todos se caracterizan por un olor moderado y a veces un sabor balsámico y picante muy pronunciado. Se conoce que la demanda de los aceites esenciales a partir de especies de tomillo ha incrementado para la perfumería, y también ha sido usado como conservante para propósitos alimentarios; *Thymus vulgaris*, también se conoce en España como tomillo común, con significativas actividades antioxidantes y antibacteriales.

Es un cultivo altamente rentable. Se pueden sembrar 100.000 plantas por hectárea, y obtener 4 cortes al año, con rendimientos de unas 18 t\*ha<sup>-1</sup> en fresco; cuando se trata deshidratado, se puede obtener unas 3 t\*ha<sup>-1</sup> de tomillo seco y cerca de 50 kg\*ha<sup>-1</sup> de aceite esencial. En Colombia, se paga por cada plántula unos US\$0,17 y se comercializan bolsas de 50 gramos de producto fresco por valor de US\$0.40, siendo el costo unitario de producción bajo agricultura orgánica, de US\$0,15 por kilo, lo que lo hace económicamente atractivo (TIR= 95%). Desde hace siglos, el tomillo se emplea en cocina por su acción conservadora de las carnes, constituyendo un excelente sazonado.

### ***Composición química del tomillo***

Toda la planta desprende un fuerte aroma al estar provista de glándulas esenciales; existiendo numerosas variedades como el tomillo salsero o blanco, el tomillo mejorano, y el tomillo de loscos. Los romanos lo introdujeron en la cocina, perfumando vinos y quesos.

Dentro de la composición química del tomillo, señalan Rosas y López (2011), refieren que se encuentran compuestos tales como Timol, Carvacrol, Cimol, alcoholes como el Borneol y Linalol; terpenos como Terpineno y Cimeno; flavonoides, fenoles y ácidos como el ácido cafeico, ácido rosmarinico, vitamina B1, vitamina C, manganeso, taninos, saponinas, triterpenoides, tiene aminoácidos como la cistina, valina, glicina, e isoleucina, minerales como el aluminio, calcio, cobalto y magnesio en las hojas, y el hierro en la planta.

### ***Propiedades y usos del tomillo***

En cuanto a las propiedades y uso del tomillo Guerrero y Cols. (2011), señalan que las propiedades digestivas conocidas del Tomillo, son su poder digestivo, estimulante del apetito, antiparasitario, antihelmíntico, anticatarral, antimicrobiano, antiséptico, bactericida, cicatrizante, antiespasmódico, carminativo, expectorante, mucolítico, astringente suave, diafotérico, tonificante, vulnerario.

Esta planta aromática cuenta con numerosas propiedades medicinales, entre las que se destaca la diurética y la antiséptica. Sirve para combatir infecciones, en el tracto digestivo, las vías respiratorias o la piel; provocada por gusanos, hongos y bacterias. También se utiliza para abrir el apetito y para reducir los dolores reumáticos. El té de tomillo se ingiere para combatir la tos, el catarro, las irritaciones del aparato respiratorio e

incluso para favorecer la digestión. En baños de inmersión ayuda a eliminar los efectos de la fatiga, las agujetas y alivia el reumatismo.

El tomillo ha sido utilizado en la cocina y en la medicina durante miles de años. En el antiguo Egipto se utilizaba para embalsamar a los muertos por sus potentes propiedades como preservante y los antiguos griegos lo utilizaban en sus rituales sagrados por su aroma intenso, y como símbolo de coraje. Originario del sureste de Europa, se cree que existen más de 350 variedades de tomillo entre los que se encuentra el tomillo común y el tomillo limonero, que son utilizados frecuentemente en la cocina persa, griega, italiana, francesa y española por nombrar unas cuantas.

Esta hierba culinaria tiene varios compuestos como fitonutrientes, vitaminas y minerales que le otorgan propiedades medicinales que promueven la salud y ayudan a prevenir enfermedades. Entre sus propiedades podemos destacar sus características anti bacteriales y anti fungicidas debido al timol y otros aceites esenciales que se encuentran en esta hierba.

Agreden Guerrero y Cols. (2011), que el tomillo también contiene grandes cantidades de vitaminas y minerales esenciales para la salud; es una de las fuentes más ricas de potasio, hierro, calcio, manganeso, magnesio y selenio. El potasio es esencial para el funcionamiento y control adecuado de los fluidos corporales, ayuda a mantener regulada la presión arterial y el ritmo cardíaco. Esta planta es de los mejores desinfectantes naturales, debido a su enorme riqueza en timol. El tomillo es un potente antiséptico respiratorio que elimina los gérmenes y reduce los síntomas de las infecciones que estos producen, entre ellos la fiebre y el malestar. También es un ingrediente que condimenta la mayoría de platos calientes que son aquellos más susceptibles de contener gérmenes y microbios, el uso de esta especia aromática protege frente intoxicaciones alimentarias. La hierba (*Thymus vulgaris* L.) es una especie aromática, cuyo consumo está aumentando a ritmos que duplican o triplican el crecimiento de la población mundial , generado en gran medida por el uso del aceite esencial en las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica.

Otras propiedades del tomillo incluyen: Tiene un alto contenido de vitamina A, complejo B, vitamina C, E y K, tiene un alto contenido de fibra, presenta propiedades que ayudan contra las infecciones de garganta, ayuda a relajar los músculos. El Tomillo también se usa como expectorante, desinfectante.

### ***Estado del arte del uso de tomillo y otras especias como antimicrobianos***

Medeiros y Cols. (2016), buscaron como objetivo conocer el efecto del uso combinado de aceites esenciales (AEs) de *Origanum vulgare* L. - el orégano (OVEO) y *Rosmarinus officinalis* L. - el romero (ROEO), solo o en combinación en concentraciones subinhibitorias, contra tres bacterias patógenas que son asociadas con verduras frescas frondosas: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella* Enteritidis. Los efectos inhibitorios fueron evaluados determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) y el índice de concentración fraccionario inhibitorio (FICI) y evaluando las células viables, esto incluyó el caldo de verduras y verduras artificialmente infectadas frente al tiempo. La CMI de OVEO fue de 0.6 µl/ml, mientras que la CMI de ROEO fue de 5 µl/ml contra *L. monocytogenes* y *E. coli* y 10 µl/ml contra *S. Enteritidis*. El FICI de los AEs combinado fue de 0.5 µl/ml contra la combinación del inóculo. La incorporación de OVEO y ROEO solo (MIC) o combinado en concentraciones diferentes subinhibitorias en el caldo de verduras causó una disminución del conteo de células viables en todas las pruebas a las 24 h. Asimismo, el AEs solo o en las combinaciones probadas redujo el conteo de células viables de todas las verduras experimentalmente infectadas, además se logró disminuir el conteo de la biota natural (bacterias mesofilas, enterobacterias y hongos). Estas conclusiones refuerzan el empleo de OVEO y ROEO en combinación en concentraciones subinhibitorias para garantizar la seguridad y ampliar la duración de verduras frescas.

Por otro lado, Zhang y Cols. (2016), con su trabajo sobre la actividad antibacteriana y el mecanismo del aceite esencial de canela contra *Escherichia coli* y

*Staphylococcus aureus*, obtuvieron que el aceite esencial de canela mostró actividad antibacteriana eficaz contra los microorganismos causantes del deterioro de alimentos y las bacterias patógenas en los sistemas modelo utilizando *Escherichia coli* y *Staphylococcus* spp. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de AE de canela fue similar para ambas bacterias (1,0 mg/ml) mientras que la concentración mínima bactericida (MBC) fueron de 4,0 mg/ml y 2,0 mg/ml para *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. El análisis cromatográfico (GC-MS) confirmó que el cinamaldehído fue el principal constituyente en el AE de canela (92,40%). Mucho esfuerzo se ha centrado en dilucidar el mecanismo de acción antibacteriana del AE de canela contra *E. coli* y *S. aureus* mediante la observación de los cambios de microestructura celular usando el microscopio electrónico de barrido, la determinación de la permeabilidad celular, la integridad de la membrana y el potencial de membrana. Después de la adición de AE de canela a nivel MIC, hubo cambios evidentes en la morfología de las células de las bacterias que indican el daño celular. Cuando se añadieron AE de canela en los niveles de MBC, se destruyeron las células. El AE de canela condujo a la fuga de pequeños electrolitos, causando un rápido aumento en la conductividad eléctrica de las muestras en las primeras horas. Los valores para *E. coli* y *S. aureus* alcanzaron 60% y 79,4%, respectivamente, a las 7 h. Además, la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en suspensión de células también aumentó con el aumento de AE de canela. La actividad metabólica bacteriana se redujo 3-5 veces como se reflejó por los resultados del potencial de membrana. En general, *S. aureus* fue más susceptible al AE de canela que *E. coli*.

Mazzarrino y Cols. (2015), desarrollaron un estudio de la dinámica de inactivación de *Salmonella* entérica y *Listeria monocytogenes* después del tratamiento con aceites esenciales seleccionados. Veintiún aceites esenciales fueron seleccionados contra 10 cepas de *Salmonella* entérica y 10 cepas de *Listeria monocytogenes*, por difusión en disco, y determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC). Los aceites esenciales más efectivos fueron: orégano, canela, clavo, tomillo rojo, árbol de té, con valores MIC que oscilaron entre 0.6 para el orégano, y de 20 µl/ml para el árbol de té. La dinámica de sobrevivencia microbiana mostró que *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*

ATCC 7644 fueron las cepas más resistentes en presencia de concentraciones incrementadas de más de cinco aceites esenciales activos. En general, cuando las células sobrevivieron en presencia de concentraciones subMIC, la fase logarítmica fue significativamente más larga, y las células murieron rápidamente, inmediatamente después de la exposición a altas concentraciones de aceites esenciales. Particularmente el orégano mostro la mejor actividad antimicrobiana sobre las dos bacterias a bajas concentraciones (0.15 – 5.0 µl/ml).

Igualmente Boskovic y Cols. (2015), realizaron un estudio sobre actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) contra algunos microorganismos transmitidos por los alimentos. El objetivo de este estudio fue el de investigar los efectos antibacteriales de los aceites esenciales (AEs) de orégano y tomillo en algunos alimentos inoculados con bacterias. Los análisis GC-MS de los AEs se llevó a cabo para determinar su composición y los compuestos fenólicos fueron los constituyentes predominantes. La investigación se llevó a cabo con *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina y *Escherichia coli*. Las MICs fueron determinadas por el método de microdilución en caldo. Los AEs mostraron actividad antibacterial contra todos los microorganismos probados.

De la misma forma, Dussault y Cols. (2014), desarrollaron un estudio sobre la evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de varios aceites esenciales comerciales disponibles en el mercado, oleorresina y compuestos puros contra algunos patógenos alimentarios del jamón. En este estudio, sesenta y siete AEs, se utilizaron oleorresinas (OR) y los compuestos puros para evaluar in vitro la actividad antimicrobiana frente a seis patógenos alimentarios. Estos productos fueron evaluados por primera vez para su actividad antimicrobiana usando el ensayo de difusión en disco. Cuarenta y un productos fueron escogidos entonces para su posterior análisis para determinar su concentración inhibitoria mínima frente a 6 bacterias diferentes. Hubo 4 productos diferentes (alil isotiocianato, canela casia china, orégano y tomillo rojo) que mostraron una alta actividad antimicrobiana frente a todas las bacterias probadas. Un análisis más detallado examinó el efecto de cuatro AE seleccionados en el control de la tasa de crecimiento de cultivos mixtos

de *Listeria monocytogenes* en el jamón. Se observó una reducción de la tasa de crecimiento en un 19 y un 10% cuando se añadieron AE del orégano y canela cassia, respectivamente, en el jamón en una concentración de 500 ppm.

Kasrati y Cols. (2014), trabajaron sobre la actividad antioxidante y efecto sinérgico del *Thymus saturejoides* y aceites esenciales con cefixima contra una serie seleccionada de bacterias transmitidas por alimentos, mencionan que el *Thymus saturejoides* (T.s.) es un arbusto perenne salvaje distribuido en zonas áridas y semi áridas de las montañas marroquíes. Los aceites esenciales de esta especie son bastante usados en la industria alimenticia y farmacéutica por sus amplias propiedades biológicas y farmacológicas. No existen datos sobre la actividad antibacterial y antioxidante del AE de T.s en relación con la variabilidad química de las especies. Así mismo, no ha sido investigado el potencial de interacción sinérgica del AE de esta especie como un agente microbiano natural con antibióticos convencionales contra las bacterias. Además, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar los aceites volátiles constituyentes de los AEs de una población de tres T.s. marroquíes traídos del noroeste y sureste de marruecos, respectivamente. Así fue determinada la actividad antioxidante y su potencia antibacterial (sola y combinada con cefixime) contra bacterias transmitidas por alimentos. Los análisis de CG-MS mostraron 30 compuestos que representan del 98,6 al 99,5% de la totalidad de los aceites. La mayor parte de constituyentes identificados fueron el Carvacrol (45,3%), *p*-Cimeno (8,9%), Linalol (8,4%) y Borneol (7,5%) en el aceite de la población Er-Rich (terreno árido), mientras que en el aceite de de la población Ourika (terreno medio árido) abundó el Carvacrol (26,5%), Borneol (20,1%), canfeno (8,0%) y  $\gamma$ -Terpineno (5,6%); finalmente el Carvacrol (25,3%), Borneol (19,7%), canfeno (7,6%), y *p*-Cimeno (6,6%) fueron los constituyentes abundantes obtenidos en los aceites de la población Taws (terreno menos árido). El aceite esencial obtenido de la población Er-Rich mostró la mayor actividad antioxidante medida por 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en habilidad de barrido de radicales libres, potencial reductivo y ensayos con ácido  $\beta$ -caroteno/linoléico con valores de 44,54 $\pm$ 0,92  $\mu$ g/ml, 22,90 $\pm$ 0,16  $\mu$ g/ml y 19,17 $\pm$ 0,01  $\mu$ g/ml, respectivamente. Las pruebas mostraron que los aceites de estas especies tienen una alta actividad inhibitoria

contra las bacterias utilizadas, con excepción de *Pseudomonas aeruginosa*. La mayor actividad potencial fue observada con el aceite obtenido de la población Er-Rich con una MIC y una MBC de 0,14 a 0,55 mg/ml y de 0,28 a 0,55 mg/ml, respetivamente. De las 21 combinaciones probadas entre AEs y cefixime, el 67% mostró sinergismo total, el 19% tuvo una interacción sinérgica parcial y 14% no mostró efectos. El aceite de la población Er-Rich mostró el mayor efecto sinérgico con antibióticos (El Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionario (FIC) fue de 0,29 a 0,5 mg/ml). La sinergia desplegada por esta combinación de AE y cefixime puede tener un potencial benéfico para el control de bacterias transmitidas por alimentos, permitiendo consecuentemente el uso de dosis más bajas de antibióticos estándar.

Una investigación sobre la prevalencia y resistencia antimicrobiana de especies de *Salmonella* spp. aisladas de carne pollo producidas por diferentes operaciones integradas en Korea, desarrollada por Kim y Cols. (2012), determinó la prevalencia y los perfiles de resistencia antimicrobiana de los serotipos de *Salmonella* spp. aisladas de 7 marcas de carne de pollo producidos por diferentes operaciones de engorde integrada en Corea. En total, se recogieron 210 muestras de los supermercados minoristas en Seúl, Corea del Sur, y se analizaron para detectar la presencia de *Salmonella*. De 210 muestras de carne de pollo, la prevalencia de *Salmonella* en general fue de 22,4%. *Salmonella* Enteritidis fue el serotipo dominante, con una tasa de aislamiento de 57,4% de los pollos positivos para *Salmonella*, seguido de *Salmonella* Montevideo. *Salmonella* frecuentemente aisladas fueron resistentes a varios antibióticos, incluyendo 100% a la eritromicina, 87% a cefalotina, 85% al ácido nalidíxico, y 70% a la estreptomina. De los 47 aislamientos, 41 (87,2%) cepas fueron resistentes a 3 o más antibióticos. Por otra parte, los perfiles de *Salmonella* de cada marca de carne de pollo eran diferentes por la operación de pollos de engorde. La marca A mostró la más alta prevalencia de *Salmonella* (18 aislamientos, 60%), mientras que la marca G mostró la menor prevalencia (un aislado, 3,3%). Ocho entre los 18 aislamientos de marca A fueron resistentes a 11 antibióticos, mientras que 5 de los 6 aislamientos de marca C eran resistentes a sólo 2 antibióticos. Este estudio demuestra que una alta proporción de carne de pollo en Corea está contaminada con *Salmonella* y los

patrones de prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Salmonella* de la carne de pollo difieren significativamente según la operación integrada de engorde de los pollos.

En su trabajo Soković y Cols. (2010), investigó sobre efectos antibacteriales de los aceites esenciales de hierbas comúnmente consumidas usando un modelo *in vitro*, determinaron la composición química y la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de 10 hierbas comúnmente consumidas: *Citrus aurantium*, *C. limon*, *Lavandula angustifolia*, *Matricaria chamomilla*, *Mentha piperita*, *M. spicata*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* y *Salvia officinalis*. La actividad antibacteriana de estos aceites y sus componentes principales; es decir, Alcanfor, Carvacrol, 1,8-Cineol, Linalol, Acetato de Linalilo, Limoneno, Mentol,  $\alpha$ -Pino,  $\beta$ -Pino y Timol se ensayaron contra los patógenos humanos *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Micrococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis, *S. epidermidis*, *S. Typhimurium*, y *Staphylococcus aureus*. La actividad más alta y la más amplia fue mostrado por el aceite de *O. vulgare*, y el Carvacrol tuvo la mayor actividad antibacteriana entre los compuestos probados.

De la misma forma Oliveira y Cols. (2010), realizaron una investigación sobre aceites esenciales de tomillo y romero, en el control de *Listeria monocytogenes* en carne cruda, este estudio fue desarrollado con el fin de evaluar dos alternativas para el control de *Listeria monocytogenes* en piezas de carne de bovino en bruto, ambos basados en el uso de aceites esenciales (AEs) de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis*. La actividad antilisterial de diferentes concentraciones de AEs se ensayó *in vitro* usando técnicas de dilución y la volatilización de disco de agar. Además, *L. monocytogenes* se inoculó en piezas de carne, que fueron sumergidas en los recubrimientos de gelatina comestible conteniendo 2% (v/v) de AEs o expuestos al vapor de AEs ( $0,74 \mu\text{l}/\text{cm}^3$ ). *L. monocytogenes* se cuantificó después de 1, 48 y 96 horas de almacenamiento ( $7^\circ\text{C}$ ). En los ensayos *in vitro*, el AE de *T. vulgaris* presentó mayor actividad. Las dos opciones que se utilizaron (revestimiento de gelatina comestible y actividad de vapor), a pesar de los efectos con comportamientos diferenciados, presentaron actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes* inoculadas en carne de vacuno. Se obtuvo mayor actividad antibacteriana

en el experimento que usó recubrimientos comestibles conteniendo AE. A las 48 horas de almacenamiento la reducción en los recuentos bacterianos estuvo entre 1,09 a 1,25 Log<sub>10</sub>UFC/g. En el experimento del efecto del vapor, de acuerdo a la evaluación de *T. vulgaris*, se conoció que causó la mayor reducción en la población de bacterias inoculadas en carne de vacuno en bruto ( $p < 0,05$ ), 0,40 Log<sub>10</sub> UFC/g a las 96 horas de almacenamiento. Este estudio suministra información importante acerca de las nuevas y prometedoras alternativas naturales, basado en el concepto de envase activo, para el control de *L. monocytogenes* en la industria cárnica.

En la investigación desarrollada por O'Bryan y Cols. (2008), sobre aceites esenciales de la naranja con actividad antimicrobiana contra *Salmonella* spp., dieron a conocer que los aceites esenciales de siete cítricos (AEs) fueron seleccionadas para evaluar su actividad antibacteriana contra 11 serotipos/cepas de *Salmonella* mediante pruebas de difusión en agar. Se seleccionaron los 3 aceites más activos para determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) contra el mismo microorganismo. Los terpenos de naranja, d-limoneno simple, y los terpenos de esencia de naranja exhibieron actividad inhibitoria contra *Salmonella* spp. en los ensayos de difusión en disco. Los AEs fueron estabilizados en caldo por la adición de 0,15% (w/v) de agar para la ejecución de las pruebas de CIM. Tanto los terpenos de la naranja como el d-limoneno presentaron CIM de 1%. El compuesto más activo, los terpenos de la esencia de naranja, produjo un MIC que varió de 0,125% a 0,5% frente a las 11 cepas de *Salmonella* evaluadas. El análisis de GC-MS reveló que el aceite de la esencia de naranja estaba compuesto principalmente de d-limoneno (94%) y Mirceno (3% aprox.). Los AEs de cítricos ofrecen un potencial para ser usados como antimicrobianos naturales mejorando la seguridad de todos los alimentos naturales u orgánicos.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto del aceite esencial obtenido a partir del tomillo (*Thymus vulgaris*), sobre el crecimiento de *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Paratyphi* en superficies de carne cruda bovina refrigerada.

### **Objetivos Específicos**

- 1) Extraer el aceite esencial de tomillo, mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor.
- 2) Determinar la composición química volátil del aceite esencial comercial y experimental de tomillo (*Thymus vulgaris*) mediante cromatografía de gases.
- 3) Establecer la actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria del aceite esencial comercial y experimental obtenido a partir del tomillo, mediante pruebas de sensibilidad in vitro y pruebas in vivo en piezas de carne.
- 4) Comprobar si existen diferencias significativas en el porcentaje de reducción de *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Paratyphi*, asociadas a la temperatura y/o concentración de aceite comercial y experimental obtenido del tomillo.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Obtención de los Aceites Esenciales (Ae) De Tomillo**

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se emplearon dos fuentes de aceite esencial de tomillo: un aceite comercial elaborado por la industria NOW Foods (Bloomington, IL, USA) y otro aceite experimental extraído a partir de plantas de tomillo adquiridas en el mercado local.

##### *Aceite comercial*

De acuerdo con las condiciones declaradas tanto en la etiqueta del aceite comercial (figura 1) como en la web del fabricante (<https://www.nowfoods.com/essential-oils/white-thyme-oil>), este producto es 100% aceite esencial puro obtenido a partir de las flores de dos variedades de tomillo blanco: el tomillo vulgar o común (*Thymus vulgaris*) y el tomillo salsero (*Thymus zygis*), mediante un método de destilación por vapor. (Ver Figura 1, página 37)

##### *Aceite experimental*

El segundo tipo de aceite esencial se obtuvo a partir de hojas y tallos de tomillo vulgar, en estado seco, en una cantidad de un bulto, adquirido en el comercio local y se extrajo mediante el método de destilación por arrastre de vapor empleando una planta

piloto con capacidad de 25 kg de la Universidad de Pamplona, extensión Villa del Rosario.  
(Ver Figura 2, página 37)

**Figura 1.** Presentación comercial del aceite esencial de tomillo blanco obtenido de dos variedades *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis*.



Fuente: <https://www.nowfoods.com/essential-oils/by-type/pure-oils>

**Figura 2.** Selección y pesaje del tomillo por paquetes de 500 gramos.



Fuente: Karen Martínez. 2017

**Figura 3.** Montaje de la planta piloto para extracción de aceite esencial del tomillo en Laboratorio de Química de la Universidad de Pamplona, extensión Villa del Rosario.



Fuente: Karen Martínez. 2017. Los aceites se almacenaron en viales color ámbar a 4°C, hasta su caracterización y uso.

**Figura 4.** Montaje de destilación por arrastre de vapor.



Fuente: Karen Martínez. 2017

## Determinación de la Composición Química de los Aceites Esenciales

### *Cromatografía de gases – espectrofotometría de masas de aceites esenciales del tomillo*

Se llevó a cabo una determinación de la composición volátil (cantidad relativa, % e identificación presuntiva) empleando cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS), operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (*full scan*), de las muestras que se identificaron como Aceite 1 y aceite 2. La preparación y el análisis cromatográfico se desarrolló por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS); Procedimiento CM-PTSE-04, versión 01, 2014-04-04; basado en la norma ISO 7609, 1985(E): *Essential oils- Analysis by gas chromatography on capillary columns- General method*.

La preparación de las muestras se llevó a cabo por dilución e inyección de los aceites al equipo cromatográfico. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases AT 6890 *Series Plus* (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (Agilent Technologies, MSD 5975) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*). Las columnas empleadas en el análisis fue DB-5MS (J y W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) (5%-fenil\_poli(dimetilsiloxano), 60 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m). La inyección se realizó en modo Split (30:1),  $V_{iny}=2 \mu$ l.

### *Características físicas y organolépticas del AEc y del AEe de tomillo*

Para la determinación de la densidad relativa, es una comparación de la [densidad](#) de una sustancia con la densidad de otra que se toma como referencia. Ambas densidades se expresan en las mismas unidades y en iguales condiciones de temperatura y

presión. La densidad relativa es adimensional (sin unidades), ya que queda definida como el cociente de dos densidades.

Para esto se tomó un picnómetro y se pesó vacío, luego se llenó con 1 ml del aceite y se pesó nuevamente, y también se tuvo en cuenta el volumen del picnómetro para finalmente aplicar la fórmula:

$$\frac{W_{\text{picnómetro + aceite}} - W_{\text{picnómetro vacío}}}{v_{\text{picnómetro}}}$$

El porcentaje de rendimiento se basó en la mezcla de las hojas frescas y secas del tomillo.

El olor y color se determinó por observación.

### ***Evaluación de la Actividad Antimicrobiana***

Previa a la determinación de la actividad microbiana, el tomillo obtenido, fue sometido a la determinación de *Salmonella spp*, siguiendo el método NTC 4574 (ICONTEC, 2007), para lo cual se tuvo en cuenta:

- 1) Pre enriquecimiento No selectivo en medio líquido donde se utilizó agua tamponada, siendo éste, un medio nutritivo no selectivo que permite restaurar las células de salmonella dañadas a una condición fisiológica estable. Para esto se pesaron 25 gramos del tomillo y se diluyeron en 225 ml de agua peptona, el ensayo se realizó por triplicado. Se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.
- 2) Enriquecimiento selectivo en medio líquido, el cual es empleado con el propósito de incrementar la población e inhibir otros microorganismos presentes, para esto se empleó el caldo Rappaport, tomando 1 ml del cultivo de pre enriquecimiento y llevando a un tubo que contenía 10 ml del caldo, e incubado a 41.5 °C, por 24 horas.

- 3) Aislamiento diferencial: se tomó una asada y se estrió en los medios sólidos Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), en agar Hecktoen, los cultivos fueron llevados a 37°C por 24 horas.
- 4) Interpretación de resultados: en agar XLD, *Salmonella spp* desarrolla colonias rojas con centro negro por la producción de ácido sulfhídrico. En agar entérico Hecktoen, las colonias típicas son verdes o azul verdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.
- 5) Confirmación bioquímica: en caso de presentar colonias características en los agares mencionados anteriormente, se procede a sembrar en agar citrato, agar TSI, agar LIA, agar SIM, Caldo urea.

### ***Microorganismos y condiciones de desarrollo***

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon las cepas de *Salmonella enteritidis* ATCC 17036 y *Salmonella paratyphi* ATCC 9150 obtenidas del cepario de la Universidad de Pamplona, Colombia, y mantenidas en agar nutritivo a 4°C. Los dos microorganismos fueron cultivados en caldo nutritivo y caldo tripticasa de soya, a 37°C por 24 horas antes de su uso.

#### Estandarización del inóculo:

A partir de las cepas se tomó un inóculo, y se llevó a un tubo que contenía cloruro de bario 0.18 M, y ácido sulfúrico 0.048 M, con 0,5 y 99,5 ml respectivamente, el tubo fue llevado a incubar a 37°C, por 2 a 4 horas, y se ajustó a 0.5 de la escala de MacFarland, hasta obtener  $1,5 \times 10^8$  células por mililitro, medida de densidad que se tomó con un espectrofotómetro con una absorbancia de 0.08 a 0,10.

### **Determinación de la Actividad Antibacteriana por Método de Difusión en Disco**

La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en disco, descrita por Costa *et al.*, (2013), con algunas modificaciones. Las cajas de Petri fueron preparadas con agar Mueller-Hinton (BBL Becton Dickinson and Company).

Las placas se inocularon, mediante siembra masiva, con 0,1 ml de  $10^4$  ufc/ml del inóculo estandarizado, tanto de *Salmonella enteritidis* como de *Salmonella paratyphi*, cada inóculo se le permitió secar por 5 minutos.

Posteriormente, discos estériles de papel filtro de 9 mm de diámetro fueron impregnados con 30 microlitros del aceite esencial a las concentraciones de 10%, 20%, 30%, 40% y 50% de cada aceite a evaluar, y seguidamente se ubicaron sobre la superficie de agar Mueller Hinton inoculada con cada microorganismo. Con base a Ramírez y Castaño (2009) las placas se dejaron por 15 minutos a 4°C para así permitir la predifusión de los aceites esenciales antes de la incubación.

A continuación, las placas se incubaron a temperaturas apropiadas de  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por 18 horas, de acuerdo a lo descrito por López y Cols. (2006). El método estándar recomienda que todas las determinaciones finales, se lleven a cabo exactamente a las 18 horas, pues se ha establecido que este es el periodo en el que la reactividad entre los microorganismos y los efectos inhibidores de los antibióticos es óptima, siendo además los bordes de las zonas de inhibición más nítidos. Si la interpretación se demora más allá de ese tiempo, se pueden producir alteraciones en el halo por desecación del agar, por deterioro del antibiótico o por sobredesarrollo de las colonias.

Terminada la incubación, se midieron los halos de inhibición en milímetros, incluyendo el diámetro del papel filtro y los resultados fueron interpretados con base a la Celikel y Kavas (2008), -ver Tabla7-.

Los experimentos se realizaron por triplicado. Los microorganismos a estudiar también fueron sometidos a evaluación con discos impregnados con etanol absoluto como control negativo, y como control positivo con *Salmonella enteritidis* y *paratyphi*.

**Tabla 7.** Clasificación de la sensibilidad individual de aceites esenciales por el diámetro de las zonas de inhibición.

DIAMETRO	INTERPRETACION
Menor de 8 mm	No sensibles
Entre 9 y 14 mm	Sensibles +
Entre 15 y 19 mm	Muy sensibles ++
Mayor a 20 mm	Extremadamente sensibles +++

Fuente: Celikel y Kavas (2008)

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (CMB)**

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria CMI se realizó utilizando el método de macrodilución en caldo. Para este ensayo tubos con 9,8ml de caldo nutritivo estéril fueron adicionados con mezclas de 0,1 ml de la suspensión bacteriana ajustada al patrón 0,5 McFarland, simultáneamente, y 0,1ml de las concentraciones de aceite esencial comercial (AEc) y experimental (AEe) de tomillo de acuerdo con los resultados de la difusión en agar (Las mezclas fueron realizadas con una hora de antelación y mantenidas a 37°C). Los tubos fueron incubados a 37°C durante 18 horas. Uno de los tubos no contenía AE, los cuales sirvieron como controles de desarrollo o testigos.

La menor concentración donde no se observó aumento de turbidez (crecimiento de las bacterias) en cualquiera de los triplicados fue tomada como la CMI, esta es la menor

concentración de antibiótico o antimicrobiano expresada en mg/ml, que inhibe el desarrollo *in vitro* de las bacterias.

Después de determinar la CMI se sembró a partir de los tubos que no mostraron incremento en la turbidez, con 0,1ml en superficie sobre agar nutritivo para comprobar que realmente se inhibió el crecimiento. A partir de estos tubos se pudo determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB), que es la menor concentración de antibiótico o antimicrobiano, que no solo inhibe el desarrollo de las bacterias, sino que también las destruye. Para esto, se efectuó el subcultivo del contenido de los tubos visualmente claros en placas de agar nutritivo, observándose el desarrollo o no de colonias viables. El primer tubo de la serie que al ser sembrado no da lugar al desarrollo de colonias, representa la CMB de los antimicrobianos en estudio.

### ***Evaluación del Efecto de los Aceites Esenciales y la Temperatura de Refrigeración sobre Salmonella en Carne***

#### ***Preparación de la carne***

La carne de res fue adquirida en supermercado reconocido, y proveniente del matadero FRIOGAN, la cual se cortó en trozos de 1 cm<sup>2</sup>; luego se desinfectaron con 540 ppm de citrosan (Figura 8). Posteriormente se enjuagó con agua destilada estéril, y una fracción de 25 gramos de los cortes se sometió a detección de *Salmonella* mediante el método NTC 4574 para controlar la ausencia de *Salmonella* en las piezas de carne. Así mismo, se realizaron análisis de aerobios mesófilos y mohos y levaduras, para descartar contaminación microbiana de las carnes.

Se tomaron 10 gramos de la carne y se llevó a una fiola con 90 ml de agua tamponada, y se hicieron diluciones hasta 10<sup>-3</sup>, y se sembró de 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>, por placa

profunda, empleando agar plate count y agar saboraud. Los cortes restantes fueron envueltos en envoplast estéril y llevados a congelación hasta obtener los resultados de *Salmonella* spp.

**Figura 5.** Preparación de los trozos de carne, antes de la inoculación.



Fuente: Karen Martínez. 2017.

### ***Microorganismos y condiciones de desarrollo***

Las cepas de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Paratyphi se mantuvieron en caldo TSB Tripticasa soya,(Acumedia,) a 4°C. El inóculo de los microorganismos fue preparado por desarrollo de las células en caldo nutritivo por 24 horas a 37°C. La suspensión de las células fue diluida con agua peptona (Acumedia ) para proveer un conteo inicial de células cercanas a  $1.5 \times 10^8$  ufc/ml (McFarland 0.5). Se transfirieron 0,1 ml del cultivo a 9,9 ml de caldo nutritivo, 24 horas antes de cada experimento.

### ***Inoculación de Salmonella spp. en carne de res***

Para inocular la carne se empleó el procedimiento descrito por Dussault y Cols. (2014), con algunas modificaciones. Después de un periodo inicial de 24 horas en

incubación en caldo tripticasa soya, las bacterias fueron resuspendidas en TSB, e incubadas por 24 horas previas al experimento para obtener cultivos de trabajo de aproximadamente  $10^9$  ufc/ml. El día de la inoculación de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Paratyphi, en las piezas de carne, el cultivo de cada una fue llevado a una concentración de  $10^4$  veces en agua peptona, con el fin de preparar una solución del inóculo entre  $10^4$  a  $10^5$  ufc/ml, para obtener una concentración final de  $10^3$  a  $10^4$  ufc/g en los trozos de carne (Figura 9).

**Figura 6.** Inoculación de las piezas de carne.



Fuente: Karen Martínez, 2017.

### *Efecto de los aceites esenciales*

Una vez inoculadas las piezas de carne, se impregnaron individualmente y por aspersión cada pieza de carne con cinco concentraciones diferentes tanto del aceite esencial comercial como del aceite experimental, más los controles. Se organizaron en cajas plásticas estériles y llevadas a incubar a las tres temperaturas a evaluar:  $0^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  y  $10^{\circ}\text{C}$ , durante 24, 48 y 72 horas. Adicionalmente se emplearon controles consistentes en cajas

con piezas de carne que llevaban solo etanol, otras solo con el aceite esencial y otras con el control positivo. Todo el experimento fue realizado por triplicado.

### ***Análisis microbiológico***

Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó un trozo de carne y se llevó a tubos preparados con agua peptona, se sembró en placa profunda 1 ml de la respectiva dilución adicionando agar TSA, e incubando a 37°C por 24 horas. Posteriormente se hizo un conteo del número de colonias que se presentó en el agar y se comparó frente al conteo inicial de colonias, que fue de 4 Log<sub>10</sub> ufc/g para determinar el porcentaje de reducción a cada intervalo de tiempo en cada tratamiento empleado.

### ***Análisis de los datos***

El efecto de los aceites esenciales, el comercial y el experimental, para controlar el crecimiento de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella paratyphi*, en piezas de carne cruda bovina refrigerada fue evaluado mediante la determinación de la velocidad de crecimiento/muerte durante 72 horas empleando análisis de regresión no lineal con el software DMFit, así mismo se determinó el porcentaje de reducción por comparación de la carga microbiana final frente a la inicial.

### ***Análisis Estadístico***

Para el proceso estadístico se empleó un diseño experimental en bloques completamente aleatorizado (DBCA) con 3 réplicas para cada tratamiento estudiado, de tal forma que las unidades experimentales cubrieron todas las posibles combinaciones de los

diferentes niveles a evaluar para cada factor. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los valores promedio se representaron gráficamente. La evaluación estadística se realizó mediante análisis de varianza ANOVA/MANOVA, y se empleó la prueba de múltiples rangos de Tukey-HSD para la comparación de medias y encontrar diferencias estadísticamente significativas a un valor  $p < 0,05$ , empleando el software Statgraphics Centurion XV.II para Windows. En el caso de los valores atípicos, se recurrió a una Prueba de Kruskal-Wallis, la cual compara las medianas en lugar de las medias. A través de Gráficos de Medias y Gráficos de Interacciones, se interpretó si hay efectos y cuáles de ellos fueron significativos.

Los porcentajes de reducción final de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella paratyphi* se determinaron comparando la media de los recuentos para cada intervalo de tiempo (24h, 48h y 72h) frente al recuento inicial (0h). Con estos datos se determinó la velocidad media de muerte, mediante análisis de regresión no lineal para cada tratamiento usando el software DMFit.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Caracterización Físicoquímica de los Aceites Esenciales de Tomillo

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se usaron dos fuentes de aceite esencial (AE) de tomillo: un aceite comercial (AEc) elaborado por la industria NOW Foods Bloomingdale (IL, USA) y otro aceite experimental (AEe) extraído a partir de plantas de tomillo adquiridas en el mercado local mediante un método de destilación con vapor.

En la tabla 8 son mostradas algunas características físicas y organolépticas del AEc de tomillo, mientras que en la tabla 9 se presentan las características físicas y organolépticas del AEe de tomillo.

**Tabla 8.** Características físicas y organolépticas del AEc de tomillo.

Propiedad	Valor
Densidad relativa (mg/ml)	925,0 ± 0,14
Índice de refracción (25°C)	1,497 ± 0,007
Porcentaje de rendimiento de la extracción (%)	n.d.
Olor	Característico
Color	Amarillo claro

n.d. No determinado.

**Tabla 9.** Características físicas y organolépticas del AEe de tomillo.

Propiedad	Valor
Densidad relativa (mg/ml)	926,2 ± 0,20
Índice de refracción (25°C)	1,436 ± 0,005
Porcentaje de rendimiento de la extracción (%)	0,15 <sup>1</sup>
Olor	Característico
Color	Amarillo claro

<sup>1</sup> El rendimiento está basado sobre una mezcla de hojas y tallos frescos y secos.

Como puede apreciarse en las tablas 8 y 9, la composición física tanto del AEc como del AEe es similar en términos de densidad, índice de refracción, olor y color. En cuanto al porcentaje de rendimiento obtenido solo pudo determinarse en el aceite experimental alcanzando un valor de 0,15%, valor que está dentro del rango nominal de contenido de aceites esenciales de hierbas y especias. En este sentido Tajkarimi *et al.* (2010) reportan que las hierbas y especias contienen aceites esenciales (AEs) en un rango de 0,05% a 0,1%.

### Determinación de la Composición Química de los Aceites Esenciales del Tomillo

En la tabla 10 se recoge la composición química de los AE comercial y experimental obtenidos mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS), mostrando el tiempo de retención expresado en minutos, el componente identificado tentativamente y la cantidad relativa (% de abundancia). La identificación presuntiva de cada compuesto se realizó mediante los espectros de masas (EI, 70eV) obtenidos para cada pico, comparándolos con los de la biblioteca multimedia HP Wiley 275.L Mass Spectral Library (Hewlett Packard, rev. D 01.00), y las bases de datos de Adams y NIST. Así mismo, se compararon los tiempos de retención para cada pico con los tiempos de retención hallados en la bibliografía para aceite esencial de tomillo obtenido mediante GC-MS acoplados con columnas tipo DB-5 o similares.

**Tabla 10.** Identificación presuntiva y cantidad relativa (% abundancia) de los componentes presentes en las muestras de aceite esencial de tomillo comercial y experimental.

Pico	Aceite Esencial Comercial			Pico	Aceite Esencial Experimental		
	t <sub>R</sub> (Min)	Compuesto	Abundancia relativa (%)		t <sub>R</sub> (Min)	Compuesto	Abundancia relativa (%)
1	16,88	α-Tujeno	0,1	1	16,88	α-Tujeno	1,1
2	17,25	α-Pineno	1,2	2	17,25	α-Pineno	4,2
				3	18,02	Canfeno	1,3

				4	18,99	Sabineno	0,2
3	19,25	$\beta$ -Pinoeno	0,3	5	19,25	$\beta$ -Pinoeno	0,7
4	19,62	$\beta$ -Mirceeno	0,1				
				6	20,45	$\alpha$ -Felandreno	0,3
5	20,56	s-3-Careno	0,1				
6	20,91	$\alpha$ -Terpineo	0,3	7	20,91	$\alpha$ -Terpineo	1,7
7	21,32	<i>p</i> -Cimeno	30,3	8	21,26	<i>p</i> -Cimeno	43,8
8	21,46	Limoneno	0,6	9	21,54	Limoneno	4,2
9	21,56	$\beta$ -Felandreno	0,2	10	21,61	$\alpha$ -Felandreno	1,3
10	21,62	1,8-Cineol	0,4	11	21,66	1,8-Cineol	2,1
11	22,69	$\gamma$ -Terpineo	8,4	12	22,65	$\gamma$ -Terpineo	1,9
				13	23,79	Terpinoleno	0,6
				14	23,98	<i>p</i> -Cimeno	0,2
12	24,35	Linalol	4,1	15	24,32	Linalol	2,7
13	27,40	Borneol	0,4	16	27,39	Borneol	0,1
14	27,65	Terpinen-4-ol	0,5	17	27,65	Terpinen-4-ol	1,4
15	28,20	$\alpha$ -Terpineol	1,6	18	28,18	$\alpha$ -Terpineol	0,5
16	31,75	Timol	45,3	19	31,63	Timol	5,7
17	32,00	Carvacrol	2,1				
18	36,76	<i>Trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	3,3	20	39,76	<i>Trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	6,2
				21	37,05	$\beta$ -Copaeno	1,2
19	37,97	$\alpha$ -Humuleno	0,4	22	37,97	$\alpha$ -Humuleno	0,5
				23	38,49	$\gamma$ -Muurolo	2,3
				24	38,57	<i>ar</i> -Curcumeno	1,6
				25	39,07	NI, Compuesto M+204	0,7
				26	39,74	$\gamma$ -Cadineno	1,2
				27	39,83	<i>s</i> -Cadineno	3,3
				28	39,97	Calameneno	1,6
				29	40,61	$\alpha$ -Calacoreno	0,3
				30	41,745	Espatuleno	1
				31	41,94	Oxido de cariofileno	0,9
				32	45,97	Xantorrizol	0,5
				33	62,36	Diisooctil ftalato	4,5

$t_R$ = tiempo de retención.

En la tabla 10 puede observarse que en el aceite esencial comercial se encontraron 19 componentes, los cuales fueron identificados plenamente (100%), mientras que del aceite esencial obtenido en laboratorio se encontraron 33 componentes, de los cuales se identificaron plenamente 32 (97%). Igualmente, para el aceite comercial de tomillo el 80% de abundancia relativa quedó representado por dos componentes mayoritarios: Timol (45,3%) y *p*-Cimeno (30,3%) y una menor proporción de  $\gamma$ -Terpineno (8,4%); mientras que en el aceite experimental esta composición relativa varía sustancialmente, siendo representada mayoritariamente por el *p*-Cimeno (43,8%) y en menor proporción por el *Trans*- $\beta$ -Cariofileno (6,2%), Timol (5,7%),  $\alpha$ -Pineno y Limoneno (4,2% cada uno). Esta composición tanto del AEc como del AEe es similar a otros aceites esenciales obtenidos de la misma especie de planta con variación en sus porcentajes de abundancia. Cabe destacar que en el AEe las cantidades de Timol fueron bajas y no se encontró la presencia de Carvacrol, a diferencia de lo visto en el AEc, donde los dos compuestos estaban presentes. En este sentido, autores como D'Auria y Cols. (2005) han encontrado relación entre la producción de Timol y la presencia o ausencia de Carvacrol, lo que parece estar conforme a los resultados encontrados en este estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos son similares a los encontrados por Guerrero y Cols. (2011), quienes hallaron cuatro componentes principales en el aceite esencial de tomillo cultivado hidropónicamente en dos soluciones nutritivas y tres densidades de siembra. Estos componentes fueron el Timol, *p*-Cimeno,  $\alpha$ -Terpineno y Carvacrol, los cuales presentaron una abundancia media de 23,3%, 7,4%, 4,9% y 1,1%, respectivamente. Los resultados de la presente investigación, también son similares a los encontrados por Omidbaigi y Arjmandi (2002), quienes indican que el timol fue el componente mayoritario del aceite esencial de esta especie. Sin embargo, la composición de Timol puede oscilar entre 10% a 64% en Lens y Colaboradores (1987), el *p*-Cimeno entre un 10% a un 56% en Daferera y Cols. (2000) y Juliano y Cols. (2000), por su parte Cosentino y Cols. (1999) y Marino y Cols. (1999) refieren el  $\gamma$ -Terpineno en valores de 2% al 31%, y McGimpsey y Cols. (1994) señalan que puede aparecer el Carvacrol entre un 2% a un 11%.

La menor variabilidad de compuestos identificados en el aceite comercial puede ser indicativo de una mayor pureza del mismo, tal y como referencia el proveedor tanto en la etiqueta del aceite comercial como en la web del fabricante (<https://www.nowfoods.com/essential-oils/white-thyme-oil>) (100% pureza). Así mismo, debe considerarse que se trata de un aceite esencial obtenido de dos variedades de tomillo blanco en estado floral: el tomillo vulgar o común (*Thymus vulgaris*) y el tomillo salsero (*Thymus zygis*), mediante un método de destilación con vapor en condiciones estandarizadas a escala industrial, mientras que el segundo tipo de aceite esencial se obtuvo a partir de hojas y tallos secos y frescos de tomillo vulgar adquirido en el comercio local, desconociendo entre otros el estado fenológico de la planta o las condiciones de cultivo, lo cual puede aportar una menor pureza, menor abundancia de componentes activos y mayor variedad de componentes tal y como se ve reflejada en la tabla anterior. Además, debe considerarse que la extracción se realizó mediante un método de destilación con arrastre de vapor empleando una planta piloto con capacidad de 25 kg, la cual a pesar de haberse limpiado puede contener trazas de otros elementos vegetales que aportan sus componentes en menor cuantía al aceite esencial experimental. Guerreo y Cols. (2011) y McGimpsey y Cols. (1994) reportan que la etapa fenológica de la planta también influye en la producción mayoritaria de metabolitos secundarios (aceites esenciales), siendo la floración la época de mayor acumulación.

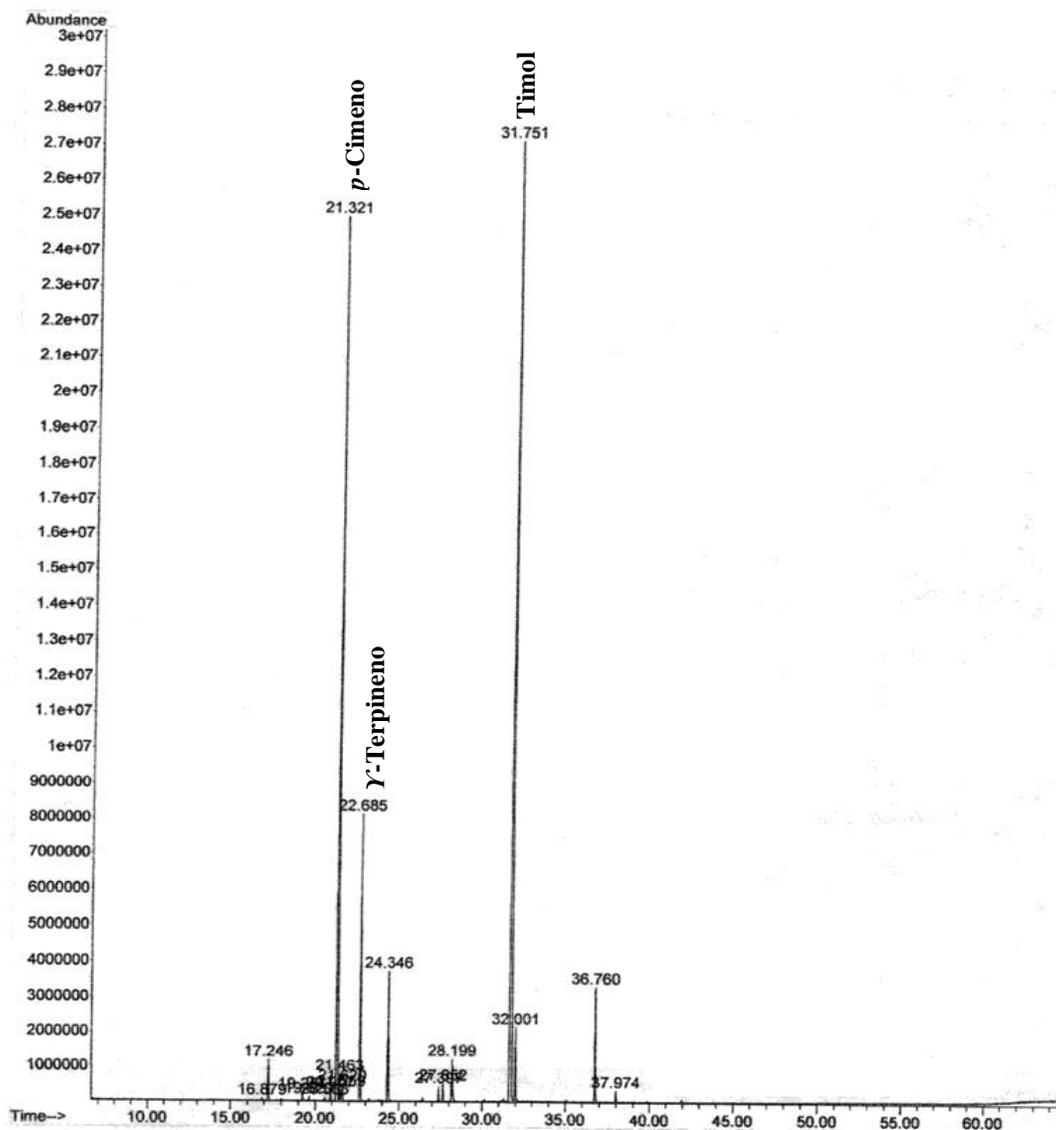
Por otra parte, también se evidencia la presencia de compuestos que pueden considerarse contaminantes en el AEe como el Diisooctil-ftalato encontrado a los 62,36 minutos (pico 33), el cual puede estar asociado a la presencia de elementos plásticos y cuyo origen puede provenir probablemente de los filtros o las mangueras de conducción de agua del equipo de destilación, ya que los ftalatos o ésteres de ácido ftálico son un grupo de compuestos químicos principalmente empleados como plastificadores (sustancias añadidas a los plásticos para incrementar su flexibilidad). Uno de sus usos más comunes es la conversión del poli cloruro de vinilo (PVC) de un plástico duro a otro flexible. Este resultado fue similar al obtenido por Cabeza (2013), quien encontró la presencia de un compuesto similar (Isooctilbutil-ftalato) cuando empleó un equipo de destilación por

arrastre de vapor para la obtención del extracto orgánico de *Plutarchia coronaria* en la Universidad de Pamplona.

En la figura 10 se muestra la corriente iónica total reconstruida (cromatograma) de los compuestos volátiles del aceite esencial comercial de tomillo analizadas por GC-MS operado en el modo full scan, mientras que en la figura 11 se presenta el espectro de masas del  $\gamma$ -Terpineno obtenido en la muestra de AEc (a) y el espectro para el mismo componente obtenido de la base de datos wiley 275.L (b).

En la figura 10 pueden destacarse los dos componentes mayoritarios del AEc: el Timol (31,751 min) y el *p*-Cimeno (21,321 min). Así mismo, y en menores proporciones aparece a los 22,685 min el  $\gamma$ -Terpineno, a los 24,346 min el Linalol, a los 36,760 min el *Trans*- $\beta$ -Cariofileno y el Cariofileno a los 32,001 min. De otra parte, la espectrometría de masas es una técnica que permite identificar químicamente una molécula en función de su espectro iónico, el cual se obtiene al ionizar la molécula mediante un bombardeo con un haz de electrones (normalmente de 70 eV), para posteriormente desfragmentarlo en iones y subsiguientemente un detector permite identificar cada uno de esos iones y en función de la distancia interatómica entre cada ión ( $m/z$ ) se puede construir así su espectro. En este espectro se identifican el pico base, el ion molecular característico (normalmente asociado al peso molecular del compuesto), los demás iones moleculares, isótopos formados, etc.

**Figura 7.** Corriente iónica total reconstruida (cromatograma) de los compuestos volátiles del aceite esencial comercial de tomillo.

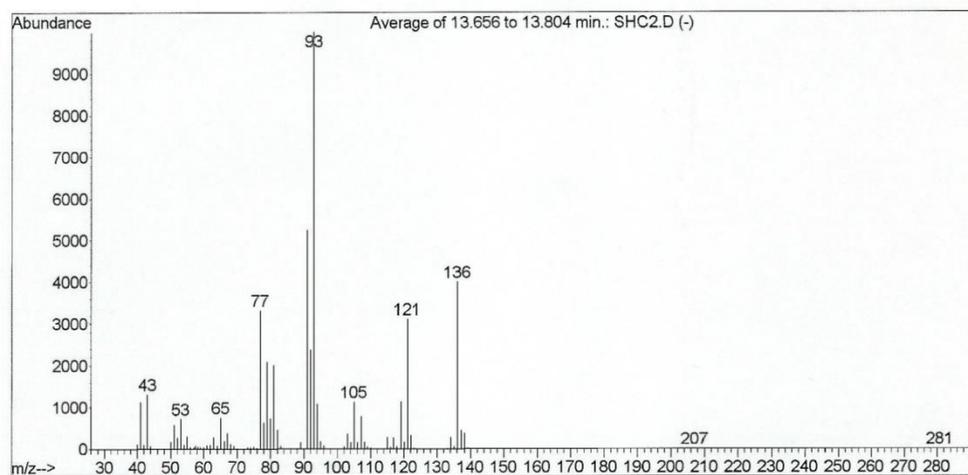


En la figura 11a puede apreciarse que el ión molecular límite es el 136 y el pico base el 93, los cuales corresponden al  $\gamma$ -Terpineno (Figura 11b), el cual presenta un peso molecular del compuesto 136,23 g/mol. De esta forma, se identifican los compuestos de

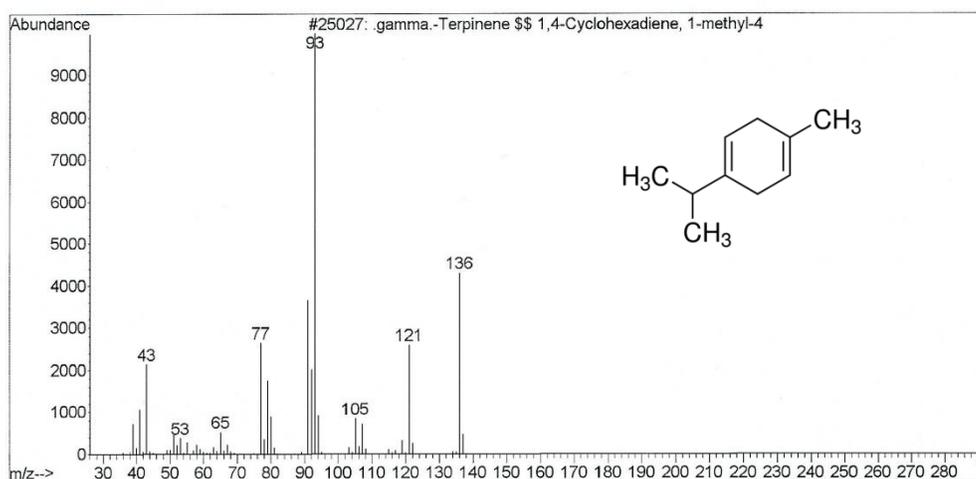
cada uno de los picos obtenido en el análisis cromatográfico de cada AE, de acuerdo a su espectro de masas y se compara con el espectro más similar de la base de datos.

**Figura 8.** Espectros de masas del  $\gamma$ -Terpineno, (a) obtenido de la muestra de AEc y (b) obtenido de la base de datos wiley 275.L.

a)



b)



Señalan Baranauskiene y Cols. (2003) que aunque la biosíntesis y acumulación del aceite esencial del tomillo está controlada genéticamente, la composición química de

los mismos se ve afectada también por un sinnúmero de factores geográficos, geobotánicos y ambientales, tales como la temperatura, luz, clima, altitud, tipo de suelo y pluviosidad, así lo reiteran Tajkarimi y Cols. (2010); Figueiredo y Cols. (2008); Curioni y Cols. (2002) y Udagawa (1995). En este orden de ideas Boskovic y Cols. (2015); Guerreo y Cols. (2011) y Naghdi y Cols. (2004), afirman que se ha demostrado que condiciones agronómicas como fertilización, densidad de siembra, método de cultivo, influyen en la cantidad y calidad del aceite esencial de. Otro factor referido por McGimpsey y Cols. (1994) que influye en la producción de los metabolitos secundarios es la etapa fenológica, siendo la floración la época de mayor acumulación. También agregan Bandoni y Cols. (2009) y Albado y Cols. (2001) que en la época y modo de recolección y la parte de la planta, manejo del material y proceso de obtención del aceite pueden afectar su composición. Por su parte Shinohara y Cols. (1992) agregan que en cultivos hidropónicos la concentración de aceite esencial se ha visto influida por la concentración de fósforo e Ichimura y Cols. (1992), agregan por concentración de nitrógeno, agrega Udagawa (1994) que también ocurre así por la temperatura de la solución nutritiva. Bandoni y Cols. (2009) expresan que es casi imposible lograr dos aceites esenciales idénticos. Como resultado del grado de sensibilidad analítica con que se trabaje, siempre se podrá encontrar alguna diferencia entre dos partidas de un mismo aceite esencial, por la época de cosecha, el año, el método de extracción, las condiciones de almacenamiento, etc.

En general, Baranauskiene y Cols. (2003) y Naghdi y Cols. (2004) señalan que la composición del aceite esencial de esta especie incluye compuestos como el Carvacrol y Timol, además de que puede contener *p*-Cimeno,  $\gamma$ -Terpineno, Linalol, Borneol, Geraniol y Cariofileno. Estos compuestos confieren olores, sabores y propiedades químicas que sitúan al tomillo como una planta muy cotizada en la industria alimenticia, farmacéutica, perfumería y cosmética.

Muñoz (2000) y Boskovic y Cols. (2015) encontraron resultados similares al presente estudio, ya que en su investigación ensayaron aceite esencial de tomillo y orégano, hallando el Timol en primer lugar con un 50.48% de abundancia, seguido del *p*-Cimeno

con 24.79%, Linalol con 4.69%, y  $\gamma$ -Terpineno con 4.14%, las cuales son en su orden muy similares al presente estudio con aceites esenciales de tomillo obtenidos a nivel comercial y experimental. La presencia de los componentes *p*-Cimeno,  $\gamma$ -Terpineno, Carvacrol y Timol en las dos muestras de AEs ensayados, son un indicador de que estos cuatro componentes son biológica y funcionalmente relacionados y soportan la teoría Burt (2004) y Kokkini y Cols. (1997) quienes afirman que el Timol es formado vía *p*-Cimeno a partir del  $\gamma$ -Terpineno en *T. vulgaris*.

El Timol (2-isopropil-5-metilfenol) en la muestra comercial de aceite fue el componente mayoritario con un 45,3%, mientras que en el AEe apenas alcanzó un 5,7%. Una de las características y propiedades principales del timol como **compuesto fenólico** es su potencial bactericida, plaguicida y fungicida. Parte también de que una vez extraído, no tiene un color o sabor desagradable, por lo que actualmente forma parte de los colutorios, enjuagues bucales y pasta de diente. El timol pertenece al grupo de los terpenos y puede a menudo ser confundido con un isómero denominado Carvacrol, el cual también puede encontrarse en el aceite esencial de tomillo. Lambert y Cols. (2001) afirman que el Timol es estructuralmente muy similar al Carvacrol, teniendo el grupo hidroxilo en una diferente localización del anillo fenólico. Agrega Burt (2004) que el Carvacrol y el Timol son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias gram-negativas, liberando lipopolisacáridos (LPS) y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP.

En el trabajo de Juven y Cols. (1994) se examinó el funcionamiento del Timol contra *S. Typhimurium* e hipotetizaron que el Timol se une a las proteínas de membrana hidrófobamente por medio de enlaces de hidrógeno, cambiando de este modo las características de permeabilidad de la membrana. Agrega los mencionados autores que también se encontró que el Timol era más inhibidor a pH 5,5 que 6,5. A pH bajo, la molécula de Timol no estaría dissociada y, por lo tanto, sería más hidrófoba, pudiendo así unirse mejor a las áreas hidrofóbicas de las proteínas y disolverse mejor en la fase lipídica.

El *p*-Cimeno (1-metil-4-(1-metiletil)benzeno) en el AEC representó el segundo constituyente con un 30,3%, mientras que en la muestra experimental fue el componente mayoritario con un 43,8%. Este compuesto orgánico aromático de origen natural se clasifica como un alquilbenzeno relacionado con un monoterpene obtenido de plantas aromáticas (tomillo, comino). Su capacidad de desengrase es inferior a la de los hidrocarburos clorados, pero presenta la ventaja de ser biodegradable. Es una sustancia inflamable y por lo tanto no se puede utilizar en procesos de desengrase con aportación de calor. Explica Ultee y Cols. (2002) que el precursor biológico del Carvacrol, el *p*-Cimeno es hidrofóbico y provoca un hinchamiento de la membrana citoplasmática en mayor medida que el Carvacrol. Añaden Juven y Cols. (1994), Dorman y Deans (2000), Juliano y Cols. (2000); Ultee y Cols. (2000a) que El *p*-Cimeno no es un antibacteriano eficaz cuando se usa solo, pero cuando se combina con Carvacrol, enfatiza Ultee y Cols. (2000b) que se ha observado sinergismo contra bacterias como *Bacillus cereus* in vitro y en arroz. Precisa Ultee y Cols. (2002) que la mayor eficiencia del *p*-Cimeno al ser incorporado en la bicapa lipídica muy probablemente facilita el transporte de Carvacrol a través de la membrana citoplasmática.

### **Evaluación de la Actividad Antimicrobiana**

En las pruebas previas realizadas al tomillo antes de la extracción de los aceites esenciales, no se halló la presencia de *Salmonella* spp, ninguna colonia sospechosa apareció en el agar empleado.

En la tabla 11 se presenta los diferentes tratamientos empleados para la determinación de la actividad antibacteriana del AE de tomillo comercial y experimental en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, in vivo corresponde a las piezas de carnes inoculadas, así como la concentración de AE expresada en porcentaje (v/v) y en mg\*ml<sup>-1</sup>.

**Tabla 11.** Diseño experimental para la determinación de la actividad antimicrobiana del AE de tomillo sobre *S. Enteritidis* y *S. Paratyphi*.

Tipo de aceite esencial (AE)	Volumen AE (µl)	Volumen etanol (µl)	Concentración de AE		Tratamiento
			% (v/v)	(mg/ml)	
Comercial	0,01	0,09	10	92,50	T1
	0,02	0,08	20	185,00	T2
	0,03	0,07	30	277,50	T3
	0,04	0,06	40	370,00	T4
	0,05	0,05	50	462,50	T5
Experimental	0,01	0,09	10	92,62	T6
	0,02	0,08	20	185,24	T7
	0,03	0,07	30	277,86	T8
	0,04	0,06	40	370,48	T9
	0,05	0,05	50	463,10	T10

### *Pruebas de Difusión en Agar*

Los resultados obtenidos en las pruebas de difusión en agar para *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Paratyphi son mostrados en la tabla 12. Igualmente, en esta tabla se presenta los resultados en base a su sensibilidad teniendo en cuenta los halos de inhibición de la siguiente manera: Extremadamente sensible (+++) para diámetros superiores a 20mm, muy sensibles (++) para diámetros entre 15 y 19mm, sensibles (+) para diámetros entre 9 y 14 mm y no sensibles (-) para diámetros inferiores a 8mm (Ponce *et al.*, 2003). De otra parte, en la figura 15 se muestra un ejemplo de los halos de inhibición obtenidos con el aceite esencial experimental frente a *Salmonella* Paratyphi.

**Tabla 12.** Resultados de pruebas de difusión en agar para cada especie de *Salmonella* estudiada.

Tratamiento	Diámetro halo de inhibición (mm)					
	<i>S. Paratyphi</i>			<i>S. Enteritidis</i>		
	Media	D.E.	Sensibilida d	Media	D.E.	Sensibilida d
T1	4,33 <sup>b</sup>	0,577	(-)	3,00 <sup>bc</sup>	1,000	(-)
T2	6,33 <sup>c</sup>	0,577	(-)	5,00 <sup>d</sup>	0,000	(-)
T3	10,00 <sup>e</sup>	0,000	(+)	8,00 <sup>f</sup>	0,000	(-)
T4	12,00 <sup>f</sup>	0,000	(+)	8,67 <sup>f</sup>	0,577	(-)
T5	12,00 <sup>f</sup>	0,000	(+)	9,67 <sup>g</sup>	0,577	(+)
T6	2,33 <sup>a</sup>	0,577	(-)	1,00 <sup>a</sup>	0,000	(-)
T7	4,00 <sup>b</sup>	1,000	(-)	2,00 <sup>b</sup>	0,000	(-)
T8	7,67 <sup>d</sup>	0,577	(-)	2,33 <sup>b</sup>	0,577	(-)
T9	9,33 <sup>e</sup>	1,155	(+)	3,33 <sup>c</sup>	0,577	(-)
T10	10,33 <sup>e</sup>	0,577	(+)	6,33 <sup>e</sup>	0,577	(-)

Columnas sin letras en común indican diferencias significativas para un valor  $p < 0,05$ .

**Figura 9.** Halos de inhibición del aceite esencial experimental frente a *Salmonella* Paratyphi.



Fuente: Karen Martínez. 2017

Como puede apreciarse en la tabla 12, en general los diámetros más grandes tanto para *S. Enteritidis* y *S. Paratyphi* obtenidos en las pruebas de difusión se presentaron con el AEc. De acuerdo a la sensibilidad obtenida, *S. paratyphi* mostró ser más sensible al aceite esencial de tomillo que *S. enteritidis*, ya que el 50% de los tratamientos probados originaron halos con zonas de inhibición mayores a 9 mm, mientras que para *S. Enteritidis* solo el tratamiento cinco (T5) produjo un halo mayor a 9 mm. Lo anterior podría indicar que el uso de aceite esencial de tomillo puede considerarse como un posible aditivo natural para conservación de alimentos. La no sensibilidad de *S. Enteritidis*, no representa una barrera para la potencial utilización del aceite esencial de tomillo en la preservación. Solo ratifica la afirmación de que la seguridad biológica de un alimento es producto de la utilización de uno o varios métodos de conservación. Destaca Cabeza (2013) que es pertinente recordar que los estudios in vitro son solo una aproximación de lo que puede suceder al someter un agente antimicrobiano sobre una matriz alimenticia como conservante pues factores intrínsecos de un producto como el contenido de grasa, proteínas, sales, el pH y extrínsecos como la temperatura pueden afectar la bioactividad de los compuestos.

Los resultados obtenidos en las pruebas de difusión en agar en cuanto al tipo de aceite esencial (comercial y experimental), donde claramente el AEc expuso mejores resultados pueden deberse por una parte a que este aceite mostró dentro de su composición química mayores cantidades de los antimicrobianos Timol y *p*-Cimeno, y por otra parte, que el AEc fue obtenido de dos variedades de plantas de tomillo en estado floral. En este sentido, diversos autores como Burt (2004), Marino y Cols. (1999) y McGimpsey (1994) han reportado que en general, los AE obtenidos de hierbas y especias recolectadas durante o inmediatamente después del proceso de floración, poseen una actividad antimicrobiana más fuerte.

En la investigación de Rota y Cols. (2008) se observó que el AE de *Thymus zygis* presentó mayor poder antibacteriano que el AE de *T. vulgaris* cuando fue probado contra *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* O157:H7, por lo que la mezcla de quimiotipos en el AEc (*T. zygis* – *T. vulgaris*), así como la mayor presencia de componentes fenólicos,

alcoholes y Timol en el AEc comparado con el AEe, sugiere una acción sinérgica entre estos componentes y sus cantidades relativas, tal como reportan los mismos autores. Cosentino y Cols. (1999) también afirman que las propiedades bacteriostáticas del AE de tomillo están supeditadas a la asociación con el contenido de Carvacrol, el cual también posee por sí mismo una actividad antibiótica significativa, y también notaron una acción sinérgica entre el Carvacrol y su precursor el *p*-Cimeno.

El estudio de Ultee y Cols. (2002) demostró que el *p*-Cimeno es un antibacteriano muy débil, expande las membranas celulares bacterianas en mayor medida que el Carvacrol. Mediante este mecanismo el *p*-Cimeno probablemente permite que el Carvacrol sea transportado más fácilmente dentro de la célula de modo que se consigue un efecto sinérgico cuando los dos se usan juntos. Debe recordarse que en el perfil cromatográfico del AEe no se observó la presencia de Carvacrol, a diferencia del AEc, lo que confirma el por qué el AEc mostró mayor efecto antibacteriano.

### ***Concentración mínima Inhibitoria y concentración mínima bactericida***

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante la técnica de difusión en agar, se determinó la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial comercial (AEc) y Experimental (AEe) de tomillo sobre *Salmonella enteritidis* y *Salmonella paratyphi*, expresada en mg/ml teniendo en cuenta la densidad calculada para cada tipo de aceite.

En las tablas 13 y 14 se presentan los resultados obtenidos con respecto a la CMI del AEc y AEe sobre *S. enteritidis*, donde se observa que concentraciones mayores al 0,6% de aceite esencial comercial los caldos no presentaron turbidez, estableciéndose entonces la CMI en 5,55 mg/ml e indicada en la columna amarilla. Así mismo, en el aceite esencial experimental, la turbidez de los tubos se encontró a concentraciones menores al 0,7%, por lo que la CMI se situó a una concentración de 7,41 mg/ml.

**Tabla 13.** CMI del aceite esencial comercial de tomillo sobre *Salmonella enteritidis*.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
%	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
(mg/ml)	0.925	1.85	2.775	3.7	4.625	5.55	6.475	7.4	8.325
Turbidez	+	+	+	+	+	-	-	-	-

**Tabla 14.** CMI del aceite esencial experimental de tomillo sobre *Salmonella enteritidis*.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
%	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
(mg/ml)	0.926	1.852	2.779	3.705	4.631	5.557	6.483	7.41	8.336
Turbidez	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Con respecto a *Salmonella paratyphi*, los resultados de la CMI para los dos tipos de aceites esenciales de tomillo evaluados quedan recogidos en las tablas 15 y 16. En este caso se confirman los resultados vistos en la prueba de difusión en disco, donde los halos de inhibición de *S. paratyphi* fueron mayores que para *S. enteritidis*, indicando una mayor sensibilidad de la primera especie. La CMI del AEc como el AEe frente a *S. paratyphi* fue menor que el observado para *S. Enteritidis*, situándose en 4,625 mg/ml y 5,557 mg/ml, respectivamente.

**Tabla 15.** CMI de aceite esencial comercial de tomillo sobre *Salmonella Paratyphi*.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
%	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
(mg/ml)	0.925	1.85	2.775	3.7	4.625	5.55	6.475	7.4	8.325
Turbidez	+	+	+	+	-	-	-	-	-

**Tabla 16.** CMI de aceite esencial experimental de tomillo sobre *Salmonella Paratyphi*.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
%	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
(mg/ml)	0.926	1.852	2.779	3.705	4.631	5.557	6.483	7.41	8.336
Turbidez	+	+	+	+	+	-	-	-	-

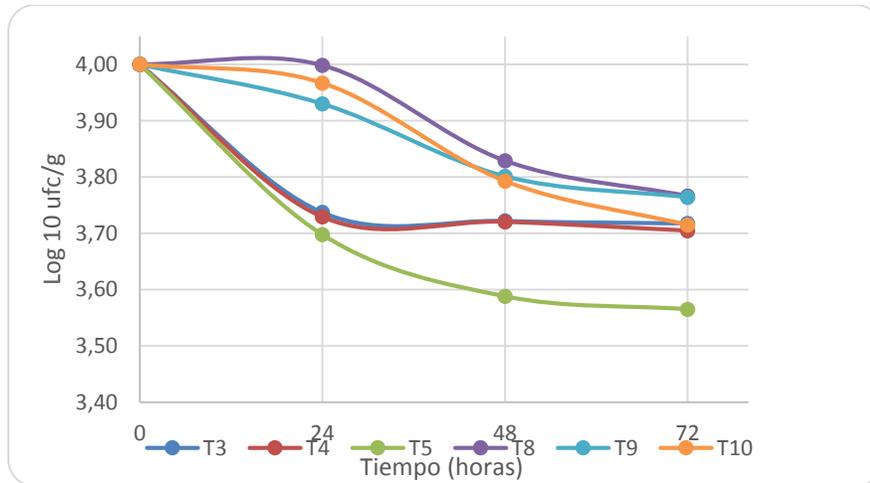
Los resultados encontrados en la pruebas de difusión también se evidenciaron en la determinación del CMI de cada tipo de aceite esencial sobre cada especie de *Salmonella*

evaluada. En este orden de ideas, se requiere de mayores concentraciones tanto del AEc como del AEe para inhibir el crecimiento de *Salmonella* Enteritidis que frente a *Salmonella* Paratyphi, sugiriendo que *S. Enteritidis* es más resistente frente a la acción del AE de tomillo. Este resultado es similar al reportado por Boskovic y Cols. (2015), quién encontró que *S. Enteritidis* fue más resistente que *S. Typhimurium* a la acción del Timol y Carvacrol obtenidos de AE de Orégano. Rota y Cols. (2008) también encontraron un resultado similar en su trabajo, y concluyen igualmente que *S. Typhimurium* fue más sensible que *S. Enteritidis* frente a los AE de diversos quimiotipos de tomillo. Explican Tajkarimi y Cols (2010) que el mecanismo antimicrobiano del Carvacrol y el Timol, que son los dos componentes principales de los AE utilizados, se basa en su capacidad para desintegrar la membrana externa de las bacterias gram-negativas, liberando lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP.

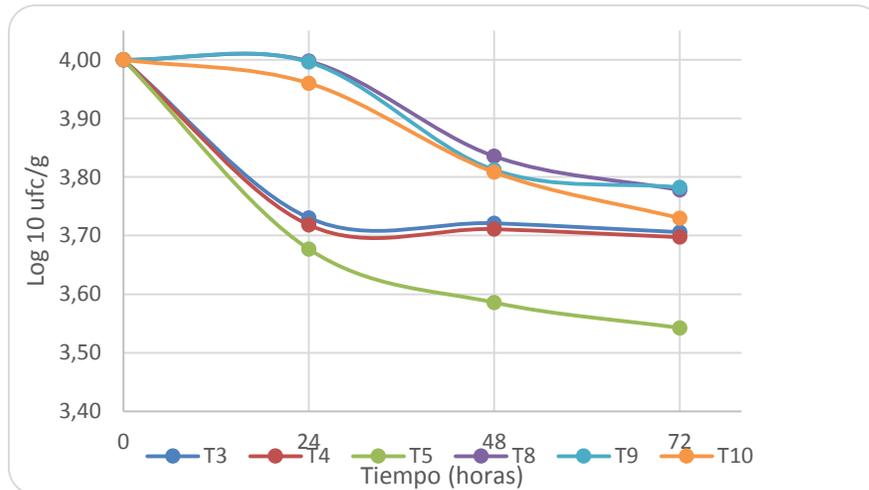
### **Evaluación del Efecto de los Aceites Esenciales y la Temperatura de Refrigeración sobre *Salmonella* Spp. en Carne Cruda**

En las figuras 18, 19 y 20 se muestra el resultado del efecto antimicrobiano del aceite esencial de tomillo tanto comercial como experimental, sobre *Salmonella* Paratyphi en porciones de carne refrigerada a temperaturas de 0°C, 4°C y 10°C, respectivamente. En este caso se aplicaron 6 tratamientos para cada temperatura, correspondiendo a las concentraciones de 30%, 40% y 50% del AEc y AEe.

**Figura 10.** Evolución de *S. Paratyphi* en trozos de carne de res refrigerada a 0°C durante 72 horas.

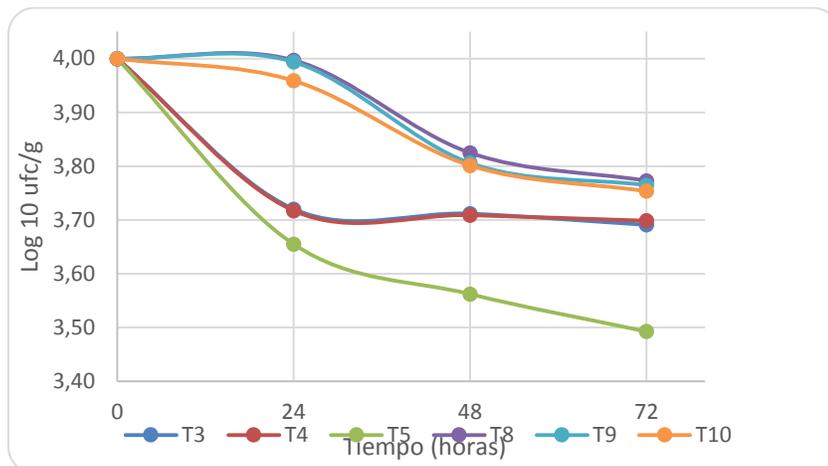


**Figura 11.** Evolución de *S. Paratyphi* en trozos de carne de res refrigerada a 4°C durante 72 horas.



**Figura 12.** Evolución de *S.*

*Paratyphi* en trozos de carne de res refrigerada a 10°C durante 72 horas.



En todos los casos puede observarse que la mayor disminución del crecimiento de *S. Paratyphi* se vio con el tratamiento T5 (50% de AEc), el cual equivale a una concentración de 462,5 mg/ml de aceite esencial. La reducción del crecimiento de *S. paratyphi* fue constante durante las 72 horas de observación, llegando a 0.507 Log<sub>10</sub> ufc/g a la temperatura de 10°C 0.458 Log<sub>10</sub> ufc/g a 4°C 0.435 Log<sub>10</sub> ufc/g a una temperatura de 0°C. Por su parte, los tratamientos T3 y T4 (equivalente al 30% y 40% de AEc) en todas las temperaturas reducen apreciablemente el crecimiento de *S. paratyphi* durante las primeras 24 horas para luego casi estabilizar la población durante las siguientes 48 horas logrando una reducción de unidades de observación aproximada de 0.28 a 0.32 Log<sub>10</sub> ufc/g en todos los casos, sin que se encuentren diferencias significativas entre dichos tratamientos a un valor  $p < 0,05$ . Desde este punto de vista, podría considerarse que el AEc a concentración de 50% se comporta como un agente bactericida de mediano poder cuando se aplica sobre una matriz cárnica, mientras que a concentraciones entre 30% y 40% este efecto bactericida se conserva durante las primeras 24 horas para luego reducirse a un agente bacteriostático.

Con respecto al aceite esencial experimental (AEe), el efecto frente al crecimiento de *S. Paratyphi* fue menor en todos los casos comparado al observado para el aceite esencial comercial. Solamente la concentración del 50% de este aceite experimental (T10) logró reducir a las 72 horas entre el 0.28 y 0.3 log<sub>10</sub> ufc/g el crecimiento de *S. paratyphi* a las temperaturas de 0°C y 4°C, mientras que para los tratamientos T8 y T9 independiente de la temperatura logró reducir el crecimiento de *S. paratyphi* en 0.22 Log<sub>10</sub> ufc/g. El AEe

puede considerarse como un agente bactericida de bajo poder y que mantiene su carácter bactericida durante 72 horas.

Los resultados anteriores también son coherentes con los valores de la velocidad de muerte obtenidos para cada tratamiento y que son mostrados en la tabla 17.

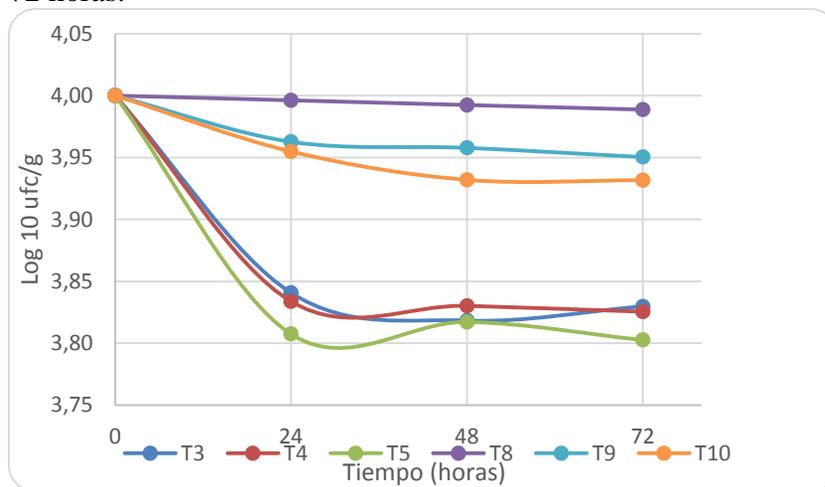
Con respecto a la velocidad de muerte de *S. paratyphi* se observa un efecto contrario entre las dos muestras de aceite esencial de tomillo, ya que con el AEc la muerte aumenta conforme aumenta la temperatura, mientras que con el AEe esta velocidad parece disminuir con el incremento de la temperatura, con excepción del T9. Lo anterior podría estar relacionado a la composición química de cada aceite, donde los componentes mayoritarios del aceite esencial podrían difundirse más fácilmente a través de la membrana celular cuando la temperatura incrementa o disminuye. Sin embargo, hacen falta más estudios específicos donde se evalúe el efecto de la temperatura sobre la capacidad de difusión de los diversos componentes de los aceites esenciales para aclarar esta cuestión.

**Tabla 17.** Velocidad de muerte de *S. paratyphi* para cada tratamiento evaluado en trozos de carne de res refrigerada.

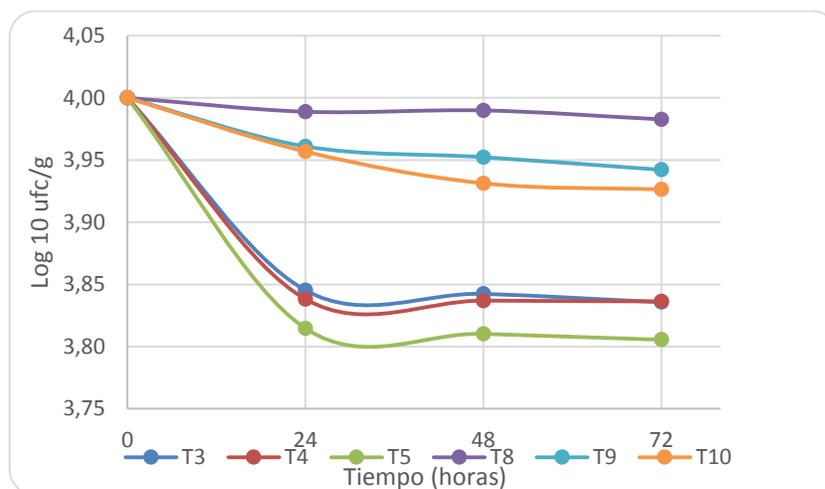
Tratamiento	Velocidad máxima de muerte ( $\mu_{\text{máx}} - \text{Log}_{10} \text{ ufc/g} \cdot \text{h}$ )		
	0°C	4°C	10°C
T3 (AEc30%)	0,0119 ± 0,0003	0,0122 ± 0,0012	0,0126 ± 0,0016
T4 (AEc40%)	0,0123 ± 0,0012	0,0130 ± 0,0013	0,0131 ± 0,0010
T5 (AEc50%)	0,0127 ± 0,0010	0,0136 ± 0,0019	0,0145 ± 0,0030
T8 (AEe30%)	0,0049 ± 0,0017	0,0046 ± 0,0017	0,0047 ± 0,0018
T9 (AEe40%)	0,0042 ± 0,0008	0,0044 ± 0,0022	0,0048 ± 0,0021
T10 (AEe50%)	0,0053 ± 0,0014	0,0048 ± 0,0010	0,0041 ± 0,0015

De otra parte, en las figuras 21, 22 y 23 se presenta el resultado del efecto antimicrobiano del aceite esencial de tomillo comercial y experimental, sobre *Salmonella* Enteritidis en porciones de carne refrigerada a temperaturas de 0°C, 4°C y 10°C, respectivamente. En este caso también se aplicaron los mismos seis tratamientos aplicados para *S. Paratyphi*.

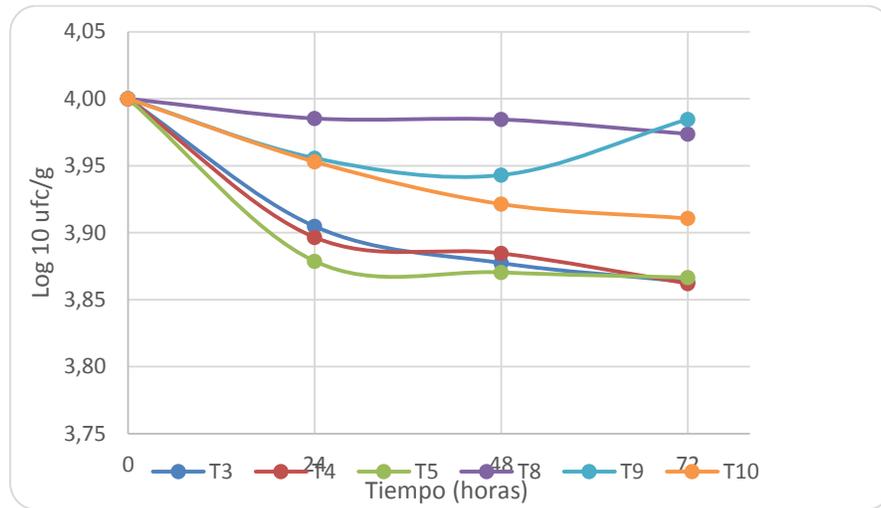
**Figura 13.** Evolución de *S. Enteritidis* en trozos de carne de res refrigerada a 0°C durante 72 horas.



**Figura 14.** Evolución de *S. Enteritidis* en trozos de carne de res refrigerada a 4°C durante 72 horas.



**Figura 15.** Evolución de *S. Enteritidis* en trozos de carne de res refrigerada a 10°C durante 72 horas.



Al igual que los resultados vistos para *S. paratyphi*, en el caso de *S. enteritidis* también se observó que la mayor disminución del crecimiento se dió con el tratamiento T5 (50% de AEc), sin embargo, y a diferencia de lo visto para *S. paratyphi*, los tratamientos T3 y T4 (30% y 40%) también lograron reducir la población de *S. enteritidis* a concentraciones similares a la del T5 en todas las temperaturas, sin que se presentaran diferencias significativas en el nivel de reducción de cada tratamiento a un valor  $p < 0,05$ . Los porcentajes de reducción final fueron similares en las temperaturas de  $0^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  (entre 0.16 y 0.2  $\text{Log}_{10}$  ufc/g), pero mayores que los vistos a  $10^{\circ}\text{C}$  (0.14  $\text{Log}_{10}$  ufc/g). En todos los casos, la reducción de *S. Enteritidis* se observó durante las primeras 24 horas para luego estabilizar la población durante las 48 horas restantes. Esto sugiere que el AEc de tomillo frente a *S. Enteritidis* parece comportarse como un agente bactericida solo en las 24 primeras horas de aplicación y luego se reduce a un agente bacteriostático.

Por otra parte, todos los tratamientos del AEe presentaron bajo efecto sobre *S. Enteritidis*, ya que la máxima reducción lograda (T10 a  $10^{\circ}\text{C}$ ) no supera 0.092  $\text{Log}_{10}$  ufc/g frente a la población inicial inoculada en trozos de carne bovina. En este caso podría indicarse que el AEe tiene bajo efecto sobre *S. Enteritidis* cuando se aplica como agente preservante en alimentos.

Los resultados anteriores se ven reflejados en los valores de la velocidad de muerte de *S. Enteritidis* obtenidos para cada tratamiento y que son mostrados en la tabla 18.

**Tabla 18.** Velocidad de muerte de *S. Enteritidis* para cada tratamiento evaluado en trozos de carne de res refrigerada.

Tratamiento	Velocidad máxima de muerte ( $\mu_{\text{máx}} - \text{Log}_{10} \text{ ufc/g}^*\text{h}$ )		
	0°C	4°C	10°C
T3 (AEc30%)	0,0070 ± 0,0008	0,0072 ± 0,0007	0,0040 ± 0,0006
T4 (AEc40%)	0,0078 ± 0,0006	0,0084 ± 0,0004	0,0044 ± 0,0011
T5 (AEc50%)	0,0092 ± 0,0031	0,0087 ± 0,0005	0,0054 ± 0,0003
T8 (AEe30%)	0,0002 ± 0,0001	0,0005 ± 0,0003	0,0006 ± 0,0005
T9 (AEe40%)	0,0016 ± 0,0004	0,0016 ± 0,0004	0,0002 ± 0,0006
T10 (AEe50%)	0,0019 ± 0,0004	0,0018 ± 0,0002	0,0018 ± 0,0002

Con relación a la velocidad de muerte de *S. Enteritidis*, se observa que solo con el AEc de tomillo se alcanzan valores similares a los vistos con el AEe para *S. Paratyphi*, y que la mayor velocidad de muerte de *S. Enteritidis* se presenta con el tratamiento T5 a 0°C, valor que es 1,6 veces menor a la mayor velocidad de muerte observada en *S. Paratyphi* con un T5 a 10°C (0,0092  $\log_{10} \text{ ufc/g}^*\text{h}$  vs 0,0145  $\log_{10} \text{ ufc/g}^*\text{h}$ , respectivamente).

En las tablas 19, 20 y 21 se reflejan los resultados del efecto de los aceites esenciales de tomillo comercial y experimental aplicados a las temperaturas de 0°C, 4°C y 10°C sobre *S. Paratyphi* y *S. Enteritidis*, respectivamente.

**Tabla 19.** Porcentajes en tamaño de reducción de *Salmonella* Paratyphi y *Salmonella* Enteritidis en trozos de carne refrigerada a 0°C durante 72 horas.

Tratamiento	<i>Salmonella</i> Paratyphi			<i>Salmonella</i> Enteritidis						
	C <sub>0</sub>	C <sub>F</sub>	%R	C <sub>0</sub>	C <sub>F</sub>	%R				
T3	4,000	3,718	7,05 <sup>b</sup>	4,000	3,830	4,25 <sup>c</sup>				
T4	4,000	3,705	7,38 <sup>b</sup>	4,000	3,825	4,38 <sup>c</sup>				
T5	4,000	3,565	10,88 <sup>c</sup>	4,000	3,803	4,93 <sup>c</sup>				
T8	4,000	3,766	5,85 <sup>a</sup>	4,000	3,989	0,28 <sup>a</sup>				
T9	4,000	3,764	5,88 <sup>a</sup>	4,000	3,950	1,25 <sup>b</sup>				
T10	4,000			3,715			7,13 <sup>b</sup>	4,000	3,932	1,70 <sup>b</sup>

**Tabla 20.** Porcentajes de reducción de *Salmonella* Paratyphi y *Salmonella* Enteritidis en trozos de carne refrigerada a 4°C durante 72 horas.

Tratamiento	<i>Salmonella</i> Paratyphi			<i>Salmonella</i> Enteritidis						
	C <sub>0</sub>	C <sub>F</sub>	%R	C <sub>0</sub>	C <sub>F</sub>	%R				
T3	4,000	3,706	7,35 <sup>b</sup>	4,000	3,836	4,10 <sup>c</sup>				
T4	4,000	3,697	7,58 <sup>b</sup>	4,000	3,836	4,10 <sup>c</sup>				
T5	4,000	3,542	11,45 <sup>c</sup>	4,000	3,806	4,85 <sup>c</sup>				
T8	4,000	3,778	5,55 <sup>a</sup>	4,000	3,983	0,42 <sup>a</sup>				
T9	4,000	3,782	5,45 <sup>a</sup>	4,000	3,942	1,45 <sup>b</sup>				
T10	4,000			3,730			6,75 <sup>ab</sup>	4,000	3,926	1,85 <sup>b</sup>

**Tabla 21.** Porcentajes de reducción de *Salmonella* Paratyphi y *Salmonella* Enteritidis en trozos de carne refrigerada a 10°C durante 72 horas.

Tratamiento	<i>Salmonella</i> Paratyphi			<i>Salmonella</i> Enteritidis						
	C <sub>0</sub>	C <sub>F</sub>	%R	C <sub>0</sub>	C <sub>F</sub>	%R				
T3	4,000	3,691	7,73 <sup>b</sup>	4,000	3,863	3,43 <sup>c</sup>				
T4	4,000	3,699	7,53 <sup>b</sup>	4,000	3,862	3,45 <sup>c</sup>				
T5	4,000	3,493	12,68 <sup>c</sup>	4,000	3,866	3,35 <sup>bc</sup>				
T8	4,000	3,773	5,68 <sup>a</sup>	4,000	3,974	0,65 <sup>a</sup>				
T9	4,000	3,765	5,88 <sup>a</sup>	4,000	3,985	0,38 <sup>a</sup>				
T10	4,000			3,754			6,15 <sup>ab</sup>	4,000	3,911	2,22 <sup>b</sup>

En todos los casos, la reducción de *S. Paratyphi* y *S. Enteritidis* en carne refrigerada fue de 0,507 log<sub>10</sub> UFC/g o menor (< 0.50 Log<sub>10</sub> ufc/g) y 0,20 log<sub>10</sub> UFC/g o menor (< 0.19 Log<sub>10</sub> ufc/g), respectivamente. La mayor reducción de *S. Paratyphi* y *S. Enteritidis* independiente de la temperatura se observó en el tratamiento 5 (equivalente a una concentración de 462,50 mg/ml de aceite esencial comercial de tomillo).

Cuando se evaluó el efecto de la temperatura pudo observarse en general un efecto contrario entre los aceites y las cepas evaluadas, ya que, la reducción de *S. paratyphi* con el aceite comercial aumentó conforme aumenta la temperatura pero para *S. Enteritidis* disminuye la reducción cuando aumenta la temperatura. Con el aceite experimental la reducción de *S. paratyphi* aumentó cuando la temperatura disminuyó pero la reducción de *S. Enteritidis* aumentó cuando aumentó la temperatura. Estos resultados pueden estar asociados tanto a la variación en la composición de cada aceite esencial y la forma como estos componentes se difunden a través de la membrana celular y actúan en el citoplasma. A pesar que las propiedades de los aceites esenciales de las especias y hierbas, así como sus componentes han sido estudiadas desde el pasado, Burt (2004) y Lambert y Cols. (2001) señalan que, el mecanismo de acción de los componentes antimicrobianos de los AE no se han estudiado con gran detalle. Argumentan Skandamis y Cols. (2001) y Carson y Cols. (2002) que en consideración a la gran cantidad de componentes químicos presentes en los AEs, es más probable que la actividad antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico sino que hay varios objetivos en la célula.

De acuerdo con Kasrati *et al.* (2014), los constituyentes como el Timol, *p*-Cimeno, Linalol y  $\gamma$ -Terpineno pueden contribuir con la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales del tomillo, una acción sinérgica puede darse entre el Carvacrol y otros componentes, tales como el *p*-Cimeno que es un precursor de esta relación. Otros autores como Ultee *et al.* (2002) han reportado que el *p*-Cimeno es un componente antibacteriano muy débil, pero capaz de expandir las membranas celulares bacterianas en mayor medida

que el Carvacrol, y mediante este mecanismo el *p*-Cimeno probablemente permite que el Carvacrol sea transportado más fácilmente dentro de la célula de modo que se consigue un efecto sinérgico cuando los dos se usan juntos.

Por su parte Boskovic y Cols. (2015) aducen que las propiedades antibacteriales de los aceites esenciales aumentan cuando estos contienen un alto porcentaje de componentes fenólicos. Agregan los mencionados autores que el aceite obtenido del orégano tiene mejor efecto antibacterial que el del tomillo, aspecto que ha sido reportado por Burt (2004), quien indica que la efectividad de los AEs de las especias van disminuyendo en orden de actividad antimicrobiana así: orégano > clavo > canela > cilantro > tomillo > menta > romero > mostaza.

De acuerdo con lo anterior, en función de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, es decir tras la inoculación de las piezas de carne, y en concordancia con el Tajkarimi y Cols. (2010) puede considerarse que los dos aceites esenciales de tomillo (comercial y experimental) pueden ser usados como agentes que controlan o previenen el crecimiento de microorganismos patógenos, especialmente *Salmonella* spp. más que como agentes conservantes (aquellos que previenen o evitan procesos de alteración alimentaria). Así mismo, plantean los mismos autores, que la eficacia del aceite esencial de varias especias entre ellas el tomillo depende de varios factores como el pH, la temperatura de almacenamiento, la cantidad de oxígeno, la concentración de aceite y de los componentes activos. Aclaran Tajkarimi y Cols. (2010) y Stoicov y Cols. (2009) que la efectividad de los AEs aplicados directamente sobre alimentos se ve disminuida frente a la actividad observada en ensayos *in vitro* por diversos factores que no han sido testeados en las mismas condiciones. Agrega Burt (2004) que un alto contenido en grasas en los productos cárnicos puede reducir la acción de los aceites esenciales, tal como se ha visto en el presente estudio.

Los estudios de Tajkarimi y Cols. (2010) indican que algunos componentes como el Linalol, y varios terpenos aislados de AEs obtenidos principalmente de flores y hojas frescas de diversas especias y frutos maduros de algunas plantas han sido reportados como componentes efectivos contra *Salmonella* spp. o *Shigella* spp.

Burt (2004), Farag y Cols. (1989), Thoroski y Cols. (1989), Cosentino y Cols (1999), Dorman y Deans, (2000), Juliano y Cols. (2000), Lambert y Cols. (2001) señalan que generalmente los AE que poseen las propiedades antibacterianas más fuertes frente a patógenos alimentarios contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos tales como Carvacrol, Eugenol (2-metoxi-4- (2-propenil) fenol) y Timol. En este sentido autores como Denyer y Hugo (1991), Sikkema y Cols. (1995) y Davidson (1997), sostienen que es razonable entonces que el mecanismo de acción de los aceites esenciales de tomillo sea, por tanto, similar al de otros compuestos fenólicos; esto se considera generalmente como la perturbación de la membrana citoplasmática, alteración de la fuerza protón motriz (PMF), el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación del contenido celular.

El aceite esencial de tomillo al actuar como antibacteriano afecta la permeabilidad de la membrana bacteriana causando un flujo de salida de iones desde el interior de la célula hacia el exterior. La salida de iones es usualmente acompañada con otros constituyentes citoplasmáticos, y hasta una cierta cantidad de pérdida puede ser tolerada por la célula bacteriana sin perder la viabilidad, pero si el flujo de salida es muy prolongado, causaría el colapso de la célula.

Todos los resultados anteriores son una clara evidencia de que *S. Enteritidis* es más resistente al efecto del aceite esencial de tomillo que *S. Paratyphi*, pero que aún incluso la baja actividad mostrada por el AEe, la aplicación de esos aceites esenciales pueden prevenir o por lo menos controlar el crecimiento de estos agentes patógenos causantes de ETAs.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

Como resultado de la presente investigación se puede concluir que el análisis y la observación permiten conocer la composición química de cada uno de los aceites esenciales, encontrando en el aceite comercial 19 componentes y en el aceite obtenido del laboratorio un total de 39 componentes, siendo los principales y mayoritarios, en el aceite comercial el Timol con un 45.3% y *p*-Cimeno con 30.3%, y en menor proporción el  $\gamma$ -Terpineno con 8.4%, mientras que para el aceite obtenido a nivel experimental el componente mayoritario fue el *p*-Cimeno con 43.8%, y minoritariamente el *Trans*- $\beta$ -Cariofileno con 6.2% y Timol con 5.7%.

Igualmente se determinó que existe actividad antibacteriana de los dos aceites empleados sobre cepas de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Paratyphi, hallando que *Salmonella* Enteritidis es más resistente que *Salmonella* Paratyphi frente a la acción de los AEs de tomillo; así mismo se encontró que el aceite comercial fue más efectivo frente al aceite extraído a escala de laboratorio, debido en parte a su mayor pureza, al tipo y concentración de componentes químicos, al estado de floración de la planta al momento de la recolección, y quizá debido al método de extracción empleado.

Del mismo modo la mayor actividad antibacteriana *in vivo* para el aceite comercial se presentó a concentraciones de 465 mg/ml reduciendo más del 0.4 Log<sub>10</sub> ufc/g (10%) el crecimiento de *Salmonella* Paratyphi y 3,35% el de *S. Enteritidis*.

Mediante los resultados obtenidos se confirma el potencial uso del aceite esencial de tomillo en la industria alimentaria para la conservación de los productos alimenticios contra bacterias y para aumentar la vida útil de los alimentos, especialmente de las carnes crudas.

Así mismo se establece que el AE de tomillo en estudios *in vitro* se comporta como un agente antibacteriano disminuyendo tanto la presencia de *Salmonella* Enteritidis, como *S. Paratyphi*, mientras que en ensayos *in vivo* en carne cruda refrigerada se comporta en

general, como un agente bacteriostático, ya que si bien disminuye la carga inicial de *Salmonella* spp., no inhibe su crecimiento en el tiempo.

Finalmente se precisa que el *S. Enteritidis* es más resistente al efecto del aceite esencial de tomillo que *S. Paratyphi*, pero que aún incluso la baja actividad mostrada por el AEE, la aplicación de esos aceites esenciales pueden prevenir o por lo menos controlar el crecimiento de estos agentes patógenos causantes de ETAs.

### **Recomendaciones**

- 1) En Futuras investigaciones de hace necesario tener en cuenta el factor de la evaluación sensorial de las piezas de carne con el uso de cada uno de los aceites esenciales a emplear.
- 2) Se recomienda estudiar la actividad antibacteriana del AE de tomillo tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* empleando atmósferas modificadas o al vacío, ya que la actividad antibacteriana disminuye con la presencia de oxígeno, ya que cuando hay poca cantidad de oxígeno, pueden producirse menos cambios oxidativos en los AE y/o que las células que obtienen energía a través del metabolismo anaeróbico son más sensibles a la acción tóxica de los AEs.
- 3) De igual forma se recomienda desarrollar estudios de actividad antibacteriana de AE de tomillo en productos cárnicos empleando métodos de encapsulación o micro-encapsulación de aceites, ya que diversos estudios de AE encapsulados han demostrado que dichos aceites son más efectivos que cuando se aplican directamente sobre alimentos cárnicos con contenido de grasa presente.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Adarme, T. & Rincones, M. (2008). Evaluación de cuatro antimicrobianos para el control de levaduras contaminantes de un proceso de fermentación de ácido cítrico. [Documento en Línea]. Trabajo de grado para optar al Título de Microbiólogo Industrial. Bogotá. D. C. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Programa de Microbiología Industrial, pp.104. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis140.pdf>.
- Albado, E.; Saez, G.; & Grabiell, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). [Artículo en Línea]. *Revista médica Herediana*, 12 (1), pp. 16-19. Disponible: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v12n1/v12n1ao3.pdf> ISSN 1729-214X
- Bajpai, V.; Baek, K. & Kang, S. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. [Artículo en Línea]. *Food Research International*, 45 (2), pp. 722-734. Disponible: [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911002912](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911002912)
- Ballester, C.; Sendra, E.; Fernández, J.; Pérez, J., & Viuda, M. (2013). Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. [Artículo en Línea]. *Industrial Crops and products*. 50, pp. 304-311. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013003890> doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.052
- Bandoni, A.; Retta, D.; Dileo, P. & Baren, C. (2009). ¿Son realmente útiles los aceites esenciales? [Artículo en Línea]. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 8 (5), pp. 317-322. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85611977001> ISSN 0717 7917
- Baranauskiene, R.; Venskutonis, P.; Viskelis, P., & Dambrauskiene, E. (2003). Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*).

- [Artículo en Línea]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (26), pp. 7751-7758. Disponible: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0303316?journalCode=jafcau> DOI: 10.1021 / jf0303316
- Bassole, I. ; Ouattara, A. ; Nebie, R. ; Ouattara, C. ; Kabore, Z. & Traore, S. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. [Artículo en Línea]. *Phytochemistry*, 62 (2), pp. 209-212. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482458> PMID: 12482458
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. [Artículo en Línea]. *US National Library of Medicine Institutes of Health*, 45 (4), pp. 493-496. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325707> PMID: 532570
- Bibek, R. (2010). Fundamentos de Microbiología de los alimentos. 4ed. México: McGraw Hill, pp. 350 ISBN 978607 1503398
- Boskovic, M.; Zdravkovic, N.; Ivanovic, J.; Janjic, J.; Djordjevic, J.; Starcevic, M. & Baltic, M. (2015). Antimicrobial activity of Thyme (*Thymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. [Artículo en Línea] *Procedia Food Science*, 5, pp. 18-21. Disponible:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X15000954> doi: 10.1016/j.profoo.2015.09.005
- Botz, L.; Kocsis, B. & Nagy, S. (2007). Enciclopedia of Analytical Science in Bioassays. *P.J. Worsfold, A. Townshend y C.F. Poole. Oxford. 1* pp. 271-277 (Artículo o libro) (traducido es: Bioautografía (en Bioensayos). En: P.J. Worsfold, A. Townshend y C.F. Poole (Eds). Enciclopedia of Analytical Science, 2ª ed., Elsevier, Oxford. Vol. 1, pp. 271 - 277.)
- Braden, C.; Swanson, M. & Snider, M. (2007). Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Associated with Pet Rodents. [Artículo en Línea]. *The New England Journal of medicine*, 356 (1), pp. 21-28. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202452> DOI: 10.1056 /

NEJMoa060465

- Brenner, F.; Villar, R.; Angulo, F.; Tauxe, R.; y Swaminathan, B. (2000). [Artículo en Línea]. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (7), pp. 2465-2467. Disponible: <http://jcm.asm.org/content/38/7/2465.full.pdf+html>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. [Artículo en Línea]. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (1), pp. 223-253. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1524623> DOI: 10.1016 / j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Cabeza, R. (2013). Determinación de la composición química de extractos de *Plutarchia coronaria* y evaluación de su actividad antimicrobiana sobre algunos microorganismos de interés alimentario. Trabajo de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Pamplona, Colombia. Pág. 62.
- Canillac, N., y Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excels* on *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. [Artículo Científico]. *Food Microbiology*, 18, (3), pp. 261-268. Disponible: [https://www.researchgate.net/publication/248565099\\_Antibacterial\\_activity\\_of\\_the\\_essential\\_oil\\_of\\_Picea\\_excelsa\\_on\\_Listeria\\_Staphylococcus\\_aureus\\_and\\_coliform\\_bacteria](https://www.researchgate.net/publication/248565099_Antibacterial_activity_of_the_essential_oil_of_Picea_excelsa_on_Listeria_Staphylococcus_aureus_and_coliform_bacteria) DOI: 10.1006 / fmic.2000.0397
- Carson, C.; Mee, B. & Riley, T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. [Artículo Científico]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (6): 1914-1920. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127210/> Doi: 10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002
- Celikel, N., y Kavas, G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. [Artículo en Línea]. *Czech Journal of Food Sciences*, 26 (3), pp. 174 – 181. Disponible: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/01450.pdf>

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 7th ed. CLSI publication M07-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., p. 48
- Colorado, J.; Galeano, E., y Martínez, A. (2007). Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. [Artículo Científico]. *Vitae*, 14 (1), pp. 67-71. Disponible: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/595/503>
- Cosentino, S.; Tuberoso, C.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E. & Palmas, F. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. [Artículo Científico]. *Letters in Applied Microbiology*, 29 (2), pp. 130-135. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499301>
- Coy, C. & Acosta, G. (2013). Antibacterial activity and chemical composition of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), thyme (*Thymus vulgaris*) and turmeric (*Curcuma longa*) from Colombia. [Artículo en Línea]. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18 (2), pp. 237-246. Disponible: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v18n2/pla07213.pdf>
- Curioni, A.; García, M.; Rolando, A.; Alfonso, W. & Arizio, O. (2002). Producción de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) en el centro-oeste Bonaerense. [Artículo en Línea]. *Acta Horticulturae*, 569, pp. 281-287. Disponible: [http://www.actahort.org/books/569/569\\_46.htm](http://www.actahort.org/books/569/569_46.htm) DOI 10.17660/ActaHortic.2002.569.46
- D'Auria, M.; Mauriello, G.; Marino, R. & Racioppi, R. (2005). Composition of volatile fractions from *Thymus*, *Origanum*, *Lavandula* and *Acinos* species. [Artículo en Línea]. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 8, (1), pp. 36-51. Disponible: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2005.10643419>  
[doi.org/10.1080/0972060X.2005.10643419](http://doi.org/10.1080/0972060X.2005.10643419)

- Daferera, D.; Ziogas, B. & Polissiou, M. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. [Artículo en Línea]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, (6), pp. 2576-2581. Disponible: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf990835x?journalCode=jafcau> DOI: 10.1021 / jf990835x
- Davidson, P. (1997). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM, Washington, pp. 520 – 556.
- Delaquis, P.; Stanich, K.; Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. [Artículo en Línea]. *International Journal of Food Microbiology*, 74, pp. 101-109. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929164> PMID: 11929164
- Delgado, H.; Cedeño, C.; Montes de Oca, M. & Villoch, A. (2015). Calidad higiénica de la carne obtenida en mataderos de Manabí- Ecuador. *Revista de Salud Animal*, (1), pp. 1 – 9. Disponible: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v37n1/rsa01115.pdf> ISSN 2224-4700
- Denyer, S., & Hugo, W.B. (1991). Mechanisms of antibacterial action – A summary. In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), *Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. Blackwell, Oxford, pp. 331– 334. DOI: 10.17660 / ActaHortic.1995.396.24
- Dorman, H. & Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. [Artículo en Línea]. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (2), pp. 308-316. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736000> PMID: 10736000
- Duggan, S.; Jordan, E.; Gutierrez, M.; Barrett, G.; O'Brien, T.; Hand, D.; Kenny, K.; Fanning, J.; Leonard, N. & Egan, J. (2012). Salmonella in meats, water, fruit and

- vegetables as disclosed from testing undertaken by Food Business Operators in Ireland from 2005 to 2009. [Artículo en Línea]. *Irish Veterinary Journal*, 65, 1-7. Disponible: <https://irishvetjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2046-0481-65-17> DOI: 10.1186 / 2046-0481-65-17
- Dunkley, K.; McReynolds, J.; Hume, M.; Dunkley, C.; Callaway, T.; Kubena, L; Nisbet, D. & Ricke, S. (2007). Molting in *Salmonella* Enteritidis-Challenged Laying Hens Fed Alfalfa Crumbles. I. *Salmonella* Enteritidis Colonization and Virulence Gene *hilA* Response. [Artículo en Línea]. *Poultry Science*, 86 (8), pp. 1633-1639. Disponible: <https://academic.oup.com/ps/article/86/8/1633/1521545/Molting-in-Salmonella-Enteritidis-Challenged> DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/86.8.1633>
- Dussault, D., Vu, K. D., y Lacroix, M. (2014). In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Science*, 96(1): 514 – 520.
- Énfasis Logística. (2012). Consumo cárnico a nivel mundial. [Información en Línea] *Revista énfasis en alimentación*, pp. 1-2 Disponible en: <http://www.logisticamx.enfasis.com/articulos/65628-consumo-carnico-nivel-mundial>
- FAO. División de Producción y Sanidad Animal. (2014). Consumo de carne. Carnes y Productos Cárnicos. [Documento en Línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html>
- FAO. División de Producción y Sanidad Animal. (2015). Composición de la carne. Carnes y Productos Cárnicos. [online]. Disponible en: [http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr\\_composition.html](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html)
- Farag, R., Daw, Z.; Hewedi, F; & El Baroty, G. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. [Artículo en Línea]. *Journal of Food Protection*, 52 (9), pp. 665-667. Disponible: [https://www.researchgate.net/publication/285020589\\_Antimicrobial\\_Activity\\_of\\_Some\\_Egyptian\\_Spice\\_Essential\\_Oils](https://www.researchgate.net/publication/285020589_Antimicrobial_Activity_of_Some_Egyptian_Spice_Essential_Oils) DOI: 10.4315 / 0362-028X-52.9.665

- Fernández, J. & Quiñonez, J., (2003) Diseño del sistema HACCP para el proceso de producción de carne bovina para consumo. [Artículo en Línea]. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Marzo, 2003, 16 (1), pp. 46 – 61. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295026121007> ISSN: 0120-0690
- Figueiredo, A.; Barroso, J.; Pedrol, L. & Scheffer, J. (2008). Factors affecting secondary metabolic production in plants: volatile components and essential oils. [Artículo en Línea]. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, pp. 213-226. Disponible: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.1875/abstract> DOI: 10.1002 / ffj.1875
- Fisher, K. & Phillips, C. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. [Artículo en Línea]. *Journal of Applied Microbiology*, 101 (6), pp. 1232-1240. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105553> DOI: 10.1111 / j.1365-2672.2006.03035.x
- García, R. & Herrera, F. (2007). Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar *in vitro*. [Artículo en Línea]. *Revista Bistua*, 5 (2), pp. 68-79. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90350207> ISSN: 0120-4211
- Goni, P.; Lopez, P.; Sanchez, C.; Gomez, L.; Becerril, R. & Nerin, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. [Artículo en Línea]. *Food Chemistry*, 116 (4), pp. 982-989. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609003689> DOI: 10.1016 / j.foodchem.2009.03.058
- Guerreo, L.; Ruiz, L.; Rodríguez, M.; Soto, M. & Castillo, A. (2011). Efecto del cultivo hidropónico del tomillo (*Thymus vulgaris* L.) en la calidad y rendimiento del aceite esencial. [Artículo en Línea]. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17 (2), pp. 141-

149. Disponible:  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2011000200007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000200007) ISSN 2007-4034
- Hammer, K.; Carson, C.; & Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. [Artículo en Línea]. *Journal Applied Microbiology*, 86 (6), pp. 985-990. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438227> PMID: 10438227
- Heinz, G., y Hautzinger, P. (2010). Meat processing technology for small – to médium – scale producers. FAO Regional Office for Asia and the Pacific (RAP). FAO ed. Bangkok, Thailand. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/ai407e/AI407E00.htm>. ISBN: 978-974-7946-99-4.
- Heredia, N.; Dávila, J.; Solís, S. & García, S. (2014). Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control. [Artículo en Línea]. *Nacameh*. 8 (1), pp.20-42. Disponible: [http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v8s1/Nacameh\\_v8s1\\_20-42Heredia-et al.pdf](http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v8s1/Nacameh_v8s1_20-42Heredia-et al.pdf) ISSN 2007-0373
- Hernández-Urzúa, M.A. (2016) Microbiología de los alimentos. Fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud. México, DF. Editorial Médica Panamericana.
- Ichimura, M.; Ikushima, M.; Miyazaki, T. & Kimura, M. (1992). Effect of phosphorus on growth and concentration of mineral elements and essential oils of sweet basil leaves. [Artículo en Línea]. *Acta Horticulturae*, 396: 195-201. Disponible: [http://www.actahort.org/books/396/396\\_23.htm](http://www.actahort.org/books/396/396_23.htm) DOI: 10.17660/ActaHortic.1995.396.23
- International Organization for Standardization. –ISO- (1985). ISO7609:1985. Essential oils- Analysis by gas chromatography on capillary columns- General method. 1<sup>st</sup> edition.
- Instituto colombiano de normas técnicas y Certificación.-ICONTEC- (2007). NTC 4574. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la

detección de *Salmonella* spp. [Norma en Línea], pp. 9. Disponible: <https://tienda.icontec.org/producto/impreso-ntc-4574-microbiologia-de-alimentos-y-de-alimentos-para-animales-metodo-horizontal-para-la-deteccion-de-salmonella-spp/?v=42983b05e2f2>

Instituto Nacional de Salud, -INS- (2014). Características de los aislamientos de *Salmonella* spp. Colombia resultados de la Vigilancia 2000 a 2013. Disponible: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-inter%C3%A9s-en-salud-publica/Microbiologia/Informe%20Salmonella%202000%20a%202013.pdf>

Juliano, C.; Mattana, A. & Usai, M. (2000). Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. [Artículo en Línea]. *Journal of Essential Oil Research*, 12 (4), pp. 516-522. Disponible: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2000.9699578>  
[doi.org/10.1080/10412905.2000.9699578](http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2000.9699578)

Juven, B.; Kanner, J.; Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. [Artículo en Línea]. *Journal of Applied Bacteriology*, 76 (6), pp. 626-631. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8027009> PMID: 8027009

Kasrati, A.; Alaoui, Ch.; Fadli, M.; Bekkouche, K.; Hassani, L.; Wohlmuth, H.; Leach, D.; & Abbad, A (2014). Antioxidative activity and synergistic effect of *Thymus saturejoides* Coss. essential oils with cefixime against selected food-borne bacteria. [Artículo en Línea]. *Industrial Crops and Products*, 61, pp. 338-344. Disponible: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-87015ab7-4717-3f9c-b5a9-1c4e98b64125> ISSN: 0926-6690

Kim, M.; Lim, T.; Jang, J.; Lee, D.; Kim, B.; Kwon, J.; Choi, S. y Cols.. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* species isolated from chicken meats produced by different integrated broiler operations in Korea. [Artículo en Línea].

- Poultry science*, 91(9), pp. 2370-2375. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22912475> doi: 10.3382 / ps.2012-02357
- Kingsley, R., & Bäumlér, A. (2000). Host adaptation and the emergence of infectious disease: The *Salmonella* paradigm. [Artículo en Línea]. *Molecular Microbiology*, 36 (5), pp. 1006-1014. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844686> PMID: 10844686
- Kokkini, S.; Karasou, R.; Dardioti, A.; Krigas, N. & Lanaras, T. (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. [Artículo en Línea]. *Phytochemistry*, 44 (5), pp. 883-886. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942296005766> doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00576-6
- Lambert, R.; Skandamis, P.; Coote, P. & Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of organo essential oil, thymol and carvacrol. [Artículo en Línea]. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (3), pp. 453 - 462. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556910> PMID: 11556910
- Lens, C. ; Cremieux, A. ; Maillard, C. & Balansard, G. (1987). Methodes d'évaluation de l'activité antibacterienne des huiles essentielles: application aux essences de thym et de cannelle. [Artículo en Línea]. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 42 (5), pp. 297-302. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3430329> PMID: 3430329
- Li, H., Wang, H., Yves D' Aoust, J., Maurer, J., 2013). *Salmonella Species+*. Doyle, M., Buchanan., R. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4 Edition ( 229), Washington, DC USA. American Society for Microbiology.
- López, E.; Aller, A.; Martín, C.; Castro, C. ; Ramirez, M. & Peman, J. (2006). Evaluation of Disk Diffusion Method for Determining Posaconazole Susceptibility of Filamentous Fungi: Comparison with CLSI Broth Microdilution Method. [Artículo en Línea]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (3), pp. 1108-

1111. Disponible: <http://aac.asm.org/content/50/3/1108.full> doi: 10.1128 / AAC.50.3.1108-1111.2006
- Marino, M.; Bersani, C. & Comi, G. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. [Artículo en Línea]. *Journal of Food Protection*, 62 (5), pp. 1017-1023. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10492476> PMID: 10492476
- Mazzarrino, G.; Paparella, A.; Chaves, C.; Faberi, A.; Sergi, M.; Sigismondi, C.; Compagnone, D. y Cols.. (2015). *Salmonella* enterica and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. [Artículo en Línea]. *Food Control*, 50, pp. 794- 803. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514006112> doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.029
- McGimpsey, J.; Douglas, M.; Van Klink, J.; Beauregard, D. & Perry, N. (1994). Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. [Artículo en Línea]. *Flavour and Fragrance Journal*, 9, pp. 347-352. Disponible: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.2730090613/abstract> DOI: 10.1002 / ffj.2730090613
- Medeiros, I.; Costa, J.; Rima, K.; Gomes, N.; Fachine, J.; Magnani, M. & Leite, E. (2016). Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. [Artículo en Línea]. *Food Control*, 59, pp. 468-477. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515300463> doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.017
- Ministerio de la Protección Social. (2011). Perfil de riesgo de *Salmonella* spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. [Documento en Línea]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/perfil-salmonella-spp.pdf>

- Muñoz, L. (2000). Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Editorial Mundi-Prensa, España. 365p.
- Naghdi, B.; Yazdani, D.; Mohammad, S. & Nazari, F. (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. [Artículo en Línea]. *Industrial Crops and Products*, 19, pp. 231- 236. Disponible:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669003001158>  
[doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.10.005](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.10.005)
- O'Bryan, C.; Crandall, P.; Chalova, V. & Ricke, S. (2008). Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. [Artículo en Línea]. *Journal of Food Science*, 73 (6): M264-267. Disponible:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19241555> PMID: 19241555
- Oliveira, C.E., Souza, E., y Barros, J. (2010). Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of food microbiology*, 137(2-3): 308 – 311.
- Omidbaigi, R. & Arjmandi, A. (2002). Effects of NP supply on growth, development, yield and active substances of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). [Artículo en Línea]. *Acta Horticulturae*, 576, pp. 263-265. Disponible:  
[http://www.actahort.org/books/576/576\\_38.htm](http://www.actahort.org/books/576/576_38.htm) DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.576.38
- Palomino, O. (2001). Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).
- Peredo, H.; Palou, E. & López-Malo, A. (2009) Aceites esenciales: métodos de extracción. *Revista temas selectos de ingeniería de alimentos*, [Artículo en Línea]. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 3 (1), pp. 24-32. Disponible:  
[http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)

- Pérez, C. & Cardozo, S. (2014). Reportes de brotes y aislamientos de *Salmonella* spp. en Colombia. [Artículo en Línea]. *Cultura Científica*, (12), pp. 74- 82. Disponible:<http://www.revistasjdc.com/main/index.php/ccient/article/view/285/276>
- Ponce, A.; Fritz, R.; Del Valle, C. & Roura, S. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. [Artículo en Línea]. *Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie*, 36, (7), pp. 679- 684. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643803000884> doi.org/10.1016/S0023-6438 (03)00088-4
- Ramírez, L. & Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar *IN VITRO* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. [Artículo en Línea]. *Scientia et Technica*, XV (42), pp. 263-268. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049> ISSN: 0122-1701
- Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos. – INFOSAN- (2005). Resistencia antimicrobiana a *Salmonella*. [Documento en Línea]. pp. 4. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/No\\_03\\_Salmonella\\_Apr05\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_Salmonella_Apr05_sp.pdf).
- Ríos, J.; Recio, M. & Villar, A. (1988). Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. [Artículo en Línea]. *Journal of Ethnopharmacology*, 23, (2/3), pp. 127 -149. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874188900013> Doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3
- Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. [Artículo en Línea]. *Ra Ximhai*, 7 (1), pp. 153-170. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46116742014> ISSN: 1665-0441

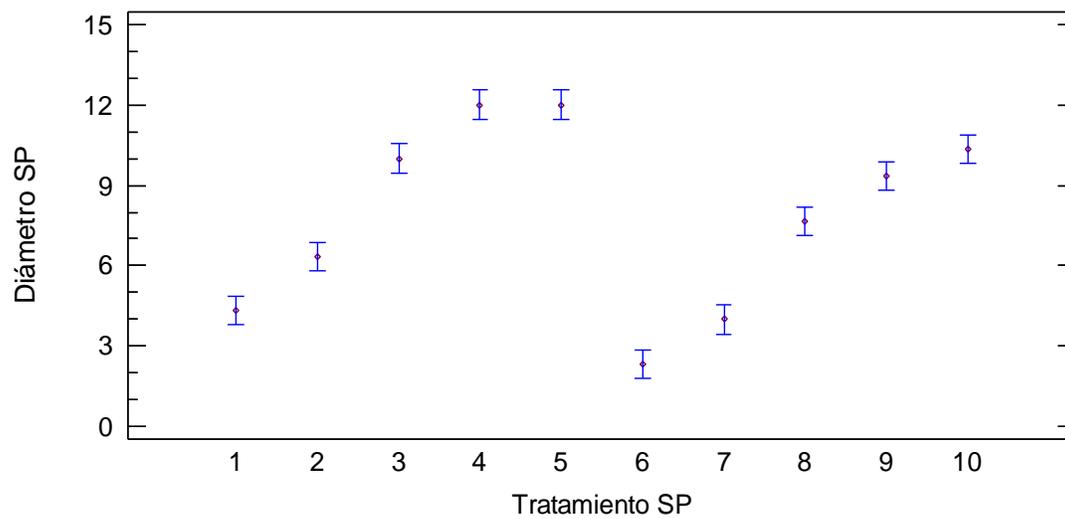
- Rodríguez, E.C.; Díaz, P.; Moreno, J.; Bautista, A.; Montaña, L.; Realpe, M.; Gaspera, A. & Wiesner, M. (2016). Vigilancia por laboratorio de *Salmonella* entérica en casos clínicos humanos en Colombia 2005 a 2011. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Xxx (xx): xxx-xxx, pp. 1-9. Disponible: [https://www.clinicalkey.es/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S0213005X16300088.pdf?locale=es\\_ES](https://www.clinicalkey.es/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S0213005X16300088.pdf?locale=es_ES)
- Rosas, A. & López, A. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*). [Artículo en Línea]. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5 (1), pp. 41-50. Disponible: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5\(1\)-Rosas-Gallo-et-al-2011.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5(1)-Rosas-Gallo-et-al-2011.pdf)
- Rota, M.; Herrera, A.; Martínez, R.; Sotomayor, J. & Jordán, M. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. [Artículo en Línea]. *Food Control*, 19 (7), pp. 681-687. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671350700151X>  
[doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.007](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.007)
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) de México. (2012). Aumentó 89.5% el consumo de carne por persona en México en dos décadas. [Información en línea ]. *Boletín de Prensa*. Noviembre, pp. 1-2. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/jalisco/boletines/2012/noviembre/Documents/B0502012.PDF>
- Shinohara, Y.; Takanos, S.; Maruo, T. & Ito, T. (1992). Effect of phosphorus concentration in nutrient solution on the growth of some herbs. [Artículo en Línea]. *Technical Bulletin of Faculty of Horticulture, Chiba University*, 46, pp. 241-247. Disponible: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP9306231>
- Sikkema, J.; De Bont, J. & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. [Artículo en Línea]. *Microbiological Reviews*, 59 (2), pp. 201- 222. Disponible: <http://mmbr.asm.org/content/59/2/201.full.pdf>

- Skandamis, P.; Koutsoumanis, K.; Fasseas, K. & Nychas, G. (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. [Artículo en Línea]. *Italian Journal of Food Science*, 13 (1), pp. 65 – 75. Disponible: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=959138> ISSN 1120-1770
- Soković, M.; Glamočlija, J.; Marin, P.; Brkić, D. & Griensven, L. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. [Artículo en Línea]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15 (11), pp. 7532 -7546. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030907> DOI: 10.3390/molecules15117532
- Stoicov, C.; Saffari, R. & Houghton, J. (2009). Green tea inhibits *Helicobacter* growth in vivo and in vitro. [Artículo en Línea]. *International journal of Antimicrobial Agents*, 33 (5), pp. 473-478. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2694061/> doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.032
- Tajkarimi, M.; Ibrahim, S. & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food – Review. [Artículo en Línea]. *Food Control*, 21, (9), pp. 1199 – 1218. Disponible:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713510000459> doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003
- Thoroski, J., Blank, G., y Biliaderis, C. (1989). Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. [Artículo en Línea]. *Journal of Food Protection*, 52 (6), pp. 399-403. Disponible: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-52.6.399?code=fopr-site> doi.org/10.4315/0362-028X-52.6.399
- Udagawa, Y. (1994). Some responses of herbs, grown in NFT, to the temperature of nutrient solution. [Artículo en Línea]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, Suppl. 1, pp. 372-373. Disponible: [http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=396\\_24](http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=396_24)
- Udagawa, Y. (1995). Some response of dill (*Anethum graveolums*) and thyme (*Thymus vulgaris*), grown in hydroponic, to the concentration of nutrient solution. [Artículo

- en Línea]. *Acta Horticulturae*, 396, pp. 203-210. Disponible: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301507596>
- Ultee, A., Slump, R.; Steging, G., y Smid, E.J (2000b). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. [Artículo en Línea]. *Journal of Food Protection*, 63 (5), pp. 620 – 624. <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-63.5.620>. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-63.5.620>
- Ultee, A.; Bennink, M.; & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of Carvacrol is essential for action against the foodborne pathogens *Bacillus cereus*. [Artículo en Línea]. *Applied Environmental Microbiology*, 68 (4), pp. 1561-1568. Disponible: <http://aem.asm.org/content/68/4/1561.full>
- Ultee, A.; Kets, E.; Alberda, M.; Hoekstra, F. & Smid, E. (2000a). Adaptation of the foodborne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, 174 (4), pp. 233 – 238. Disponible: <http://aem.asm.org/content/68/4/1561.full>
- Zartha, J.; Vélez, G; & Herrera, J. (2007). Diseño de un modelo para la evaluación del comportamiento del consumo de carne bovina usando dinámica de sistemas. [Artículo en Línea]. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 5 (2), pp. 118-125. Disponible: <http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotecnologia/articulo/view/67/52> ISSN-1692-3561
- Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., y Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 59, pp. 282 – 289. Disponible: <http://download.xuebalib.com/xuebalib.com.7412.pdf>
- Zhang, L., Cleveland, J., Newsome, R., Wang, H.,(2013). Antimicrobial resistance. Doyle, M., Buchanan., R. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4 Edition ( 19), Washington, DC USA. American Society for Microbiology.

# ANEXOS

**Anexo 1.** Gráfico de medias y 95% de confiabilidad de Fisher LSD para los halos de inhibición de cada tratamiento frente a *Salmonella Paratyphi*.



**Anexo 2.** Gráfico de medias y 95% de confiabilidad de Fisher LSD para los halos de inhibición de cada tratamiento frente a *Salmonella Enteritidis*.

