

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE ACEITES ESENCIALES Y/O
MOLÉCULAS TERPÉNICAS INCORPORADAS COMO ADITIVOS
ALIMENTARIOS ANTIMICROBIANOS CON PROTEÍNAS Y LÍPIDOS DE
LA CARNE ROJA.**

POR:

IRIS LUCERO CERDA RIVERA

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

JUNIO 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 25 de junio de 2021.

Oficio: 73/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
Presente:

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **"Análisis de las interacciones entre aceites esenciales y/o moléculas terpénicas incorporadas como aditivos alimentarios antimicrobianos con proteínas y lípidos de la carne roja"**, presentada por la **Lic. Iris Lucero Cerda Rivera**, alumna del programa de Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

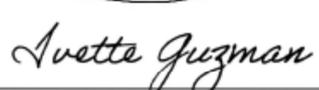
Atentamente
"Por la ciencia para bien del hombre"



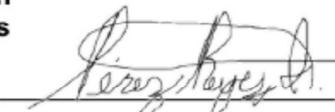
Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón
Asesora de tesis



M.C. Juan Guillermo Ayala Soto
Asesor de tesis



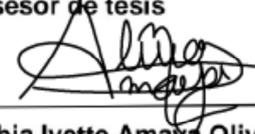
Dra. Ivette Guzmán
Asesora de tesis



Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



Dr. Néstor Gutiérrez Méndez
Asesor de tesis



M.C. Nubia Ivette Amaya Olivas
Asesora de tesis



Dr. León Raúl Hernández Ochoa
Director de tesis



***El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE ACEITES ESENCIALES Y/O
MOLÉCULAS TERPÉNICAS INCORPORADAS COMO ADITIVOS
ALIMENTARIOS ANTIMICROBIANOS CON PROTEÍNAS Y LÍPIDOS DE
LA CARNE ROJA.**

POR:

IRIS LUCERO CERDA RIVERA

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

JUNIO 2021

RECONOCIMIENTOS

Mi reconocimiento y gratitud a la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Facultad de Ciencias Químicas por las facilidades otorgadas a la presente investigación, por ocuparse de contar con laboratorios equipados y funcionales, sobre todo a quien lo hace posible.

La elaboración y realización de esta investigación de tesis, ha sido posible por el apoyo que me brindaron al ingresar al posgrado, en primer lugar, mi reconocimiento al **Dr. León Raúl Hernández Ochoa** por creer en mí y en mi capacidad para sacar adelante este proyecto.

También agradezco al Comité de Tesis, por su asesoría, particularmente a la **Dra. Virginia Nevárez Moorillon** por su codirección y ayuda constante, en especial por su orientación metodológica y por su continuo estímulo durante todo el proceso hasta al final del mismo.

Igualmente, mi gratitud a la **M.C. Nubia Ivette Amaya Olivas** asesora de este proyecto, por su apoyo y ayuda total, en cada uno de los pasos que se dieron para la realización de la tesis, por su amistad y compañerismo.

A mis compañeros **Arlet, Gerardo, Melisa y Valeria** por aceptarme como una más del grupo a pesar de la diferencia de edades, por su ayuda, orientación, su paciencia, y sobre todo por su amistad.

Además, mi reconocimiento a mis maestros que compartieron conmigo sus conocimientos y a todas aquellas personas que en forma directa o indirecta contribuyeron a que este trabajo de investigación pudiera llevarse a cabo.

DEDICATORIAS

Dedico este proyecto de investigación a mi esposo, por alentarme siempre a continuar en la búsqueda del conocimiento, quien a través de su ejemplo ha sido la inspiración para buscar una formación profesional y disciplinar más completa, gracias **Felipe** por apoyarme, por tu soporte y compañía y sobre todo por tu amor todos estos años.

A mis padres **Jesús † y Rebeca**, por estar siempre conmigo, porque sé a dónde acudir cuando necesito ayuda, por darme la oportunidad y por creer en mí, a mis hermanos **Perla e Israel** por apoyarme y alentarme a continuar bajo cualquier circunstancia, a mi amado sobrino **Adán**, que ha venido a darle luz a nuestra vida.

Chihuahua, chihuahua, a 07 de junio 2021

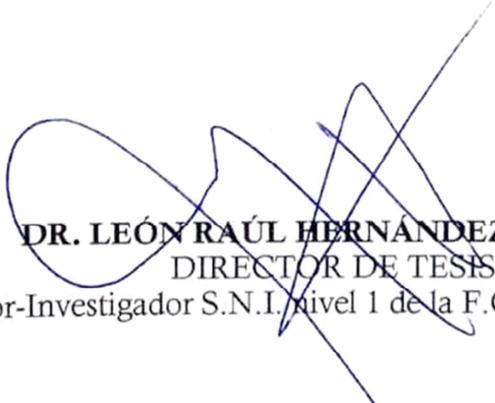
DR. ILDEBRANDO PÉREZ REYES
Secretario de Investigación y Posgrado

Estimado Dr. Ildebrando

Me permito comunicarle por medio de la presente que, el manuscrito de tesis titulado "**Análisis de las interacciones entre aceites esenciales y/o moléculas terpénicas incorporadas como aditivos alimentarios antimicrobianos con proteínas y lípidos de la carne roja**", elaborado por la alumna **M.A. Iris Lucero Cerda Rivera** con matricula 127680 inscrita en la Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos bajo mi dirección, fue debidamente revisado y corregido. Por lo consiguiente, autorizo su liberación y distribución, para que los asesores que integran el comité de tesis puedan realizar las correcciones pertinentes y emitir su dictamen.

Agradeciendo de antemano sus atenciones a la presente, reciba un cordial saludo.

Atentamente



DR. LEÓN RAÚL HERNÁNDEZ OCHOA
DIRECTOR DE TESIS
Profesor-Investigador S.N.I. Nivel 1 de la F.C.Q. de la U.A.CH.

C.c.p. Ph.D. Jaime Raúl Adame Gallegos Coordinador Académico SIP.



INDICE

RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
2. INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1. Aceites Esenciales	3
1.2. Carne Roja	10
1.3. Lípidos de la carne.....	12
1.4. Proteínas de la carne	14
1.5. Determinación Nutricional de la carne	15
1.6. Antecedentes de trabajos previos	16
4. JUSTIFICACION	19
5. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	21
5.1. Hipótesis.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1. Recolección del material vegetal	22
6.2. Extracción de los aceites esenciales:	23
6.3. Caracterización de los aceites esenciales.....	24
6.4. Determinación de la densidad de los aceites esenciales	25
6.5. Evaluación de las propiedades antimicrobianas.....	26
6.6. Dosis de letalidad.....	29
6.7. Incorporación de aceites esenciales en carne de res	31
6.9. Extracción de proteínas de la carne de res conservada con aceites esenciales	32
6.10. Peroxidación de la carne conservada con aceites esenciales	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1. Extracción de los aceites esenciales:.....	35
7.2. Caracterización de los aceites esenciales.....	37
7.3. Evaluación de las propiedades antibacteriana de los aceites esenciales	40
7.5. Dosis de letalidad DL50	45
7.7. Determinación de lípidos de la carne de res conservada con aceites esenciales.....	52
7.8. Peroxidación de la carne conservada con aceites esenciales	53
7.9. Determinación de proteínas por método Lowry de la carne de res conservada con aceites esenciales.....	54
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
9. BIBLIOGRAFÍA	57



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes principales de los aceites esenciales, con actividad antimicrobiana	7
Tabla 2. Composición nutricional de la carne	16
Tabla 3. Condiciones de análisis por GS/SM de los aceites esenciales	25
Tabla 4. Condiciones para la determinación de proteínas por método Lowry	33
Tabla 5. Condiciones y rendimiento de la extracción de aceites esenciales	36
Tabla 6. Componentes del aceite esencial de orégano	37
Tabla 7. Componentes mayoritarios del aceite esencial de comino	38
Tabla 8. Componentes del aceite esencial de clavo	39
Tabla 9. Determinación de la CMI y CMB de los extractos de aceites esenciales en seis cepas bacterianas	41
Tabla 10. Determinación de la CMI y CMB de las moléculas principales aceites esenciales de orégano y clavo en seis cepas bacterianas	43
Tabla 11. DL50 del AE de orégano	43
Tabla 12. DL50 del AE de comino	46
Tabla 13. Porcentaje de grasa contenida en la carne de res tratada con AE	52
Tabla 14. Peroxidación de la carne conservada con aceites esenciales	53



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del proceso de la experimentación	22
Figura 2. Proceso de extracción de aceites esenciales	23
Figura 3. Cromatógrafo de gases unido a un espectrómetro de masas (GS/SM) ...	24
Figura 4. Evaluación de la densidad de los aceites esenciales	25
Figura 5. Determinación de CMI y CMB en microplaca	29
Figura 6. Determinación de CMI y CMB en microplaca con indicador de rezasurina	29
Figura 7. Viales con solución de aceite esencial de orégano y <i>Artemia salina</i>	30
Figura 8. Caracterización: Compuestos mayoritarios de aceite esencial de orégano	37
Figura 9. Caracterización: Compuestos del aceite esencial de comino	38
Figura 10. Caracterización: Compuestos del aceite esencial de clavo	39
Figura 11. Curvas de crecimiento bacteriano en carne de res conservada con aceite esencial de orégano, en relación al control	47
Figura 12. Curvas de crecimiento en carne de res conservada con aceite esencial de comino, en relación al control	48
Figura 13. Curvas de crecimiento en carne de res conservada con aceite esencial de clavo, en relación al control	49
Figura 14. Curvas de crecimiento en carne de res conservada con eugenol, en relación al control	50
Figura 15. Curva de crecimiento en carne de res conservada con carvacrol, en relación al control	51

Figura 16. Determinación de proteínas por método Lowry de la carne de res conservada con aceites esenciales
54



ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE ACEITES ESENCIALES Y/O MOLÉCULAS TERPÉNICAS INCORPORADAS COMO ADITIVOS ALIMENTARIOS ANTIMICROBIANOS CON PROTEÍNAS Y LÍPIDOS DE LA CARNE ROJA.

Cerda-Rivera, I.1, Guzmán I.2, Nevárez-Moorillón G., Gutiérrez-Méndez N., Ayala-Soto J., Hernández-Ochoa, L.1, Amaya-Olivas, N.

1 Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chihuahua, México CP.31000

2 Facultad de Agricultura y Economía, Universidad Estatal de Nuevo México, Las Cruces, Nuevo México 88003, E.U.

Autor de correspondencia: lhernandez@uach.mx

1. RESUMEN

En últimos años, el uso de aceites esenciales (AE) en la conservación de alimentos ha ido en aumento, las investigaciones se centran en sus propiedades antimicrobianas, en particular el que los AE de comino, clavo y orégano y las moléculas e eugenol y carvacrol sobre carne de res son efectivos para inhibir crecimiento de bacterias patógenas para el hombre. Por lo tanto, resulta interesante conocer la interacción de ellos sobre el contenido protéico y lipídico de productos cárnicos. En el presente estudio se realizó extracción de AE mediante hidrodestilación y su composición se determinó mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas. Así mismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites. Se realizó una mezcla AE y moléculas con carne de res magra que se analizó durante 14 días y se realizaron pruebas biológicas para estimar la vida útil de la carne, se extrajeron proteínas por método Lowry y lípidos por método Soxhlet para cuantificación, así mismo se determinó la peroxidación de los lípidos de la carne y con ello contribuir a mejorar las técnicas convencionales de conservación, en conclusión se pudo observar que los AE tienen efectos positivos sobre macronutrientes como lípidos y proteínas, la carne roja ya que se puede conservar en condiciones óptimas por un periodo de 6 a 7 días sin afectar la inocuidad y calidad nutritiva relacionada con lípidos y proteínas.

Palabras clave: Aceites esenciales, conservación, antimicrobianos, aditivos alimentarios



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Analysis of interactions between essential oils and terpenic molecules incorporated as antimicrobial food additives with meat proteins and lipids.

Cerda-Rivera, I.1, Guzmán I.2, Nevárez-Moorillón G., Gutiérrez-Méndez N., Ayala-Soto J., Hernández-Ochoa, L.1, Amaya-Olivas, N.

1 Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chihuahua, México CP.31000

2 College of Agriculture and Home Economics, New Mexico State University Las Cruces, NM 88003, U.S.

Autor de correspondencia: lhernandez@uach.mx

ABSTRACT

In recent years, the use of essential oils (EO) in food preservation has been increasing, research is focused on their antimicrobial properties, in particular that the EO of cumin, clove and oregano and the molecules eugenol and carvacrol on beef they are effective in inhibiting the growth of human pathogenic bacteria. Therefore, it is interesting to know their interaction on the protein and lipid content of meat products. In the present study, EA was extracted by hydrodistillation and its composition was determined by gas chromatography and mass spectrometry. Likewise, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined to determine the antimicrobial activity of the oils. A mixture EO and molecules eugenol and carvacrol was made with lean beef that was analyzed for 14 days and biological tests were carried out to estimate the shelf life of the meat, proteins were extracted by the Lowry method and lipids by the Soxhlet method for quantification, likewise the peroxidation of meat lipids and thereby contribute to improving conventional preservation techniques, in conclusion it was observed that EO have positive effects on macronutrients such as lipids and proteins, red meat since it can be preserved in optimal conditions for a period of 6 to 7 days without affecting the safety and nutritional quality related to lipids and proteins.

Keywords: Essential oils, preservation, antimicrobials, food additives



2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el uso de aceites esenciales en la conservación de alimentos ha ido en aumento, las investigaciones se han centrado en sus propiedades antibacterianas (Dias, y otros, 2003)

Un aditivo es una sustancia diferente a los alimentos, que ha sido incorporado, como resultado de la manipulación, conservación o empaque, añadido de manera intencional para obtener algunos beneficios, como mejorar la calidad nutritiva, conservar mejor el alimento ocasionado por microorganismos, o bien si se pretende destacar alguna propiedad sensorial en ellos. Algunos conservadores químicos se les ha atribuido efectos carcinogénicos y teratogénicos, así como toxicidad residual, por lo que no hay certeza de qué tan seguros son. Por esta razón, se buscan otras opciones diferentes a los aditivos químicos, intensificándose la demanda por aditivos naturales. (PAHO, s.f.)

En algunos países de Latinoamérica, se han realizado investigaciones que hablan de las propiedades y usos de los aceites en la conservación de alimentos y en particular sobre productos cárnicos; y se han rescatado actividades antioxidantes y farmacológicas, además la utilización y uso de los aceites como aditivos antibacteriales, la divulgación de estas propiedades se ha extendido a más países en América Latina y México no ha sido la excepción, por mencionar un ejemplo la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” a través de su departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (2009) realizó una investigación de microencapsulación del aceite esencial (AE) de orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) para su aplicación en la conservación de carne de res”, donde se menciona que el prevenir la descomposición de los tejidos vegetales y animales implica un doble esfuerzo, por una parte conservar el alimento para su uso y por otra excluir las diversas formas de contaminación del alimento para su consumo. (Hernández, 2009)

Se ha demostrado que aceites esenciales como el aceite de comino, clavo y orégano tienen propiedades antibacteriales sobre la carne de res, un estudio realizado para evaluar esas propiedades, señaló que a diferentes concentraciones el aceite de



comino y clavo con sus respectivos extractos son los más efectivos para inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas para el hombre (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* Tiphymurium *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*), por un periodo de tiempo que va desde los 7 hasta los 14 días y según las investigaciones realizadas, refiere mantener la carne en buen estado. (Aguirre, 2014)

Por lo tanto, resulta interesante conocer los efectos que estos aceites tienen sobre la carne; la interacción de ellos sobre el contenido proteico y lipídico de los productos cárnicos; el uso de aceites esenciales como conservadores de la carne está más que demostrado, pero la información de la manera en que afectan el alimento, es algo aun por explorar.



1. ANTECEDENTES

1.1. Aceites Esenciales

Definición: Los aceites esenciales, forman parte del arsenal de la defensa de la planta contra sus depredadores, enfermedades y plagas. Muchos de sus componentes son llamados “armas químicas” de las especies vegetales, que les permiten sobrevivir e interactuar con el ambiente. (Stashenko, 2009)

Los aceites esenciales (AE) son metabolitos secundarios de bajo peso molecular (< 300 Da), apolares o medianamente polares, son volátiles y cada uno posee su olor característico (Stashenko, 2009) que se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas, son mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles. Los aceites esenciales están almacenados en glándulas, conductos, sacos, o simplemente reservorios dentro del vegetal, por lo que es conveniente desmenuzar el material para exponer esos reservorios a la acción del vapor de agua. Los AE son productos naturales aplicados en diferentes industrias, como son la farmacéutica, alimenticia, en perfumería, entre otros usos. Actualmente, se constituyen en productos alternativos para la elaboración de biopesticidas o bioherbicidas. (Stashenko, 2009)).

El aislamiento de AE y su caracterización mediante cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS) son sistemas de práctica común. Por otra parte, su actividad antimicrobiana puede ser verificada mediante ensayos in vitro. Los AE son cada vez más populares debido a que muchas drogas sintéticas están relacionadas con efectos secundarios desagradables, tales como nefrotoxicidad y ototoxicidad. Sin embargo, los AE deben aplicarse con cuidado porque su uso también puede conducir a indeseables efectos secundarios físicos, tales como reacciones alérgicas relacionadas con la aplicación dérmica. Como resultado de la alta volatilidad de AE, estas sustancias requieren condiciones exigentes de almacenamiento, incluyendo la utilización de depósitos herméticos y la evitación de la exposición a la luz. Su volatilidad complica el trabajo científico, así como el uso diario. Los aceites volátiles también representan una alternativa interesante debido a la aparición de resistencia de los microorganismos contra los agentes sintéticos. Es por eso que los AE a



menudo tienen éxito en la inhibición del crecimiento microbiano de las cepas de bacterias resistentes a los medicamentos, pero esto no implica que no haya actividad sin restricciones a los antimicrobianos de los AE ya que la resistencia contra los AE también existe. Los AE pueden ejercer no sólo los efectos bacteriostáticos y bactericidas, también demuestran actividad contra hongos y levaduras. (Lang G., 2012)

Propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales: La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales puede ser atribuida a los monoterpenos contenidos que, debido a su carácter lipófilo, actúan mediante la interrupción de la membrana citoplasmática microbiana, que por lo tanto pierde su alta impermeabilidad para los protones y grandes iones. Cuando la perturbación de la integridad de la membrana se produce, sus funciones se ven comprometidas, no sólo como una barrera, sino también como una matriz para las enzimas y como un transductor de energía. Desafortunadamente, los compuestos más naturales son biológicamente inestables, poco soluble en agua y ellos distribuyen pobremente a sitios de destino. Actualmente, algunos métodos novedosos se han introducido con el fin de mejorar su estabilidad y su biodisponibilidad, entre los cuales es el uso de encapsulación liposómica. (Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis, & Chinou, 2009)

En la presente investigación se buscó obtener extractos de diferentes matrices vegetales, que tienen propiedades funcionales como los aceites esenciales de comino (*Cuminum cyminum L*), clavo (*Eugenia caryophyllata*) y oregano (*Lippia berlandieri Schauer*) y probarlos sobre cinco cepas patógenas para el hombre (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* Tiphymurium, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*) y adicionar aceites esenciales como aditivos antibacteriales en carne de res. Se ha demostrado que el aceite de comino y clavo con sus respectivos extractos son los más efectivos para inhibir el crecimiento de las bacterias mencionadas. El aceite de comino ha demostrado, una reducción de 3.78 log UFC/g con la aplicación de 750 µL, el aceite de clavo logró una reducción de 3.78 log UFC/g con la aplicación de 2250 µL sobre carne de res (pulpa de res del



área de la paleta) y con esto, los aceites esenciales pueden alargar la vida de útil del alimento. (Aguirre, 2014)

Composición de los aceites esenciales: La caracterización de un aceite esencial comienza con la identificación de la planta, la parte utilizada de ella (flores, hojas, tallos, cortezas, frutos, raíces, etc.), después el nombre común, el nombre botánico, tipificación taxonómica, género, especie, subespecie (si la hay) y familia. Es necesario especificar el quimiotipo de la planta, ya que la planta recibe el nombre por el compuesto que la distingue. Se recomienda indicar la procedencia del cultivo (país y región), con el método de extracción del aceite esencial (hidrodestilación en este caso), ya que estos factores inciden en la composición de los aceites esenciales, por ejemplo los factores geográficos y climáticos del cultivo de las plantas, dan origen a diferentes quimiotipos de la planta y como efecto los AE tienen propiedades sensoriales y actividades biológicas diferentes. (Stashenko, 2009)

Algunos de los metabolitos secundarios que componen los AE son alcaloides, carotenoides, saponinas, flavonoides y otros; algunos metabolitos secundarios de la planta son destilables (vapor de agua, agua/vapor o hidrodestilación) o AE, están formados por una o varias sustancias volátiles:

1. Terpenoides.
2. Compuestos fenólicos y sus derivados.
3. Moléculas no terpénicas (alcoholes, ésteres, ácidos, etc.).
4. Compuestos heterocíclicos, que contienen átomos de nitrógeno o azufre.

La composición de los aceites esenciales presenta una proporción de hidrocarburos de la serie polimetilénica, del grupo de los terpenos que responden a la fórmula $(C_5H_8)_n$ junto con otros compuestos, casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos). Son productos químicos intensamente aromáticos, volátiles y poco densos (Flores, 2010). Estos compuestos son responsables de la fragancia y propiedades biológicas de plantas aromáticas y medicinales. Los compuestos principales pueden constituir hasta el 85% del aceite esencial, mientras que el resto de los compuestos se encuentran presentes en

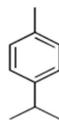
cantidades pequeñas. Hay evidencia de que algunos compuestos de menor importancia tienen una parte crítica en la actividad antimicrobiana, probablemente al producir un efecto sinérgico con otros compuestos. (Macias, 2009)

Las fórmulas estructurales de algunos compuestos antibacterianos presentes en los aceites esenciales se muestran en el siguiente diagrama:

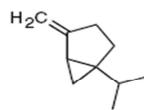
1. Terpenos

- Monoterpenos

Hidrocarburos monocíclicos



Cimenol



Sabineno

Hidrocarburos bicíclicos

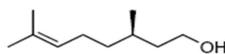


α - Pineno

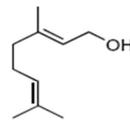


β - Pineno

Alcoholes acíclicos

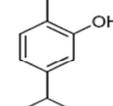


Citronelol

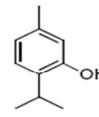


Geraniol

Fenoles



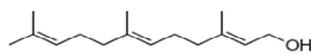
Carvacrol



Timol

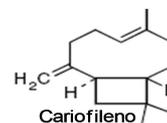
- Sesquiterpenos

Hidrocarburos



Famesol

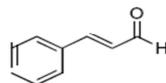
Alcohol



Cariofileno

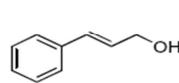
2. Compuestos aromáticos

Aldehído



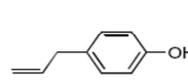
Cinamaldehído

Alcohol



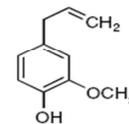
Alcohol cinámico

Fenol



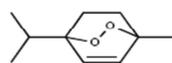
Chavicol

Fenol

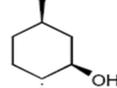


Eugenol

3. Terpenoides (Isoprenoides)



Ascaridol



Mentol

La composición detallada de los aceites esenciales se realiza mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas, se pueden observar alrededor de 70 componentes individuales, entre los que destacan los componentes fenólicos



son los responsables de las propiedades antibacterianas que se le atribuyen a algunos de ellos. (Burt S. , 2004).

Los componentes principales de una serie de AE con propiedades antibacterianas se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Componentes principales de los aceites esenciales, con actividad antimicrobiana

Nombre común	Nombre científico de la planta	Principales componentes	% aproximado de composición	Referencias
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	80%	Lawrence, 1984; Prudent et al., 1995
		Thymol	Trace-64%	Charai et al., 1996; Sivropoulou et al., 1996;
		g-Terpinene	2 –52%	Kokkini et al., 1997; Russo et al., 1998;
		p-Cymene	Trace-52%	
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	a-pinene	2 - 25%	
		Bornyl acetate	0 –17%	Daferera et al., 2000, 2003;
		Camphor	2 –14%	Pintore et al., 2002
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	1,8-cineole	3- 89%	
		Eugenol	75–85%	Bauer et al., 2001
		Eugenyl acetate	8 –15%	
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol	10–64%	Lens-Lisbonne et al., 1987;
		Carvacrol	2 – 11%	Mc Gimpsey et al., 1994
		g-Terpinene	2 –31%	Cosentino et al., 1999; Marino et al., 1999
		p-Cymene	10–56%	Daferera et al., 2000; Juliano et al., 2000)

Fuente: Essencial oils: Their antibacterial properties and potential applications in food. A review (2004)

Métodos de obtención de los aceites esenciales: Existen diferentes métodos de extracción de aceites esenciales. Estos métodos se pueden clasificar en oficiales y no oficiales. Los no oficiales son principalmente usados en perfumería y alimentación. Los más importantes son extracción con disolventes orgánicos apolares (diclorometano, éter de petróleo o hexano), extracción con grasas (generalmente de origen vegetal) y extracción con gases licuados (butano, propano, dióxido de carbono). Los métodos oficiales son los contemplados en la farmacopea



para obtener los aceites esenciales de uso farmacéutico. Estos métodos oficiales se clasifican a su vez en: método de inyección de vapor de agua (donde el agua no está inicialmente en contacto con la muestra), hidrodestilación (la muestra y el agua se ponen en contacto y se llevan a la ebullición) y destilación mixta (el agua y la muestra se sitúan en un mismo recipiente, pero sin que entren en contacto). (Blanco, 2005)

Hidrodestilación: La destilación de material vegetal por medio del arrastre del aceite esencial con vapor de agua; es un procedimiento ampliamente utilizado debido a que el equipo necesario es relativamente sencillo y a su gran versatilidad a la hora de aplicarlo a materiales vegetales diferentes. Su principal inconveniente es la alta temperatura de operación. Esto lo hace inapropiado para aquellos aceites esenciales con componentes sensibles al calor. Además, una operación incorrecta de este método puede producir un aceite esencial de baja calidad y con evidente aroma a tostado. (Ortuño, 2006)

El principio de la hidrodestilación es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite que es inmisible en agua, es posteriormente separado y recuperado; este proceso puede durar algunas horas. Los solventes más empleados son el éter y el hexano. Los métodos tradicionales de extracción requieren altos tiempos de extracción y grandes cantidades de solvente. Entre sus ventajas, por encima de otros métodos nuevos, está la de tener bastantes aplicaciones industriales, buena reproducibilidad, eficacia y menor manipulación del extracto. (Aguirre, 2014)

A continuación, se describen los aceites esenciales con los cuales se estará desarrollando la presente investigación debido a su probada actividad antimicrobiana:

Especies de plantas seleccionadas por su actividad biológica confirmada

Comino (*Cuminum cyminum*): Su nombre botánico, *Cuminum cyminum*, procede del griego kyminon, para la familia Umbelíferas. Una umbelífera es una planta con

racimos de flores planos o redondeados, que sobresalen de la parte alta de los tallos partiendo desde un único punto central (como una sombrilla). (Banerjee A., 2003).

La literatura menciona que el comino tiene algunas propiedades que influyen en la salud, como que tiene la particularidad de ser astringente y carminativo, eupeptico y que ha sido utilizado como conservante en algunos otros alimentos. Se le atribuyen propiedades como: que inhibe el crecimiento de algunos hongos de los alimentos, también se le atribuyen propiedades antimicrobianas, la literatura menciona que el extracto alcohólico de comino presentó una inhibición significativa de microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, el componente del extracto responsable de la actividad antimicrobiana no fue identificado. (Banerjee A., 2003)

Planta de comino
(*Cuminum Cyminum*)



Fuente: Especies exóticas, sabores y medicinas. Historia y colecciones especiales. Louise M. Daring Biomedical Library. (UCLA, 2019)

El contenido en aceite esencial del comino (*Cuminum cyminum* L.) incluye como compuesto mayoritario al cuminaldehído, así como otros aldehídos, varía entre el 2 al 6%, es usado como conservador natural en alimentos (Jayathilakan, Sharma, Radhakrishna, & Bawa, 2007)

Clavo (*Eugenia caryophyllata*): El clavo (*Eugenia caryophyllata*) es cultivado extensamente en Madagascar, el sur de China y Brasil (Shufen E., 2007).

Planta de clavo (*Eugenia caryophyllata*)

El clavo es muy utilizado como especia y por sus propiedades medicinales, tradicionalmente se ha utilizado en el cuidado dental como analgésico para el dolor. Presenta actividad antibacteriana contra bacterias de la cavidad oral y enfermedades periodontales, así como su efectividad contra bacterias patógenas para el hombre como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus*



Fuente: Franz Eugen Köhler, (1897) Plantas Medicinales de Köhler

aureus (Chaieb K., 2007). El componente mayoritario del aceite de clavo (Figura 3) es generalmente el eugenol (88.58%) con β -cariofileno, en menores cantidades, pero también se presentan hasta 36 compuestos distintos. (Burt S., 2003)

Orégano (*Lippia berlandieri schauer*): El nombre comercial “orégano” se refiere a un número de especias que producen aceites esenciales con un olor característico.

Una característica común de las plantas que se identifican como orégano, incluyen la presencia de p-cimeno y los derivados como el carvacrol en un 43.7% y timol en un 10.4%, siendo esto en muchos casos los compuestos mayoritarios y los responsables en gran medida de la actividad biológica del aceite esencial. (Levario, 2010) Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano, entre los cuales se ha reportado que presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*

Planta de orégano como (*Lippia berlandieri Schauer*) fenólicos



pneumoniae, *Yersinia enterocolitica* y *enterobacter cloacae*; y las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Martínez, 2009)

Fuente: Original book source: Prof. Dr. Otto Wilhelm Thomé *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* 1885, Gera, Germany

1.2. Carne Roja

Según el *Codex Alimentarius* define a la carne bajo los siguientes conceptos:

- **Carne:** Es la parte muscular y tejidos blandos que rodean al esqueleto de los animales de las diferentes especies, incluyendo su cobertura de grasa, tendones, vasos, nervios, aponeurosis y que ha sido declarada inocua y apta para el consumo humano.
- **Carne fresca:** La carne que no ha sido sometida a procesos de conservación distintos de la refrigeración, incluida la carne envasada al vacío o envasada en atmósferas controladas.



- **Carne roja:** Carne fresca sometida a proceso de molienda que contiene máximo un 30% de grasa.
- **Pulpa:** clasificada como uno de los cortes más blandos y magros de la carne se localiza sobre la cara medial de la pierna. Es un corte sin hueso de forma redondeada y consistencia blanda

Además, complementa el significado de 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” y se compone de agua, proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos. (FAO, 2015)

Métodos de Conservación de la Carne: Existen diferentes técnicas y métodos para la conservación de los alimentos, aquellos que son perecederos y que presentan necesidades particulares para alargar la vida de anaquel con la finalidad de tener un alimento fresco, que conserve sus características organolépticas y sobre todo inocuo, a continuación, se presentan los métodos convencionales para la conservación de la carne:

* **Métodos Físicos**

Refrigeración. - La norma oficial mexicana refiere que los alimentos refrigerados deben permanecer a una temperatura máxima de 4°C (NOM-251-SSA1, 2009) y busca mantener la carne en buen estado hasta el momento de prepararla consumirla, es un método muy aplicado, que no altera los alimentos y la multiplicación bacteriana se ve enlentecida, además de retrasar la descomposición de los alimentos y se conservan por más tiempo, en buenas condiciones.

Congelación.-Tiene por objetivo disminuir la multiplicación bacteriana, ya que convierte la humedad de los alimentos en hielo para conservar la calidad y textura de los alimentos, se busca crear una congelación rápida de la carne que forme cristales pequeños y se congela a temperaturas muy inferiores, por lo general en torno a -12°C a -18°C (Veall, 1993), la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por



sus siglas en inglés) sugiere que congelar alimentos a una temperatura de 0° F (-18° C) los mantiene seguros por tiempo indefinido. (FDA, 2018)

Nuevas metodologías: Además de las ya mencionadas, existen nuevas metodologías para la preservación de los alimentos, que permiten mantenerlos en un estado óptimo.

Altas presiones hidrostática. - APHs una nueva tecnología en la industria de los alimentos, es efectiva en la conservación. La APH provoca la inactivación de las células microbianas, no altera la calidad sensorial, ni los nutrientes termolábiles de los alimentos como las vitaminas por ejemplo, no lo deforma el alimento porque la presión se transmite de manera uniforme e instantánea, tampoco altera el sabor natural, ni la coloración de los alimentos. Sin embargo, presenta algunas desventajas, una de ellas es el alto costo del equipo, no es posible la aplicación en algunos alimentos (frutas, verduras) porque perderían su forma y aspecto original. Por todas sus ventajas y características tiene diferentes aplicaciones en la industria alimentaria, orientadas a la conservación de los alimentos. (Téllez-Luis, Ramírez, Pérez-Lamela, Vázquez, & Simal-Gándara, 2001).

Pulsos de luz. - Al igual que los anteriores se pretende una mínima alteración de las propiedades naturales de los alimentos y los pulsos de luz, inducen reacciones fotoquímicas y foto termales en los alimentos, causando la muerte de gran cantidad de microorganismos, especialmente en productos alimenticios empacados. (Rodríguez-Sauceda, y otros, 2014)

1.3. Lípidos de la carne

Los lípidos resultan imprescindibles para la aceptabilidad de la carne, ya que su concentración en la misma y la composición de cada una de las fracciones lipídicas incluyen de manera importante en sus propiedades organolépticas (textura, jugosidad, sabor, aroma, color, etc., de los alimentos cocinados). La grasa es el componente más variable, su contenido oscila aproximadamente entre 1,5 al 13% (Hernández G. A., 2010)



El contenido lipídico del principal componente de la carne, el músculo, es muy variable, como el porcentaje mencionado en las líneas anteriores. Consta fundamentalmente de lípidos de depósito y estructurales. Los lípidos de depósito son la fuente de energía celular. Están constituidos por ésteres del glicerol con ácidos grasos, predominando los triglicéridos, aunque también pueden contener pequeñas cantidades de monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres. Aunque algunos lípidos neutros están presentes como acúmulos microscópicos en el interior de las células musculares, la mayoría se localizan en los adipocitos del tejido conectivo laxo. Este depósito corresponde a la grasa intramuscular conocido también como “veteado” o “marmorización” y presenta grandes diferencias, dependiendo del tipo de músculo, especie, raza, tejido, dieta e influencias medioambientales. (Arias, Keim, Velásquez, & Vargas-Bello-Pérez, 2016)

La cantidad y calidad de ella depende de factores tales como edad, sexo, alimentación y zona de la canal. Aproximadamente la mitad de su contenido en grasas son saturadas (destacando el ácido palmítico y el esteárico), mientras que la otra mitad son insaturadas predominando los ácidos grasos monoinsaturados (principalmente ácido oleico -el cerdo es especialmente rico en éste-). La grasa es uno de los tres agentes palatables de los alimentos por lo que su presencia en la carne, además de ser vehículo de vitaminas liposolubles vitaminas liposolubles, hace que podamos diferenciar los distintos tipos de carne. La carne de los rumiantes, al igual que la leche, es una fuente de ácidos grasos trans naturales, los cuales, según recientes estudios, no parecen tener el mismo efecto sobre la salud que los obtenidos industrialmente de fuentes vegetales para fabricar productos de panadería y repostería que ejercen un mayor impacto sobre la enfermedad cardiovascular; muchos derivados cárnicos, como los embutidos, suelen tener un contenido graso superior y es por ello por lo que se recomienda moderar su consumo. (Arias, et al. 2016)

Modificaciones de los lípidos en la carne: La mayor causa del deterioro de la calidad de la carne y productos cárneos es la oxidación lipídica. En este proceso



se forman compuestos responsables del olor y sabor rancio que, además, disminuyen la calidad nutricional. (Dias, y otros, 2003).

1.4. Proteínas de la carne

Proteínas Miofibrilares: Representan más del 50% de las proteínas totales del músculo siendo la miosina (27) y la actina (11%) las proteínas mayoritarias de este grupo, estas proteínas son responsables de la capacidad de retención de agua, de las propiedades emulsionantes o de la textura de la carne. Además, estas proteínas contienen cantidades importantes de aminoácidos esenciales y contribuyen, en más del 70 % al aporte proteico debido al consumo de carne (Fennema, 2017).

Proteínas del Estroma: Constituyen un 10-15% del contenido total de proteínas del músculo. Las dos proteínas principales del tejido conjuntivo son el colágeno y la elastina que representan más del 50% de las proteínas del estroma. En el caso de algunos derivados cárnicos, solamente aparecen desequilibrios cuando se trata de embutidos que incluyen en sus formulaciones cantidades excesivas de tejido conectivo (colágeno), por los elevados niveles de hidroxiprolina y de glicina de esta proteína. La importancia de los embutidos en cuanto suministradores de proteínas a la dieta humana depende, en gran medida, de las materias empleadas para su elaboración, dando lugar a claras diferencias en el contenido proteico total, tanto en los cocidos como en los crudos, frescos o curados (Hernández, 2010).

Funciones: Las principales funciones de las proteínas son:

- * Función plástica o estructural. Las proteínas constituyen el 80% del peso seco de las células.
- * Función de control genético. Las características hereditarias dependen de las proteínas del núcleo celular.
- * Función inmunitaria. Los anticuerpos que intervienen en los fenómenos inmunitarios son proteínas.
- * Función biorreguladora. Las enzimas, y algunas hormonas, son de naturaleza proteica. (Hernández, 2010)



1.5. Determinación Nutricional de la carne

En la presente investigación se buscó la utilización de aceites esenciales de comino, clavo y orégano para conservar la carne roja de res en condiciones óptimas para su consumo, además de esto se pretende mantener la disponibilidad de las proteínas y lípidos en las mejores condiciones después de la utilización de estos aceites esenciales; se evaluó la carne en función del contenido y proporción de proteínas y lípidos.

La carne posee entre el 20 – 25% de proteína, frecuentemente el valor nutricional de una proteína se expresa según su «score» o cómputo químico, valor que se deriva de la composición aminoacídica de dicha proteína, comparándola con la de un patrón de referencia (proteína del huevo) a la que se le asigna un valor máximo (100). Dentro de los aminoácidos esenciales, aquel que en un determinado alimento o dieta está en mayor deficiencia, comparando con el patrón de aminoácidos de la proteína del huevo, recibe el nombre de aminoácido limitante porque al ser utilizado en la síntesis de una nueva proteína va a limitar la capacidad de síntesis proteica del organismo a falta de suficiente cantidad de este aminoácido. De esta manera, el porcentaje de aminoácido limitante presente en un alimento dado, en comparación con la proteína alimentaria patrón, nos proporciona el llamado «chemical score». (FUN, 2001).

Desde el punto de vista nutricional, 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. La carne es rica en vitamina B12 y hierro, los cuales no están fácilmente disponibles en las dietas vegetarianas.

El contenido de lípidos en la carne es fuente de energía. El colesterol que contiene es un tipo de grasa necesaria para la formación de la membrana celular, la formación de hormonas, en la producción de bilis (por mencionar algunos). Aunado a esto el colesterol encontrado en la piel es convertido por la luz solar a la forma activa de la vitamina D. (Carbajal, 2001)

**Tabla 2. Composición nutricional de la carne y otras fuentes de alimento por 100 g****

Producto	Agua	Proteínas	Grasas	Cenizas	kJ*
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

Fuente: Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, Producción y Sanidad Animal. 2015.

** Meat processing technology for small- to medium-scale producers (FAO 2007).

1.6. Antecedentes de trabajos previos

Se realizó un estudio para determinar la capacidad antioxidante y conservante del aceite esencial de tomillo mendocino (*Acantholippia seriphioides*) en hamburguesas funcionales, conservadas a 4 ± 0.5 °C. Se elaboraron medallones y se utilizó aceite esencial de tomillo (AET) como conservador, con un resultado de 10^6 UFC/g, además se probó el tipo de envasado, bolsas de poliamidapolietileno y se utilizó una atmósfera modificada: 70% N₂, y 30% CO₂, y en bolsas de vacío, se experimentó a un tiempo de almacenamiento de 0, 1, 2, 3 y 4, semanas; con unas dosis AET de 150 mg/kg. Los datos se analizaron de acuerdo con un arreglo factorial 2 (tipo de envasado) x 5 (tiempos de almacenamiento) x 2 (dosis de AET) en un diseño de parcelas subdivididas con 4 repeticiones. Se evaluaron pH, color, olor y carga microbiana. Para color y olor se recurrió a un análisis sensorial descriptivo y la carga microbiana se presentó un resultado de 10^6 UFC/g, lo cual se consideró no aceptable. El pH disminuyó y se examinó mediante un modelo polinomial de 2 grados. Para el empaque al vacío se mantuvieron los atributos sensoriales, durante las dos primeras semanas, pero no disminuyó la carga microbiana; se concluyó que el AET tiene efecto antioxidante pero no conservante en hamburguesas de carne vacuna bajo las condiciones del ensayo. (Dias, y otros, 2003).

Otro estudio, se realizó para medir el efecto de la aplicación de los aceites esenciales extraídos a partir de las hojas de pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica*), hojas de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano (*Oreganum vulgare*) en la preservación de carne de res. Por lo que se buscó evaluar el efecto de aplicar aceites esenciales



extraídos a partir de a partir de las hojas de pimienta de Jamaica, canela y orégano, en la calidad de carne de res durante su almacenamiento. En la investigación se determinó el rendimiento de los aceites esenciales evaluados, presentando el mayor rendimiento el aceite esencial de orégano ($2,2\% \pm 0,6$). En la valoración de la conservación de la carne de res, las muestras se almacenaron al vacío por 24 días a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y cada seis días se evaluó (hasta 24 días) el recuento de bacterias psicrófilas, *Pseudomonas* y bacterias lácticas. Se determinó que, durante el almacenamiento, el número de bacterias psicrófilas en la muestra control aumentó 7 ± 1 logaritmos, para este tipo de bacterias el aceite esencial de orégano presentó el menor crecimiento (1 ± 2 logaritmos). En el caso de las *Pseudomonas*, el crecimiento en la muestra control fue de 4 ± 2 logaritmos y el aceite esencial de Pimienta de Jamaica el recuento de bacterias no cambió durante el almacenamiento. En bacterias lácticas, el crecimiento de la muestra control fue de 6 ± 1 logaritmos, mientras que la muestra con aceite de orégano fue de 1 ± 3 logaritmos. En cuanto a las características organolépticas de la carne que fue impregnada con los aceites esenciales en concentraciones de 0.04% no se encontraron diferencias significativas con respecto a la muestra control, mientras que las muestras a concentraciones de 0.08% fueron significativamente diferentes a las anteriores y de menor agrado al consumidor; la canela afectó negativamente la percepción visual de los consumidores hacia las diferentes muestras de carne. (Lizano Cruz, 2013)

Se investigó el efecto antibacteriano de los aceites esenciales derivados de cítricos de limón, enebro (*Juniperus communis*), mejorana (*Origanum majorana*) y salvia (*Salvia sclarea*), solos o en combinación, en dos bacterias relacionadas con los alimentos *B. cereus* y *E. coli*, se probó la influencia de los ingredientes de los alimentos (proteínas hidrolizadas que se originan a partir de animales y plantas (extracto de carne y peptona de soya y sacarosa) para la evaluar actividad microbiana y se utilizó la técnica de difusión en agar para valorar el efecto inhibitorio de los aceites esenciales; los que resultados que se obtuvieron fueron que la *E. coli* Gram negativa mostró menos sensibilidad a todos los aceites; se observó una reducción significativa en la tasa de crecimiento de *B. cereus* en presencia de aceite



esencial de limón y aceite esencial de mejorana usando concentraciones de 0.125 y 0.5 $\mu\text{l ml}^{-1}$, respectivamente. Los efectos de la proteína hidrolizada en este estudio mostró que las bajas concentraciones de extracto de carne dieron lugar a un aumento de la fase de retraso y disminución significativa de la tasa de crecimiento de *B. cereus* tratada con aceite de mejorana y para la fase de retraso de *E. coli* se alargó significativamente con aceite de mejorana con una concentración de proteína de carne del 1% (p/v) ($P < 0.01$), pero en concentraciones más altas, el extracto de carne protegió a la bacteria contra el efecto reductor del crecimiento del aceite de mejorana. La tasa de crecimiento máxima disminuyó al aumentar la concentración de extracto de carne independientemente de la ausencia o presencia de aceite de mejorana. El aceite de mejorana aumentó las fases de retraso de *E. coli* en todas las concentraciones de peptona de soya. La sacarosa intensificó el alargamiento de la fase de retardo con aceite de mejorana de manera independiente de la dosis. El estudio concluye que la mejor actividad antibacteriana se logró con aceite de mejorana (contiene terpinen-4-ol, linalool y linalil-acetato) y salvia (contiene linalool y linalil-acetato) y que la bacteria Gram-negativa, *E. coli*, tuvo menos influencia que la bacteria Gram-positiva, *B. cereus*, menciona también que son más susceptibles que las Gram-negativas. En los alimentos, usualmente se requieren mayores concentraciones de AE para la acción antimicrobiana que in vitro porque algunos ingredientes de los alimentos, como las proteínas y las grasas, disminuyen su efecto; se promueve la eficacia del aceite de orégano y tomillo en presencia de altas concentraciones de proteínas. (Tserennadmid, Takó, Galgóczy, & Tamás, 2010)



4. JUSTIFICACION

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en el mundo, ha significado un gran problema en la salud pública, las ETA tienen una repercusión directa en la salud humana, y se expresan en diferentes signos y síntomas, la mayoría gastrointestinales y la manifestación clínica frecuente es la diarrea, ocasionada por la ingestión de alimentos contaminados, que tienen diferentes vectores y distintas vías de contaminación y se puede presentar en cualquier etapa del proceso, que va desde la producción de alimentos hasta el consumo de los mismos, debido a esto, vigilar y mejorar los métodos de conservación de alimentos existentes; es una prioridad para evitar el desperdicio y consumo de alimentos contaminados.

Según estimaciones de la OMS (2015) refiere que las ETA constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad, también menciona que es un obstáculo al progreso socioeconómico de los países. La OMS manifestó que, durante el año 2010, 31 microorganismos fueron la causa de 600 millones de casos de ETA, de los cuales hubo 420 000 muertes y que dentro los agentes etiológicos la *Salmonella* entérica no tifoidea causo la muerte de 230 000 personas, otras causas significativas de muerte por transmisión alimentaria fueron *Salmonella Typhi*, *Taenia solium*, el virus de la hepatitis A y la aflatoxina, con esto la OMS dejo en manifiesto que la carga mundial de ETA es un punto a considerar y que aflige a personas de todas las edades. (WHO/FOS , 2015).

La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) refiere que algunas de las ETA son causadas por la presencia de microorganismos como son *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, Enterococos, Coliformes fecales, por mencionar algunas. En algunos países como México, el boletín pronunciado por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reportaron un poco menos de cinco millones de casos atribuidos a enfermedades infecciosas intestinales, de los cuales más de la mitad de éstos continúan presentándose en mujeres (SINAVE, 2017).



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Actualmente, se pretende tener opciones en la conservación de alimentos que permitan regresar a lo elemental, a técnicas sin aditivos químicos que alteren las propiedades y características organolépticas del alimento, debido a lo expresado, en el trabajo de investigación se realizaron pruebas para evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de comino, orégano y clavo enfatizando el estudio en la interacción de los aceites esenciales antes mencionados con lípidos y proteínas contenidos en la carne roja.



5. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

5.1. Hipótesis

Los aceites esenciales y/o moléculas terpénicas incorporadas a la carne roja funcionarán como aditivos alimentarios antimicrobianos sin modificar proteínas y lípidos.

5.2. Objetivos

General

- * Analizar las interacciones entre aceites esenciales y/o moléculas terpénicas de clavo, orégano y comino, incorporadas como aditivos alimentarios antimicrobianos con proteínas y lípidos de la carne roja.

Específicos

- * Realizar la extracción de aceites esenciales de plantas seleccionadas individuales por el método de hidrodestilación.
- * Demostrar la eficiencia antimicrobiana de los extractos obtenidos de los aceites esenciales y moléculas mayoritarias sobre microorganismos tipo Gram-positivos y Gram-negativos por técnicas *in vitro*
- * Evaluar el contenido de lípidos y proteínas de la carne que ha sido conservada con aceites esenciales; a través metodologías de cuantificación

6. MATERIALES Y MÉTODOS



Figura 1. Diagrama del proceso de la experimentación

En la figura 1, se puede observar de manera gráfica, los pasos a seguir en la metodología descrita con anterioridad, en donde se puede apreciar la secuencia de procedimientos a desarrollar.

Como primer punto está la selección de material prima, seguida de la extracción de aceites esenciales por hidrodestilación, a los cuales se les realizarán pruebas microbiológicas y análisis físico-químicos por cromatografía de gases, para luego hacer pruebas de vida de anaquel.

Una vez concluida esta parte se realizará la aspersion en la carne roja, la cual será evaluada por un periodo mínimo de 14 días, después se harán pruebas microbiológicas a la carne roja, evaluación de proteínas y grasas, así como análisis sensoriales para evaluar la aceptación de la misma una vez que ha sido conservada con aceites esenciales de comino, clavo y orégano.

6.1. *Recolección del material vegetal*

El material vegetal de orégano, comino y clavo se obtuvo de mercados locales como Distribuidora Cardona en la ciudad de Chihuahua, se consideraron 11.5 kilogramos

de orégano (*Lippia berlandieri Schauer*), 11 kg de comino (*Cuminum cyminum*) y 3.5 kilogramos de Clavo (*Eugenia caryophyllata*), se almaceno en empaques de plástico, condiciones secas, a temperatura ambiente hasta la extracción.

6.2. Extracción de los aceites esenciales:

Para la extracción de los aceites esenciales los materiales vegetales de orégano, comino y clavo se sometieron a proceso de hidrodestilación (HD), utilizando el aparato modificado de Schilcher como se muestra en la figura 2.

El aparato consiste en una mantilla de calentamiento, un matraz esférico de 10 L de capacidad, una tapa para matraz, una columna de destilación con refrigerante de tipo serpentín conectada a una bomba de circulación de agua, un vaso florentino y una bureta recolectora.

El material vegetal se pesó en una balanza analítica Pioneer modelo Ohaus y se depositó dentro del matraz que contenía 5 litros de agua destilada, fue puesto sobre la mantilla de calentamiento y se llevó a una temperatura de 100°C y se mantuvo así por un periodo de seis horas de extracción, durante ese tiempo se mantuvo la bomba de circulación sumergida en agua con hielo para mantener las condiciones de temperatura sugeridas en la literatura descrita. (Hernández, 2005)

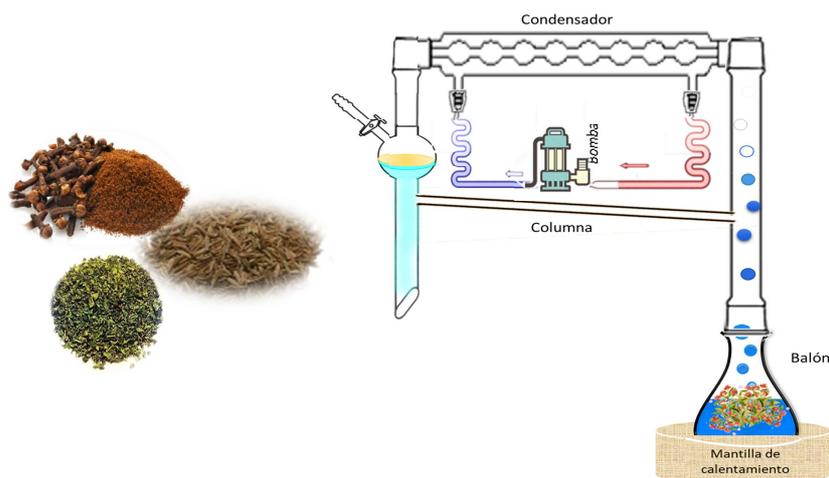


Figura 2. Proceso de extracción de aceites esenciales



El aceite esencial (AE) de cada uno de los materiales vegetales que se obtuvieron por la técnica de Hidrodestilación, se colectaron en envases de vidrio ámbar y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta los análisis programados.

El rendimiento de cada uno de los aceites se determinó al finalizar el proceso de extracción que se desarrolló siempre en las mismas condiciones de tiempo, temperatura, cantidades de material vegetal y agua destilada con la siguiente fórmula: **% Rendimiento = P/p (100)**

Donde:

P = Peso (g) obtenido del aceite esencial

p = Peso (g) del material vegetal seco.

(León Méndez, Osorio Fortich, & Martínez Useche, 2015)

6.3. Caracterización de los aceites esenciales

La identificación de los componentes volátiles del AE de comino, clavo y orégano se llevó a cabo por cromatografía de gases (GC-MS), marca Perkin-Elmer Auto Systems XL, acoplado a un espectrómetro de masas (Espectrómetro Perkin-Elmer Turbo Mass Gold) (Figura 3), la columna seleccionada fue capilar PE-5 (fase estacionaria metil-fenil-silicona al 5%), dimensiones de 60 m de longitud por 0.25 µm de diámetro no polar. Las condiciones operatorias para cada uno de los dos aceites, se muestran en el Tabla 1. La identificación de los compuestos se basó en la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca Saturno y datos de la biblioteca NIST 98 del sistema de GC-MS.



Figura 3. Cromatógrafo de gases unido a un espectrómetro de masas (GS/SM).

Tabla 3. Condiciones de análisis por GS/SM de los aceites esenciales.

Planta	Temperaturas 1 y 2 (° C)	Tiempos 1 y 2 (min.)	Gradientes 1 y 2 (°C /min.)
Orégano (<i>Lippia berlandieri</i>)	120	1	8
Comino (<i>Cuminum cyminum</i>)	120	1	8
Clavo (<i>Eugenia caryophyllata</i>)	120	1	8

En la tabla 3 se muestran las condiciones de análisis de los aceites esenciales por cromatografía de gases, temperatura y tiempos de retención.

6.4. Determinación de la densidad de los aceites esenciales

Para la elaboración de la solución madre al 2% se realizó la medición de la densidad de los aceites esenciales con la fórmula: $d = m/v$

Donde:

d = densidad

m = masa

v = volumen

Se utilizaron 3 pignómetros que se colocaron a peso constante por 24 horas a 100°C en una estufa marca Felisa, transcurrido ese tiempo se retiraron de la estufa y se pesaron en una balanza. Se registró el peso para obtener la masa; el volumen de los pignómetros es de 25 mL los cuales se llenaron completamente con cada aceite esencial, se introdujo el termómetro y se volvió a pesar para obtener el peso con el aceite y se restó el peso del matraz, se procedió a los cálculos para obtener la densidad de cada uno de los aceites como se muestra en la figura 4.



Figura 4. Evaluación de la densidad de los aceites esenciales



6.5. Evaluación de las propiedades antimicrobianas

Las cepas utilizadas en este estudio son:

- *Escherichia coli*,
- *Salmonella typhi*,
- *Listeria typhimorium*,
- *Staphylococcus aureus* y
- *Bacillus cereus*,
- *Pseudomona aeruginosa*

Se pesaron 1.61 gramos de agar nutritivo en una balanza granataria marca Pioner, modelo Ohaus y se colocó en un matraz erlen ayer y se aforo con 70 mL de agua destilada, previamente cubierto con un gorro de gases y envuelto en papel estraza con cinta testigo; se mezcló y clarifico en un mechero, después de eso se puso a esterilizar a 121°C por 15 minutos en autoclave y se llenó (según el indicador) con agua destilada.

Se limpió la campana de flujo laminar con una solución de benzal (diluido con agua destilada) y se prendió la luz UV durante 15 minutos para esterilizarla, después se encendió el extractor antes de abrir la compuerta, cuando se tuvo esterilizado el medio de cultivo, se procedió a vaciar 9 mL de agar nutritivo en cada una de cajas Petri, se tomó el asa de nicromio previamente flameadas, se tomaron colonias aisladas de bacterias proporcionas por el cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH y se procedió a inocular en el agar ya solidificado. Se invirtieron y se colocaron en la incubadora a 37°C por 24 horas. Trascorrido ese lapso se retiran de la incubadora y se procede a la cuenta de las colonias formadas en un contador de colonias marca Felisa ® y se elaboró la solución bacteriana detallada en el punto 3.4.

Elaboración de la solución madre: Se elaboró una solución a 20,000 partes por millón (ppm), considerando la densidad de cada uno de los aceites para obtener el volumen para obtener un valor de 2.69 cm³ para el aceite esencial de clavo, de 1.39



cm³ para el aceite esencial de orégano y de 0.95 cm³ para el aceite esencial de comino y hacer cálculos correspondientes en la elaboración de la solución madre.

Caldo de soya tripticaseína: Se pesaron 3 g de caldo soya tripticaseína y se diluyeron en 100 ml de agua destilada, posteriormente se pesaron 10 g de Peptona de Carne y se diluyeron con las sales añadidas, se agregaron 100 ml más de agua destilada, luego se pesaron 7.5 g de agar bacteriológico y se agregaron 300 ml de agua destilada, finalmente se adicionaron 7.5 ml de glicerol. Se puso a calentar agitando periódicamente, hasta que la disolución se clarificó, esto es que tornó traslucido. En una olla a presión se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar un poco y en un ambiente de esterilidad se vertieron en cajas Petri y se dejaron enfriar hasta que solidificaron.

Caldo de soya tripticaseína adicionado con aceites esenciales: Para la concentración mínima inhibitoria fue necesario preparar medio líquido (caldo de soya tripticaseína) adicionado con la molécula terpénica, esto a partir de la solución madre. Se prepararon tubos a concentraciones de 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm, para lo cual se utilizó la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$, determinándose la cantidad de solución madre que se debe de añadir para completar 10 ml con caldo de soya tripticaseína.

Elaboración de solución bacteriológica: La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó en base a la técnica descrita por Burt (2004). Se utilizaron seis cepas bacterianas, tres Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes ATCC 19114*) y tres Gram-negativas (*Salmonella enteritidis* Tiphymoruum, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa*), proporcionadas por el cepario de la Facultad de Ciencias Químicas. Se inoculó cada microorganismo por el método de estría, y después se incubaron a 24°C durante 24 horas. Una vez obtenidas las colonias aisladas, se tomó una muestra de ellas con el asa de nicromio, suspendiéndola en 9 ml de solución reguladora de fosfatos. La suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^8 UFC/mL para lograr una turbidez ópticamente comparable al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland; para obtener la



concentración de las muestras en las que se presentó crecimiento bacteriano, a esto se le denominará concentración mínima inhibitoria (CMI), también se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) donde no se presentó crecimiento bacteriano. (Burt S. , 2004)

Determinación antibacteriana de los aceites esenciales y moléculas en micro

placa: Se estableció como la CMI a la concentración más baja de las moléculas terpénicas (carvacrol y eugenol) y aceites esenciales, se realizó la preparación de las moléculas y AE a diferentes concentraciones, comenzando con 50, 100 250, 500, 750 y 1000 ppm hasta que se llegó a la inhibición del crecimiento de las cepas, Para la determinación de la CMI y CMB, se prepararon las concentraciones de cada una de las moléculas y AE partiendo de una solución madre de 20,000 ppm en tubos de ensaye estériles con 5 ml de caldo de soya tripticaseína. Con ayuda de la micropipeta y de puntillas estériles se adicionaron 180µl de cada concentración en los pocillos de la placa ya estéril, Posteriormente se adicionaron 20µl de solución bacteriana ajustada a una densidad óptica de 0.1 previamente realizada a cada pocillo con molécula. Realizándolo por triplicado.

Los controles fueron colocados en la parte inferior derecha de la microplaca como se ilustra en la figura 5, se consideró controles positivos aquellos a los cuales solo se les adicionó la solución bacteriana y caldo de soya tripticaseína, por el contrario, a los controles negativos únicamente se les adicionó caldo con la concentración de aceites esenciales y moléculas más alta. Se estableció como la Concentración Mínima Inhibitoria a la última concentración con turbidez y a la Concentración Mínima Bactericida (CMB) a la concentración mínima que fue necesaria para matar a la bacteria. Se incubo por 24 h a 37°C. Después de haberse cumplido las 24 horas, a cada pocillo se le agregó 50 µl de rezarsurina indicador de determinación CMI, y se observó resultados después de dos horas aproximadamente como se muestra en la figura 6.

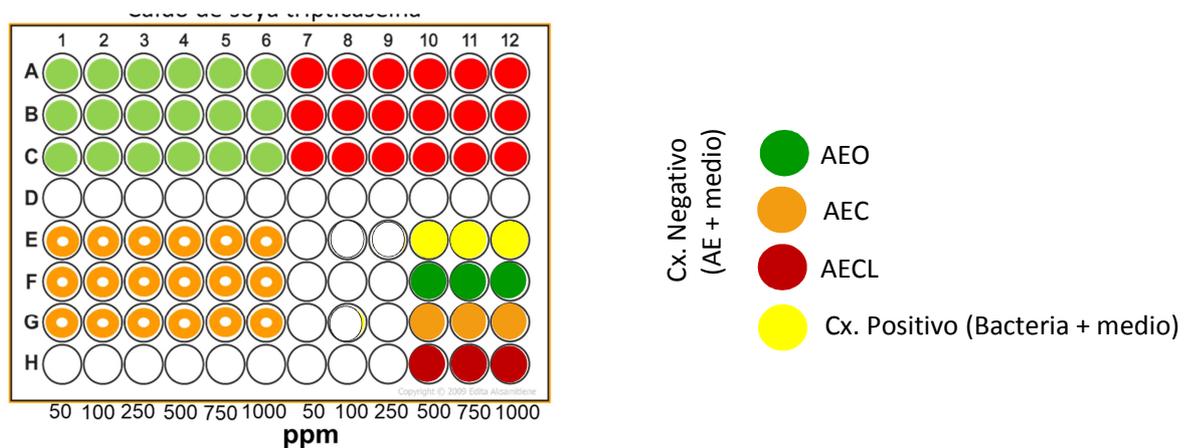


Figura 5. Determinación de CMI y CMB en microplaca



Figura 6. Determinación de CMI y CMB en microplaca con indicador de rezasurina

6.6. Dosis de letalidad

Tiene como base el principio fundamental de "toxicidad" que es la consecuencia que produce un compuesto a altas dosis, una sustancia puede tener un efecto fisiológico positivo o negativo dependiente de la cantidad de esa sustancia. La manera de expresar esa sensibilidad o efecto fisiológico es la Dosis Letal 50 (DL₅₀) es en partes por millón o miligramos por kilogramo, algunos autores la nombrar dosis letal media, en donde cierta concentración puede causar la muerte del 50% de los individuos que son sometidos a esa sustancia, la metodología sugiere que tiene que haber por lo menos 10 ejemplares (animales) en el experimento.

Para el desarrollo de la metodología se adquirieron quistes de *Artemia salina* en una casa de criada de peces y se pesaron exactamente 2.00 gramos y se colocaron en una cámara de eclosión durante dos horas, se esperó a que los huevos se hidraten y



seguido a esto se sometió a un flujo de aire constante todo con una bomba de circulación de agua a temperatura ambiente.

Eclosión de la *Artemia Salina*: La cámara de eclosión consta de un vaso de precipitado de 1000 mililitros cubierto con un recipiente de vidrio polarizado para evitar el contacto con la luz solar, se preparó una solución al 3% de cloruro de sodio comercial libre de yodo.

Después de 48 horas se procedió a recolectar los nauplios con ayuda de una fuente de luz intensa y una pipeta pasteur debido a que son fotosensibles y tienden a ir hacia la luz, finalmente se alimentó con 10 pellets de levadura fleischman.

Experimentación con la *Artemia Salina*: El bioensayo se realizó con tres repeticiones para cada uno de los aceites esenciales (orégano figura 7, comino y clavo), se enumeraron tubos del 1 al 11 con diluciones del extracto en concentraciones expresadas en ppm de 1000 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.9, 1.95 y 0.97. Para el blanco se utilizó una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 3%, las soluciones se vaciaron en viales de 3 mL. En cada vial se le colocaron 10 nauplios de artemia salina, se alimentó con pellets de levadura fleischman y se mantuvo una temperatura entre los 27 y 29°C por un lapso de 24 horas. Trascurrido ese tiempo, se contabilizaron los nauplios sobrevivientes y muertos con ayuda de una lupa de cada uno de los tratamientos (extractos), de cada dilución y de cada repetición; se terminó la DL $\square\square$ por el método de análisis de probit (para estimar el número de unidades que se puede esperar que fallen en respuesta a un estímulo) y mediante cálculos matemáticos se estimó la DL $\square\square$.



Figura 7. Viales con solución de aceite esencial de orégano y *Artemia salina*



6.7. Incorporación de aceites esenciales en carne de res

Preparación de la matriz alimentaria: Se adquirieron 1800 gramos de carne de res de pulpa negra, con proveedores de carne locales de la región Visa Del Norte, los cuales fueron procesados en molino de carne, marca Thomas Wiley Fisher, modelo 3383-L19, EUA del Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas

Aplicación de los aceites esenciales en la carne de res: Se pesaron 300 gramos de carne molida de res, los cuales se mezclaron con una solución de alcohol absoluto de aceite esencial de acuerdo a los resultados de la concentración mínima inhibitoria, los cuales serán introducidos en un homogenizador peristáltico (Bag Mixer InterscienceR CC) durante 2 minutos en la velocidad 3 en bolsas estériles con filtro (Blender Bag Fisher Scientific) para obtener una muestra homogénea, después se distribuyeron en 30 cajas Petri estériles que contenían 10 g con cada uno de los tratamientos de aceites esenciales y las moléculas Carvacrol y Eugenol, que fueron etiquetadas para su identificación con el tipo de tratamiento y la fecha de inicio de la evaluación. Las cajas se evaluaron los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15. Se utilizó como control una muestra de carne sin tratamiento para asegurar crecimiento de bacterias en la carne. (NOM110, 1994)

Para realizar la preparación de las muestras cárnicas para su análisis y poder llevar a cabo el conteo total de unidades formadoras de colonias con base en la NOM 110, la metodología desarrollada consistió en adicionar un volumen de 90 mL de buffer de fosfatos previamente esterilizado a 10 gr de carne, los cuales fueron introducidos en un homogenizador peristáltico (Bag Mixer InterscienceR CC) durante 2 minutos en la velocidad 2, en bolsas estériles con filtro (Blender Bag Fisher Scientific) para obtener una muestra sin partículas. Posteriormente se realizaron 6 diluciones en tubos de ensaye (por triplicado), tomando un mililitro del filtro de la bolsa con una micropipeta estéril. Se transfirió 1 mL de cada una de las diluciones a placas y se agregó agar cuenta estándar previamente esterilizado, se homogenizó la muestra y se incubó a 37°C por 48 h. En los días transcurridos se analizó la disminución de ciclos logarítmicos (UFC/g) de microorganismos mesófilos incubados, de acuerdo a lo



señalado en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

6.8. Determinación de lípidos de la carne de res conservada con aceites esenciales

Extracción de lípidos de la carne de res conservada con aceites esenciales:

Para la determinación de lípidos en la carne que fue conservada con aceites esenciales se siguió la metodología establecida en la Norma Mexicana -F-545-1992. (NMX-F-545-1992., 1992). Se pesaron 3 g de muestra preparada, se transfirió la mezcla a un cartucho de extracción para el equipo soxhlet, al que previamente se le colocó una pequeña cama de algodón y se cubrió con algodón, se hizo circular por el refrigerante una corriente de agua y se añadió por su extremo superior el disolvente en cantidad suficiente para tener de 2-3 descargas del extractor. Se encendieron las parrillas de calentamiento hasta 100°C y hasta que se obtuvo un goteo de 2 gotas por segundo. El proceso de extracción duró 4 horas. Se suspendió el calentamiento y terminada la extracción, se rotoevaporó a baja temperatura el disolvente del matraz; se pesó de nuevo el matraz con el contenido de lípidos obtenido y se utilizó la siguiente fórmula para estimar el porcentaje de grasa:

$$\% \text{ de grasa} = \text{PG} - \text{PV} \times 100 \text{ PM}$$

En donde:

PG = Peso del matraz con grasa seca, en gramos (g)

PV = Peso del matraz con cuerpos a peso constante, en gramos (g).

PM = Peso de la muestra en gramos (g).

6.7. Extracción de proteínas de la carne de res conservada con aceites esenciales

Preparación de la muestra: Se colocó un trozo del tejido (carne) en el mortero sobre hielo, se agregó 200 µL de buffer RIPA (Buffer RIPA: Tris-HCl pH 7.5 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; NP-40 1%), se homogenizó con el vástago para separar y mezclar bien con el tejido, después de esto se centrifugó 30 minutos a 4000 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C y se colocó el sobrenadante en un eppendorf y se conservó en congelación hasta su uso.

**Preparación de la solución concentrada de albúmina de suero bovina (BSA)**

2mg/ml: se pesó 2 mg de BSA y se disolvió con se disolvieron en 1 ml de agua destilada, mezclando la solución. Terminando esto, se realizó una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de BSA (tabla 4), las soluciones se prepararon con concentración de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.2 ml, a partir de BSA y se adicionaron los reactivos de Lowry (c) y Folin y aforo con agua destilada, llevándolas a un volumen final 6.5 mL

Determinación de proteínas por método Lowry: Para la determinación de proteínas por el método Lowry se consideraron tres concentraciones y tres repeticiones de cada una y se colocó 1 g de la muestra adecuadamente diluida en tubos de ensaye perfectamente etiquetados, se adicionó tomando el tiempo, 3 mL del reactivo C preparado recientemente (50 mL de A y 2mL de B). Después de 10 min se adicionó a la mezcla 0.3 mL del reactivo D (1 parte de reactivo de Folin-Ciocalteu con 1 parte de agua), agitando vigorosamente. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 min. Y para la determinación en espectrofotómetro se utilizó la absorbancia del color azul producido a 750 nm contra un blanco que fue preparado de la misma manera con 1 mL de agua en vez de la solución problema. La concentración de proteína se calculó a partir de una curva patrón preparada con albúmina bovina sérica en concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ considerando 5 puntos mínimo, que fueron tratadas de la misma manera con los reactivos. (Lowry, Rosebrough, & Farr, 1951)

Tabla 4 Condiciones para la determinación de proteínas por método Lowry

Tubo	Agua mL	Patrón mL	Problema	Rectivo C mL	Folin Diluido mL	Absorbancia nm
0	1.0	--	--	5	0.5	
1	0.9	0.1	--	5	0.5	
2	0.8	0.2	--	5	0.5	
3	0.7	0.3	--	5	0.5	580
4	0.6	0.4	--	5	0.5	
5	0.7	--	0.3	5	0.5	
6	0.5	--	0.5	5	0.5	



6.8. Peroxidación de la carne conservada con aceites esenciales

Se pesaron aproximadamente 2 g de muestra de carne de res conservada con aceites esenciales y moléculas y se pasaron a un matraz en un Erlenmeyer, se añadió 10 mL de cloroformo y se agitó para disolver la grasa, se añadió 15 mL de ácido acético glacial (para proporcionar un medio ácido) y se agitó la mezcla. Posteriormente se añadió 1 mL de la disolución de yoduro potásico. Se agito la mezcla por un 1 minuto y se dejó en reposo en obscuridad durante 5 minutos, se agregaron 75 mL de agua destilada, y se tituló la mezcla con tiosulfato sódico. Antes de la valoración el color de la mezcla era amarillento. Para observar bien el cambio, se añadieron 2 mL de almidón. Se realizó un ensayo en blanco (adicionando todos los reactivos excepto la muestra)

$$\text{Valor del peróxido} = (V - V_0) T / M \times 10^3 \text{ mEq/kg}$$

Donde:

V = Tiosulfato gastado con la muestra

V₀ = Tiosulfato gastado con el blanco.

T = Molaridad

M = Gramos de muestra (mL)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se describen los resultados obtenidos de las metodologías utilizadas para cumplir con los objetivos de la presente investigación, están presentadas de acuerdo con el orden de elaboración.

7.1. Extracción de los aceites esenciales:

Se realizó la extracción de los materiales vegetales seleccionados (orégano, comino y clavo) y el total de extracciones dependió del rendimiento de cada uno, como ejemplo el rendimiento del comino fue muy poco en comparación con el rendimiento obtenido de la planta de clavo, esto se debe a las características propias de cada planta. Estas características están plasmadas en la siguiente tabla número 5.

Tabla 5. Condiciones y rendimiento de la extracción de aceites esenciales.

CONDICIONES	Orégano (<i>Lippia berlandieri schauer</i>)	Comino (<i>Cuminum cyminum</i>)	Clavo (<i>Eugenia caryophyllata</i>)
Cantidad de materia vegetal	500 g	500 g	500 g
Cantidad de agua destilada	5 L	5 L	5 L
Temperatura	100 °C	100 °C	100 °C
Tiempo de extracción	6 h	6 h	6 h
Rendimiento	10 mL	5-8 mL	18 mL
Total aceite extraído	120 mL	122.7 mL	120 mL
Total de extracciones	12 extracciones	18 extracciones	7 extracciones
Color	Amarillo/naranja	Amarillo claro	Amarillo intenso
Rendimiento	2%	1.3%	3.6%
Densidad	1.39 g/cm ³	0.95 g/cm ³	2.69 g/cm ³
Imagen			



Como se observa en la tabla 5 el rendimiento de cada planta fue diferente, el clavo obtuvo mayor rendimiento de las tres, de cada extracción se podía obtener 18 mL, su rendimiento fue de 3.6%, sin embargo, el resultado fue menor a lo que se reportó en el II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. (Sánchez, 2006) él cual expreso que tuvo un rendimiento de 8.5% para el aceite esencial de clavo.

Para el aceite esencial de orégano se obtuvieron 10 mL en promedio de una extracción y el rendimiento es de 2%, cifra ligeramente superior a lo reportado por Ventura (2017), quien obtuvo un rendimiento de 1.96% por el método de hidrodestilación, la diferencia puede deberse a que el orégano que se colecto es de origen silvestre y no de orégano cultivado con el utilizado en este estudio. (Ventura Grández, 2017). Este rendimiento obtenido en el rendimiento del AE de orégano de es muy próximo al que indica la World Health Organization (WHO, 2010), sin embargo, los resultados que se lograron fueron menores a los que publicó Bouchra, Achouri, Hassani y Hmamouchi, (2003), quienes tuvieron un rendimiento de 5.4%, y refieren que esto depende del tiempo en que es recolectada la planta y por supuesto depende se la composición de la misma.

El aceite esencial de comino tuvo un rendimiento menor a los tres aceites, de cada extracción se obtuvo un promedio de 6.81 mL y un rendimiento de 1.3% este resultado fue menor al que se publicó en 2008, por Sowbhagya, Sathyendra, Rao y Krishnamurthy, quienes mencionaron haber contenido un rendimiento de 3.4% con el mismo método de extracción, estas diferencias para los tres aceites pueden deberse a las condicione en las que los materiales vegetales son cultivados, tipos de suelo, condiciones climáticas, riegos, manejos post cosecha, etc.

El comino utilizado mostró un menor rendimiento (1.52%) en comparación con el rendimiento publicado por Sedlakiva (2008) de 3.4% a pesar de haber utilizado el mismo método de extracción. Este resultado puede deberse a las diferentes condiciones que presentaron ambas plantas, como lo son las condiciones geográficas, climatológicas, entre otras (Sedlakova y col., 2003).

7.2. Caracterización de los aceites esenciales

Para la identificación de los componentes de los aceites esenciales se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, con el fin de caracterizar las moléculas mayoritarias las cuales se les atribuyen propiedades antimicrobianas como carvacrol para el AE de orégano, timol para el AE de comino y eugenol para el AE de clavo

Se realizaron corridas por un tiempo de 18 minutos en promedio para que los compuestos terpénicos buscados pudieran reflejarse en los cromatogramas. A continuación, se muestran en las figuras 8, 9 y 10, resultados de la caracterización de los aceites esenciales.

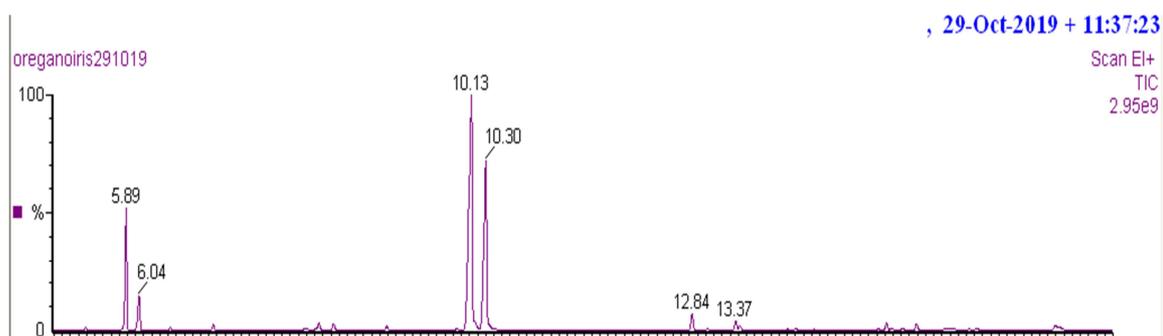


Figura 8. Caracterización de compuestos mayoritarios del aceite esencial de orégano

Tabla 6. Componentes del aceite esencial de orégano

Número	Nombre del compuesto	tr* (min)
1	Fenol	5.89
2	Eucaliptol	6.04
3	Linaliol Isobutirato	6.92
4	Geraniol Tyglate	7.93
5	Borneol	8:06
6	Carvacrol	10.13
7	Timol	10.30
8	Cariofileno	12.84

*tr tiempo de retención

En la tabla 6 Se pueden ver los resultados obtenidos de la caracterización del AE de orégano donde los picos mayoritarios corresponden al tiempo de retención (tr) del minuto 10:13 dónde se puede ver la molécula de carvacrol y en el tr del minuto 10:30 se logra identificar al pico correspondiente a timol, estos compuestos fueron identificados mediante la comparación de los picos mayoritarios y los tiempos de retención de la base de datos de la librería NIST versión 2.0, sin embargo en una publicación que hablaba de la caracterización del AE de orégano, con una corrida en un equipo similar se obtuvieron las dos moléculas mayoritarias en los tr de 26:02 para timol y 26:58 para carvacrol, identificándose esas dos moléculas con los picos más altos en los cromatogramas, además del terpineol que obtuvo el mayor porcentaje clasificados por orden de elución. (Tellez Monzón & Nolazco Cama, 2017)

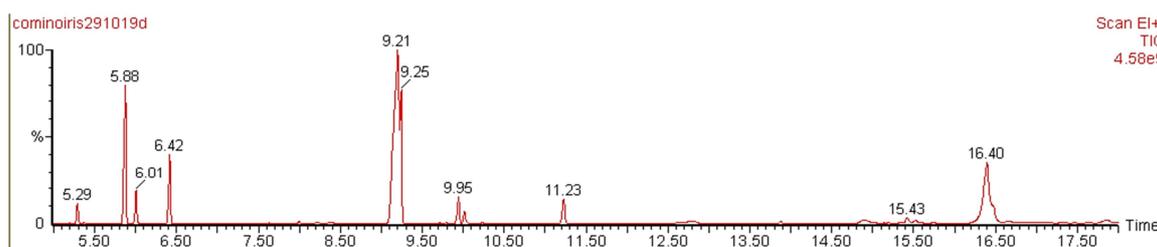


Figura 9. Caracterización: Compuestos del aceite esencial de comino

Tabla 7. Componentes mayoritarios del aceite esencial de comino

Número	Nombre del compuesto	tr* (min)
1	3-Carene	5.29
2	Fenol	5.88
3	D-Limoneno	6.01
4	3-Carene	6.42
5	Cumaldehído	9.21
6	γ -terpineno	9.25
7	β -pineno)	9.95
8	Eugenol	11.23

*tr Tiempos de retención

En el cromatograma (Figura 9) se muestran los picos más representativos del aceite esencial del comino, siendo los componentes mayoritarios el cuminaldehído (9.21 min), γ -terpineno (9:25 min). Los picos presentados en este cromatograma no coinciden con los picos reportados por López y colaboradores (2009), sin embargo, si se identificaron los compuestos mayoritarios en ambos (tabla 7). Esto se puede deber a las condiciones operatorias diferentes utilizadas para identificar los compuestos presentes en los aceites analizados. (López P., 2009)

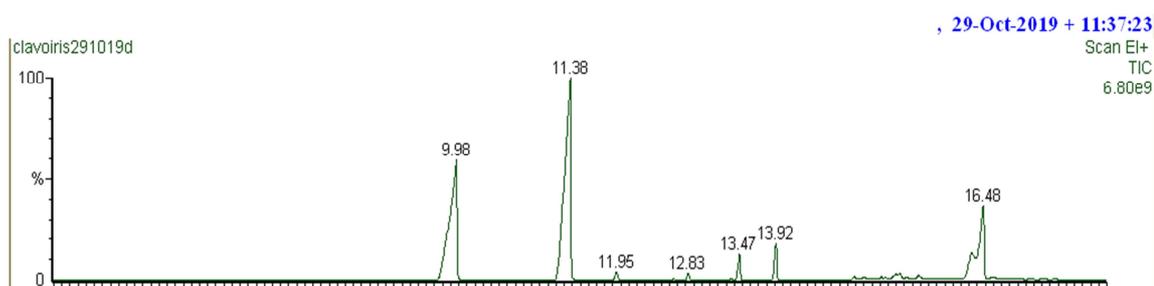


Figura 10. Caracterización: Compuestos del aceite esencial de clavo

Tabla 8. Componentes del aceite esencial de clavo

Número	Nombre del compuesto	tr* (min)
1	Cariofileno	9.98
2	Eugenol	11.38
3	Cariofileno	11.95
4	Cariofileno	12.83
5	Fenol, 2-metoxo-3(2-propeniol)	13.47
6	Fenol, 2-metoxo-3(2-propeniol)	13.92

*tr Tiempos de retención

En el cromatograma de la figura 10, donde se aprecian los resultados correspondientes a la caracterización del AE de clavo, se pueden apreciar los picos mayoritarios en los tiempos de retención del minuto 9:98 y en el 11:38, la tabla 8, menciona que esos picos están relacionados con cariofileno y con eugenol, aunque lo que reportaron López y colaboradores en 2009 coincide con las moléculas mayoritarias del AE de clavo, no es así para los tiempos de retención ya que ellos obtuvieron resultados con tr más avanzados en las corridas. (López P., 2009)



La literatura refiere que estas moléculas como el eugenol, presenta actividad antimicrobiana contra algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas. (Chaieb, y otros, 2007)

7.3. Evaluación de las propiedades antibacteriana de los aceites esenciales

Para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y sus moléculas se realizaron pruebas microbiológicas que permitan la definir la concentración a la cual los aceites actúan contra las bacterias, se definió como:

- Concentración mínima inhibitoria (CMI) la concentración más baja del aceite y de las moléculas, expresada en partes por millón (ppm) en la cual inhibió el crecimiento del organismo.
- Concentración mínima bactericida (CMB) a la concentración mínima que fue necesaria para matar a la bacteria. Para la realización de este paso fueron necesarios los resultados de la CMI de aceites esenciales y sus moléculas mayoritarias.

Después de realizar la metodología descrita con anterioridad, se trabajó con las siguientes concentraciones 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm y se observaron los resultados que a continuación se muestran en la tabla 9:

**Tabla 9. Determinación de la CMI y CMB de los extractos de aceites esenciales en seis cepas bacterianas**

BACTERIA	*AEC ppm		**AEO ppm		***AECL ppm	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Pseudomona spp</i>	No inhibió		750	1000	750	1000
<i>Bacillus cereus</i>	1000		100	250	500	750
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	No inhibió		250	500	750	1000
<i>Staphylococcus aureus</i>	No inhibió		500	750	1000	
<i>Salmonella typhimurium</i>	No inhibió		250	500	1000	
<i>Listeria monocytogenes</i>	No inhibió		500	750	750	1000

*AEC Aceite esencial de comino, **AEO Aceite esencial de orégano, ***AECL Aceite esencial de clavo, ppm partes por millón.

CMI Concentración Mínima Inhibitoria

CMB Concentración Mínima Bactericida

Se puede observar que el aceite con menos actividad antimicrobiana fue el aceite esencial de comino, solo logró inhibir el crecimiento de la bacteria *Bacillus cereus* a 1000 ppm; el aceite esencial de orégano tuvo mayor actividad antibacteriana que el AEC, por ejemplo se logró la inhibición para *Pseudomona spp*, a 750 ppm y a 1000 ppm tuvo resultados bactericidas; para *Bacillus cereus* se logró una inhibición a 100 partes por millón y bactericida a 250 ppm, para *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella thiphymorium* la inhibición bacteriológica fue de 250 ppm y mostro actividad bactericida a 500 ppm, en el caso de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, tuvo resultados de inhibición del crecimiento bacteriano a 500 ppm y bactericida a 750 ppm.

Bastos Oyarzabal y col. (2011) evaluaron las diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano en distintas bacterias, que fueron aisladas de leche y encontraron que la CMB puede variar dependiendo del tipo de microorganismos, mencionaron por ejemplo, que para *Staphylococcus coagulasa* se necesita al menos una concentración del 2% del AEO para hacer efecto contra la bacteria, sin embargo,



los resultados obtenidos en la presente investigación se necesitó solo 0.75% para lograr el mismo efecto en bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, los resultados de la inhibición de las bacterias concuerdan con los resultados obtenidos y puede comprobarse que el AEO es efectivo contra estas cepas bacterianas.

El AECL tuvo actividad antimicrobiana a 500 ppm para *Bacillus cereus*, para *Pseudomona spp*, el AECL tuvo actividad de inhibición bacteriológica a 750 ppm y bactericida a 1000 ppm, con los mismos resultados para *Listeria monocytogenes*, y *Escherichia coli* O157:H7, sin embargo para *Staphylococcus aureus* y *Salmonella thiphymorium*, mostraron actividad de inhibición a 1000 ppm, no se pudo determinar la concentración mínima bactericida ya que solo se trabajó a 1000 ppm. Aunque logro tener actividad inhibitoria no se logró demostrar actividad bactericida para todas las bacterias, algunos autores como (Hammer K., 1999) refirió que el AECL tiene actividad antimicrobiana para *L. monocytogenes*, lo que coincide con la respuesta obtenida en estos experimentos; para *S aureus* (Celikel N., 2008) también reporto que el AEC no tiene propiedades antimicrobianas contra esta bacteria, además de esto algunas investigaciones refieren que el AEO tienen propiedades para combatir algunos microorganismos, así lo reporto Burt (2003) para bacterias como *E. coli* y *Salmonella Tiphymorium*; estos resultados tienen concomitancia en la inhibición bacteriológica de las cepas con las cuales se provo su efectividad, sin embargo la variación en las concentraciones depende del origen de la materia vegetal, la manera en que se extrae el aceite esencial, así como los distintos métodos microbiológicos que se emplean en cada uno de los artículos.

7.4. Determinación antibacteriana de moléculas terpénicas de aceites esenciales en micro placa

Debido a la poca actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino, se decidió omitir a las moléculas de ese aceite esencial y por cuestiones de conveniencia al presente trabajo de investigación se optó por probar dos moléculas correspondientes al aceite esencial de clavo, eugenol y la molécula de carvacrol contenida en el aceite esencial de orégano.



En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para las moléculas de Eugenol y Carvacrol probadas con las mismas seis cepas bacterianas utilizadas en los aceites esenciales y a las mismas concentraciones.

Tabla 10. Determinación de la CMI y CMB de las moléculas principales aceites esenciales de orégano y clavo en seis cepas bacterianas.

BACTERIA	CARVACROL ppm		EUGENOL ppm	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Pseudomona spp</i>	250	500	700	1000
<i>Bacillus cereus</i>	100	250	500	750
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	250	500	500	750
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	750	No inhibió	
<i>Salmonella typhimurium</i>	250	500	750	1000
<i>Listeria monocytogenes</i>	250	500	750	1000

ppm: partes por millón

CMI Concentración Mínima Inhibitoria

CMB Concentración Mínima Bactericida

Los efectos obtenidos para las moléculas de eugenol y carvacrol fueron probadas con las mismas cepas, mostraron resultados muy similares a los aceites esenciales de orégano y clavo, la molécula del AEO es el carvacrol y demostró actividad de inhibición bacteriológica al igual que el aceite, a 100 ppm la molécula mostró inhibición y actividad bactericida a 250 ppm para la bacteria *Bacillus cereus* y para las bacterias de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*, los resultados fueron iguales, la concentración mínima inhibitoria fue de 250 ppm y 500 ppm para la concentración mínima bactericida, sin embargo para *Staphylococcus aureus* las concentraciones fueron un poco mayores, 500 ppm para lograr inhibir el crecimiento bacteriano y a 750 ppm para que la concentración bactericida.

En un comparativo entre moléculas y aceites esenciales, los resultados de la inhibición del crecimiento bacteriano y la concentración mínima bactericida para las bacterias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, fueron las mismas, pero para las bacterias *Pseudomona spp* y *Listeria monocytogenes* las concentraciones mínima inhibitoria y bactericida fueron distintas, demostrando que con la molécula de carvacrol se necesita solo 250



ppm y 500 ppm respectivamente, no siendo así para el aceite esencial de orégano el cual necesito mayor concentración para para alcanzar dichas concentraciones.

Para el Eugenol, los resultados fueron muy similares a los obtenidos con el aceite esencial de clavo, para *Bacillus cereus*, y *E. coli*, se necesitan al menos 500 ppm para tener una inhibición del crecimiento bacteriano y 750 ppm para tener efectos bactericidas, sin embargo para las bacterias *Pseudomona spp*, *Salmonella typhimorium* y *Listeria monocytogenes* se necesitan 750 ppm en una concentración mínima inhibitoria y 1000 ppm para lograr una concentración mínima bactericida, por otro lado el eugenol, no logro inhibir a *Staphylococcus aureus* en ninguna de las concentraciones probadas.

Una investigación realizada en el 2013 Apolonio, Faleiro y Nieto, mencionaba que el eugenol tenía actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* los valores la CMI se determinaron en un rango 100 a 150 ppm, sin embargo, los resultados que se obtuvieron en este trabajo de investigación, no lograron inhibir la bacteria a ninguna de las concentraciones que se trabajaron. (Apolonio, Faleiro, & Neto, 2014)

Otros estudios mencionan que algunos derivados fenólicos como el eugenol y el carvacrol que provienen de plantas como el clavo o el tomillo, o el orégano actúan contra bacterias como la *E. coli* o *Salmonella typhimurium*, desintegrando su membrana, también refieren que bacterias gram negativas son menos susceptibles y por ello el eugenol posee una adecuada actividad antibacterial y que es un efectivo bactericida contra *Listeria monocytogenes* en carne preparada y conservada en refrigeración. (Anticona & Valles, 2015).



7.5. Dosis de letalidad DL50

Para determinar la dosis de letalidad (DL50) o toxicidad de los aceites esenciales, se obtuvieron los siguientes resultados, descritos en la tabla 11:

Tabla 11. DL50 del AE de orégano

Aceite	Concentración	% de Mortalidad
Orégano	0.97	80.00
	1.95	86.67
	3.9	86.67
	7.81	90.00
	15.62	90.00
	31.25	96.67
	62.5	100.00
	125.5	100.00
	250	100.00
	500	100.00
	1000	100.00

Los resultados arrojan un alto porcentaje de toxicidad, en un estudio publicado en 2012 Soto y colaboradores, se muestra que las dosis de toxicidad van en los siguientes rangos: una DL50 de 0 – 5 mg/mL se considera altamente tóxica, el siguiente rango habla de una DL50 tóxica que va de 6- 20 mg/mL y el siguiente valor refiere que una DL50 de 200 a – 1000mg/mL se considera no tóxica. (Soto-Domínguez, García-Garza, Ramírez-Casas, Morán-Martínez, & Serrano-Gallardo, 2012)

Los valores que se obtuvieron para el AE de orégano hablan de una DL50 altamente tóxica. Este resultado no coincide con lo publicado por (González-Torres & Torres-Neira, 2016) quien menciona que el AE de orégano no está considerado como tóxico, ya que mostró una DL50 de 1.37 g/kg quien también menciona que la toxicidad de los aceites esenciales puede deberse al quimiotipo.



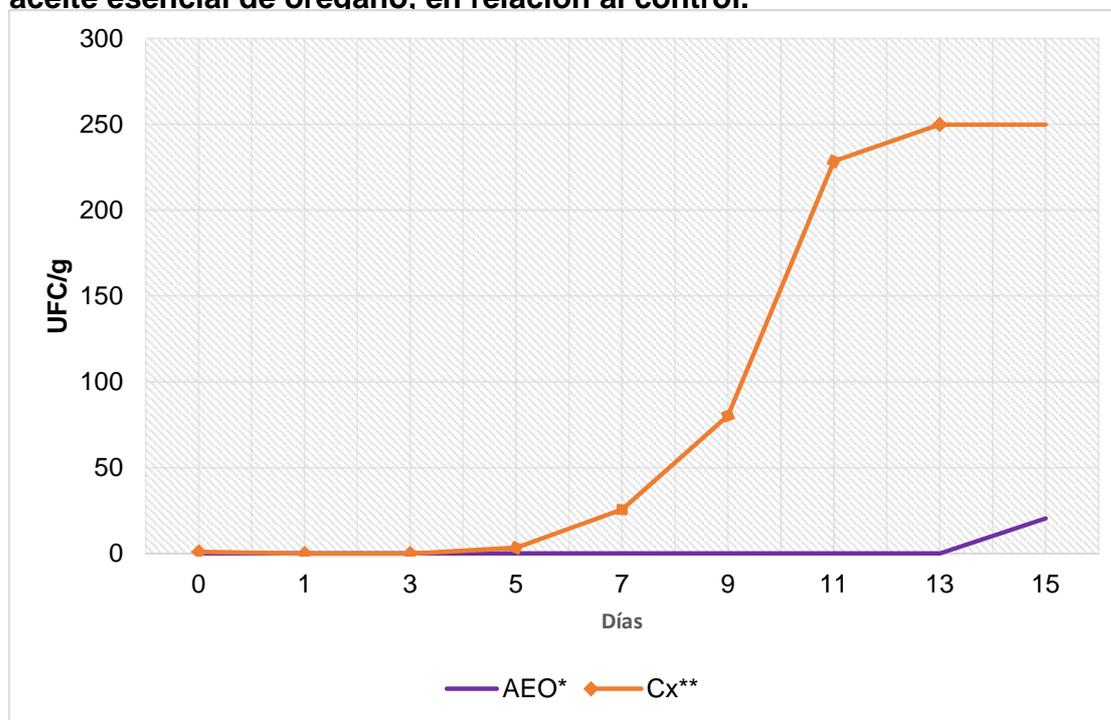
Tabla 12. DL50 del AE de comino

	Aceite Esencial	Concentración (µg/mL)	% de Mortalidad
Comino		0.97	84.00
		1.95	89.12
		3.9	93.74
		7.81	93.20
		15.62	96.33
		31.25	100.00
		62.5	100.00
		125.5	100.00
		250	100.00
		500	100.00
		1000	100.00
Clavo		0.97	88.89
		1.95	85.19
		3.9	100.00
		7.81	92.59
		15.62	100.00
		31.25	100.00
		62.5	100.00
		125.5	100.00
		250	100.00
		500	100.00
		1000	100.00

7.6. Conservación de la carne de res con aceites esenciales

En la conservación de la carne con aceites esenciales y moléculas, se utilizaron soluciones con 750 µL de aceite de orégano, clavo, eugenol y carvacrol, sin embargo, para el aceite de comino se utilizó una solución de 1000 µL del aceite, estas soluciones fueron mezcladas por separado con carne molida y conservada a 4°C hasta su evaluación. Las cantidades de aceite y moléculas utilizadas en las soluciones, se consideraron los resultados de las CMI y CMB obtenidas en los ensayos biológicos con las distintas cepas bacterianas. Las evaluaciones microbiológicas se realizaron los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15, por triplicado, además se utilizó un control de carne sin tratamiento también por triplicado. Los resultados de los promedios de las evaluaciones, se presentan en las siguientes figuras.

Figura 11. Curvas de crecimiento bacteriano en carne de res conservada con aceite esencial de orégano, en relación al control.



*AEO Aceite esencial de Orégano

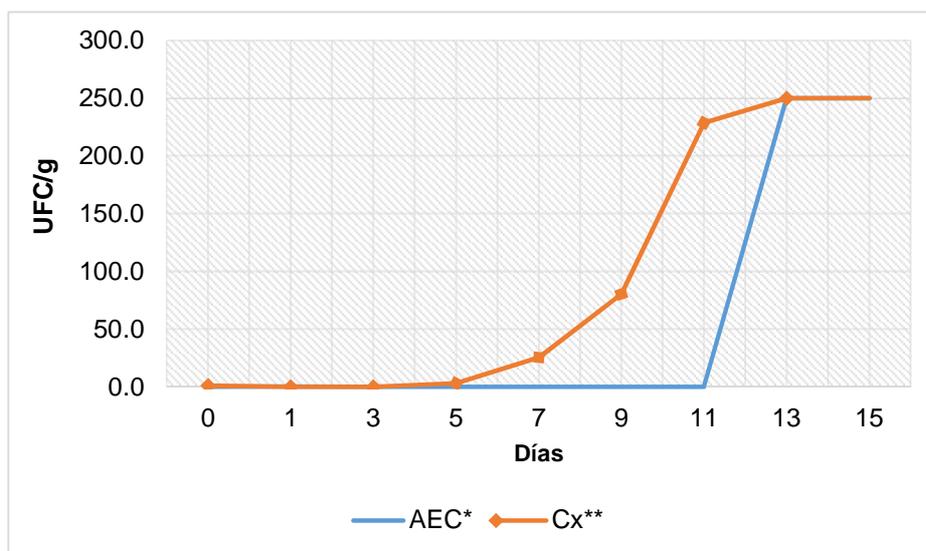
** Cx Control

En la figura 11 se puede apreciar la conservación de la carne de res que fue tratada con aceite esencial de orégano y mantiene el controlado el crecimiento bacteriano en la matriz alimentaria (carne molida), a partir del día 15 se observa un ligero crecimiento en la multiplicación de las bacterias, sin embargo al comparar el crecimiento de las bacterias en el control (carne molida sin tratamiento) puede valorarse que éste comienza a partir del día cinco, a pesar de que ambas muestras se conservaron en las mismas condiciones de temperatura.

Esto coincide con los resultados expresados en una investigación publicada en agosto del 2020 por Cantú y Valdez, que evaluaron el aceite esencial de orégano como alternativa de conservación en carne molida, quienes mencionaban que las variables de crecimiento aumentaban con el tiempo, en el día 7, también comentaban que los resultados pueden deberse a las propiedades de algunos aceites esenciales, por ejemplo el de orégano que tiene propiedades antioxidantes y antimicrobianas,

que actúan contra algunas bacterias patógenas que son transmitidas por alimentos como la carne. (Cantú-Valdéz, 2020)

Figura 12. Curvas de crecimiento en carne de res conservada con aceite esencial de comino, en relación al control.



*AEC Aceite esencial de Comino

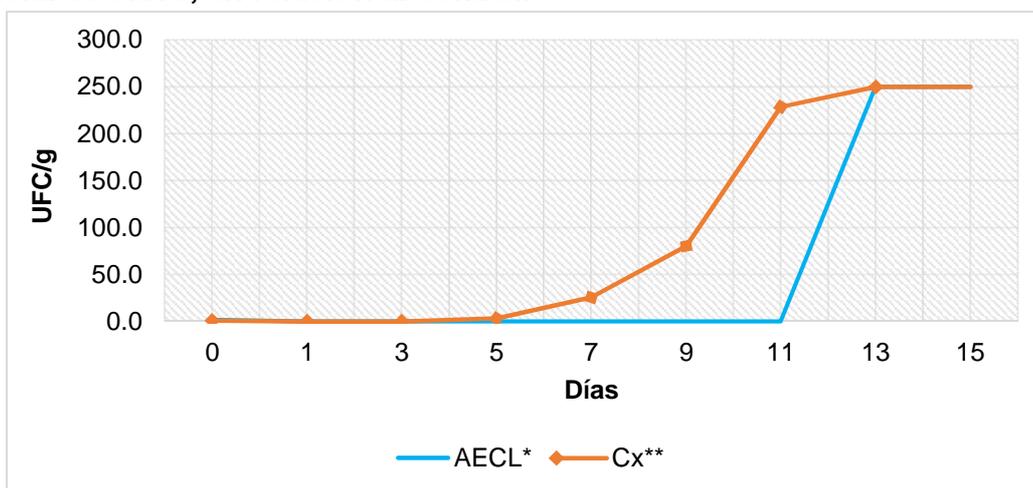
** Cx Control

La carne molida que fue tratada con aceite esencial de comino, presenta una conservación hasta el día 11, la figura 12 expresa que el crecimiento bacteriano, ascendió de manera exponencial a partir de ese día y para el día 13 y 15 mostraba unas cifras por arriba de 250 UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo, según lo refiere la NOM110 Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

En una investigación realizada en 2015 (Yucra-Ticono) donde se busco evaluar el aceite esencial de (*cuminum cyminum.*) en la vida útil de la carne fresca de res, determinando la actividad antimicrobiana para *Escherichia coli*, por medio de la técnica de halo de inhibición, tuvo resultados similares a los obtenidos en la presente investigación, Yucra-Ticono menciona que: “se comprueba que la carne de res tratada con aceite esencial de comino, presenta mayor tiempo de vida útil, con 16

días, respecto a los filetes sin el tratamiento con aceite esencial,. (Yucra-Ticona, 2015)

Figura 13. Curvas de crecimiento en carne de res conservada con aceite esencial de clavo, en relación al control.



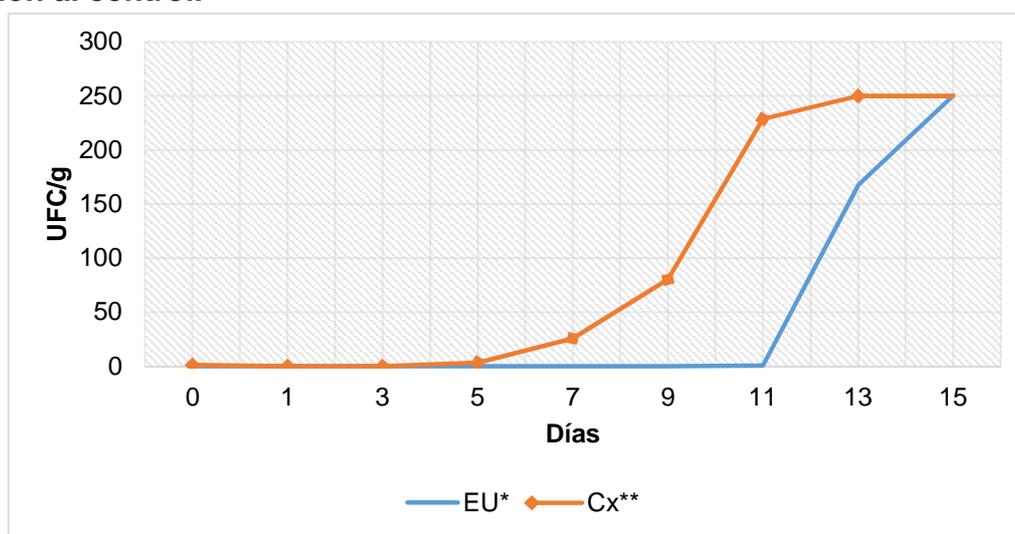
*AEC Aceite esencial de Clavo

** Cx Control

En la figura 13, expresa los resultados obtenidos en la conservación de carne molida con aceite esencial de clavo, en relación a la muestra de carne sin ningún tratamiento y al igual que el aceite esencial de comino, puede verse un aumento en el número de bacterias presentes en la muestra a partir del día 13 y 15, los datos tienen similitud con una investigación que se realizó en el 2019 por Vargas Vega, que buscó evaluar las propiedades microbiológicas del aceite esencial de canela y clavo de olor, en la conservación de carne molida de res, tipo hamburguesa e hizo una comparación con un control de una muestra con tratamiento de un conservante artificial, en dicha investigación se mencionó, que en las primeras 24 horas, la cantidad de coliformes totales había disminuido en las muestras tratadas con AE de clavo y se mantuvo así, los días posteriores, sin embargo la muestra control que había sido tratada con un conservante artificial, sólo logró mantenerse los días 1 y 2, pero los coliformes se incrementaron partir del tercer y cuarto día; también se menciona que, los conservadores artificiales deberían tener la capacidad de inhibir el

desarrollo de las bacterias, pero en este caso particular el contenido de microorganismos aumentó. (Vargas Vega, 2019)

Figura 14. Curvas de crecimiento en carne de res conservada con eugenol, en relación al control.



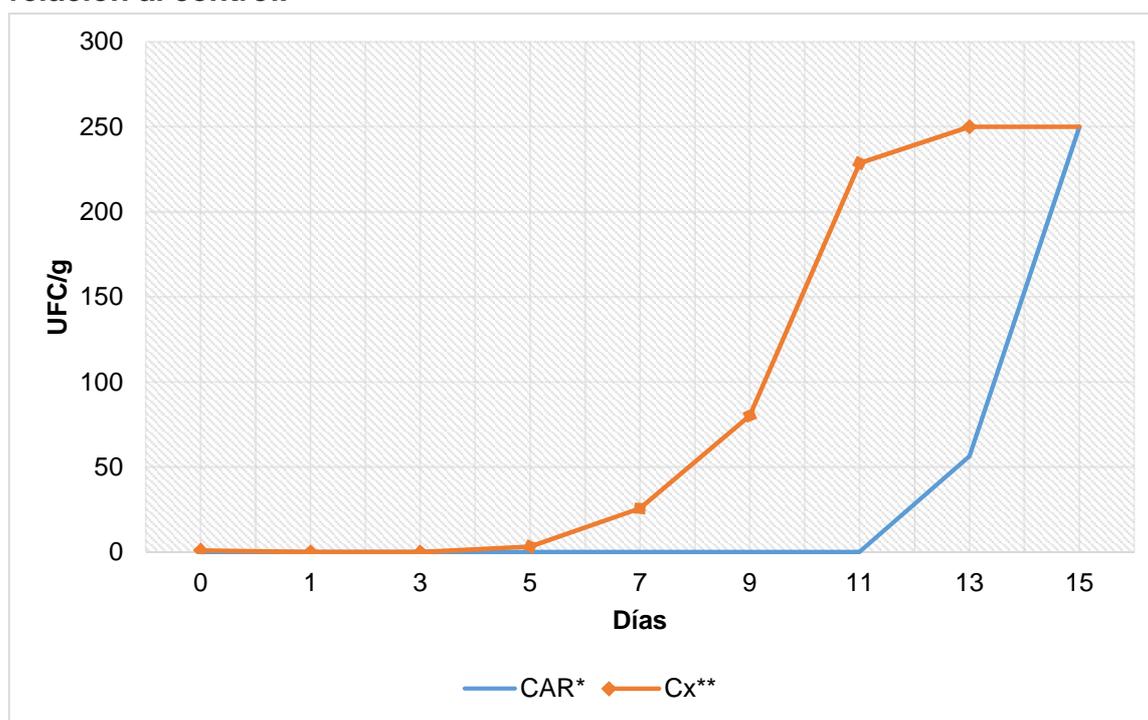
*Eugenol

**Cx Control

El tratamiento con eugenol en carne molida de res, tuvo resultados similares a los expresados en la figura 14, a partir del día 11 puede observarse un incremento en el número de bacterias que se encontraban presentes en las muestras de carne, aunque tuvo un aumento un poco más gradual que el aceite esencial de clavo, el eugenol que es la molécula mayoritaria del AE mencionado, al cual se le atribuyen propiedades antimicrobianas, en la figura 16 muestra que tiene una mejor conservación de la carne que el aceite. La literatura refiere que las propiedades antimicrobianas de algunos aceites esenciales se deben a los componentes de los mismos, algunos Terpenoides y compuestos fenólicos como el eugenol, el carvacrol o el timol, que presentan actividades antibacterianas y antioxidantes. Los resultados que se muestran en la figura 16 coinciden con que expresa Lizano Cruz (2013) que el comportamiento del control, presenta mayores crecimientos bacterianos en relación al tiempo de almacenamiento, sin embargo, as muestras con tratamiento de aceites esenciales tienen mejores resultados en la conservación de la matriz

alimentaria, ya que el crecimiento bacteriano se mantuvo en valores bajos. También menciona que en el día 0, los valores son similares en los tratamientos.

Figura 15. Curva de crecimiento en carne de res conservada con carvacrol, en relación al control.



*Carvacrol
 **Cx Control

La figura 15, menciona la reducción de ciclos logarítmicos en el tratamiento con carvacrol, molécula mayoritaria del aceite esencial de orégano y a diferencia de éste, la molécula conservo la carne molida por aproximadamente 11 días, a partir del día 13 el crecimiento bacteriano de la muestra aumentó, sin embargo, sus resultados se encuentran por debajo de lo establecidos en las normas oficiales mexicanas (NOM 034 SSA1- 1993 Bienes y servicios. Productos de la carne. Carne molida y carne molida moldeada. Envasadas. Especificaciones sanitarias) de productos de carne molida, moldeada que evalúan microorganismos como mesófilos aerobios, coliformes fecales, *Salmonella spp* en 25 g

Algunos autores, mencionan que las propiedades antibacteriales del AE de orégano se debe al contenido de fenoles en él, como el carvacrol y timol. (Lizano Cruz, 2013).



Burt (2004) menciona que el mecanismo de acción contra las bacterias es debido a una modificación de la membrana citoplasmática, ya que disminuye la fuerza motora de los protones, al flujo de electrones y a la coagulación del contenido celular.

Además de esto el carvacrol, demuestra actividad antimutagénica, que lo cual se considera estar unida a la disfunción mitocondrial. También coincide con los resultados que menciona Seaberg y colaboradores (2003) quienes compararon el efecto de utilizar AE de orégano y carvacrol a 800 ppm contra *Listeria monocytogenes* en unas muestras de carne de res en rodajas y demostraron una inhibición significativa mayor cuando se utilizó aceite esencial de orégano. Ellos refieren una explicación de que el AE de orégano es trabaja de manera más eficaz en la porción de lípidos y agua soluble de la carne que el carvacrol.

7.7. Determinación de lípidos de la carne de res conservada con aceites esenciales

Los resultados obtenidos en la cuantificación de los lípidos por el método Soxhlet que se obtuvo de la revisión de la Norma Mexicana -F-545-1992. (NMX-F-545-1992., 1992) y habiendo hecho los cálculos necesarios se obtuvo lo siguiente:

Tabla 13. Porcentaje de grasa contenida en la carne de res tratada con AE

DÍA	AEO	AEC	AECL	EU	CAR	Cx
3	4.22	4.89	6.47	4.17	5.19	4.50
5	5.70	5.69	5.54	5.23	9.40	5.23
7	5.30	5.16	5.32	5.35	4.59	4.53
11	8.50	5.83	5.63	7.26	4.93	5.96
13	8.25	-18.27	5.96	5.92	8.97	5.63
Promedio	6.39	0.66	5.78	5.59	6.62	5.17

En la tabla 13 se puede observar los el contenido de lípidos en la pulpa de res que fue tratada con aceites esenciales, el contenido de grasas no se modificó con respecto al tiempo, sin embargo el control (muestras de carne sin tratamiento) presentó una cantidad menor respecto a las muestras tratadas, los promedios del



contenido lipídico se mantuvo entre 5.59 y 6.62%, cifras ligeramente mayores a las repostadas por (Teira, Perlo, Bonato, & Tisocco, 2006) quien menciona que la cantidad de grasas en la carne magra oscila alrededor de 5% o menos, sin embargo, las cifras que se mencionan son mayores a lo que expresa este artículo, esto puede deberse a la adición de AE como métodos de conservación.

7.8. Peroxidación de la carne conservada con aceites esenciales

La composición de los lípidos puede modificarse por la conservación de la carne cuando se conserva en frío, los resultados obtenidos de la peroxidación de los lípidos se pueden ver en la siguiente tabla número 14.

Tabla 14. Peroxidación de la carne conservada con aceites esenciales

Días	1	VP	3	VP	6	VP	8	VP	10	VP
Vo	0.5		0.6		0.6		0.9		0.9	
VAEO	0.35	7.5	0.6	0	0.4	10	0.5	20	0.2	35
VAEC	0.5	0	0.3	15	0.2	20	0.2	35	0.3	30
VAECL	0.6	-5	0.8	-10	0.4	10	0.4	25	0.5	20
VEU	0.6	-5	0.6	0	0.4	10	0.4	25	0.3	30
VCAR	0.3	10	0.5	50	0.3	15	0.5	20	0.4	25
VCx	0.5	0	0.5	50	0.5	5	0.5	20	0.4	25

VP Valor del peróxido mEq/kg

- Menor que 10 miliequivalente/kilogramo = no hay rancidez
- Mayor que 10 miliequivalente/kilogramo = inicio periodo de inducción
- De 20 a 40 miliequivalente/kilogramo = rancidez notable

Según la definición operacional de valor de peroxidación se puede observar que conforme pasan los días el valor de peroxidación aumenta a partir del día 6, lo que indica una oxidación de los lípidos, Cervera (2011) menciona que esto es debido al riesgo de oxidaciones en los ácidos insaturados que desembocan en procesos de enranciamiento, después del sacrificio se inactivan algunos sistemas biológicos, sin embargo y como sucedió con estas muestras, se buscó por medio de la adición de AE retrasar la multiplicación de bacterias patógenas como las expresadas en el punto 7.6., la oxidación se convierte en la principal causa de deterioro de la carne

(Meléndez Abanto, 2014), a pesar de que las cifras se encuentran elevadas en el día seis, para la muestra control se puede observar un incremento elevado a partir del día 3, los AE y las moléculas pueden retrasar un par de días la oxidación en relación a las muestras sin carne.

7.1. *Determinación de proteínas por método Lowry de la carne de res conservada con aceites esenciales*

Para la determinación de proteínas de la carne de res que fue conservada con aceites esenciales, se utilizó el método Lowry y con los datos obtenidos después de realizar todos los pasos, se realizó una curva de calibración y se determinó la ecuación de corrección de datos, el coeficiente de correlación $R^2 = 0.9869$, esto indica una relación lineal entre la concentración y la absorbancia entre la muestra patrón o estándar de albúmina de suero bovino, sin embargo se puede observar en la figura 16 que las concentraciones de proteína de las muestras tratadas con aceites esenciales están por debajo de lo esperado a pesar de lo sensible del método, sin embargo, en relación al control, se puede observar que la concentración está por debajo de la muestra de referencia (BSA).

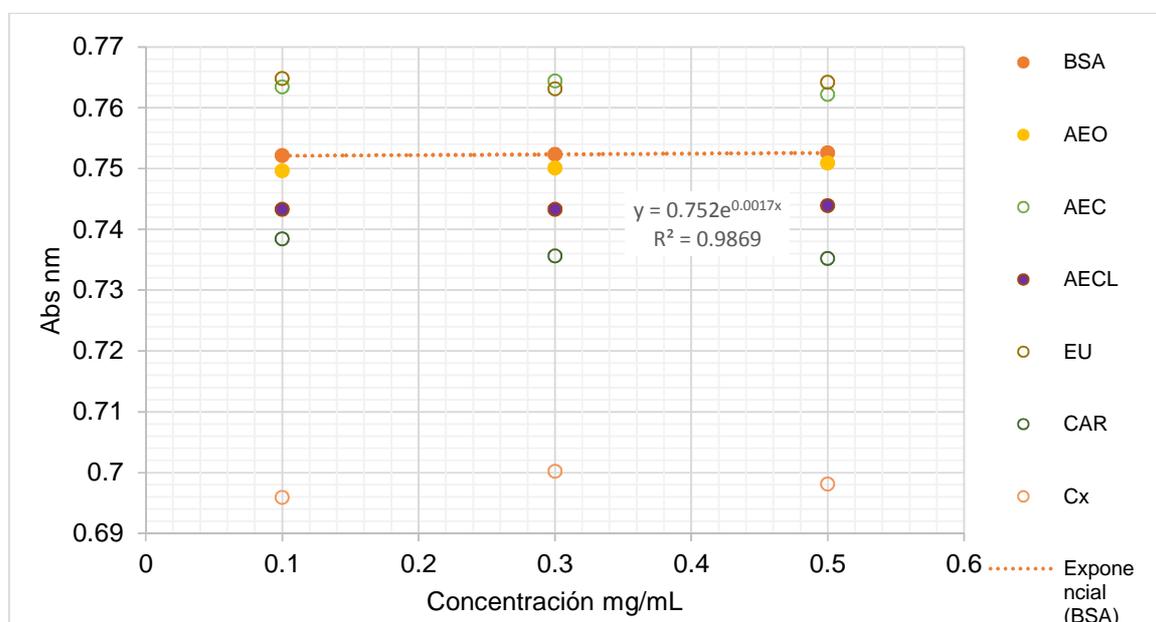


Figura 16. Concentración de proteínas por método Lowry en carne de res tratada con AE.



Algunos autores como Pateiro (2018) sugieren que, durante la distribución, almacenamiento y manipulación de los productos cárnicos, ocurren cambios fisicoquímicos y aromas que no son deseables y que tienen efectos sobre la calidad del alimento; la carne es vulnerable al deterioro bioquímico y microbiano, de manera particular durante el almacenamiento, debido a su compleja composición que consiste en varios tipos de lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas y pigmentos saturados e insaturados, también menciona que la oxidación de lípidos, proteínas y pigmentos es un suceso común en la carne que ocurre cuando tiene un almacenamiento convencional (en refrigeración como en este caso). En su revisión refiere que: “los cambios fisicoquímicos en proteínas y aminoácidos durante el proceso de oxidación, disminuyen su biodisponibilidad, digestibilidad, solubilidad y actividad proteolítica”. Este proceso de oxidación que comenta, puede afectar la apariencia de la carne ya que puede llegar a oxidar la mioglobina y producir algunos pigmentos marrones; estos cambios merman las características nutricionales y sensoriales. Pero se sugiere que el uso de los AE puede funcionar como agentes antioxidantes, en los alimentos, en particular en la carne y/o productos cárnicos para minimizar las pérdidas de calidad (Pateiro, y otros, 2018)



8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Después de haber hecho un análisis al incorporar aceites esenciales como aditivos alimentarios antimicrobianos, se puede observar que los aceites de orégano, comino y clavo y, las moléculas de eugenol y carvacrol tienen propiedades funcionales. La utilización de estos aceites en la carne de res, son una alternativa viable para la conservación del alimento. Los AE prolongaron la vida útil de la matriz alimentaria en un promedio de 8 días, retardando el crecimiento bacteriano. Respecto a la muestra de carne que no recibió tratamiento sólo se conservó un promedio de 5 días. El aceite esencial de clavo y las moléculas de eugenol y carvacrol mostraron mejores resultados al demorar el crecimiento de microorganismos en la carne hasta once días.

Se sugiere que los AE tienen efectos positivos sobre macronutrientes como lípidos y proteínas. La carne roja que tenía tratamiento de aceites esenciales se pudo conservar en condiciones óptimas por un periodo de 6 a 7 días, sin afectar la inocuidad y calidad nutritiva relacionada con lípidos y proteínas. A partir del día 3, el control presentó oxidación de los lípidos y no reflejó la misma concentración de proteínas, en comparación con los tratamientos.

Como recomendación, se sugiere ampliar el estudio de las propiedades sensoriales de la carne que ha sido tratada con aceites esenciales y evaluar la preferencia de los consumidores.



9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, P. Y. (2014). *Extractos funcionales de especias obtenidos por hidrodestilación y co-hidrodestilación y su aplicación en la protección de la carne roja*. Chihuahua, Chihuahua, Méx., Chihuahua, México: Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas.
- Allara, M., Delgado, P. J., Izquierdo, P., & Torres, G. (2001). Contenido de proteínas y perfil de aminoácidos del atún (*Thunnus thynnus*): efecto de tres métodos de cocción. *Multiciencias*, 1(2), 141-147.
- Anticona, J. M., & Valles, M. N. (2015). Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella Typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*. *REBIOLEST*, 42 - 51.
- Anzaldúa-Morales, A. (1994). *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.
- AOAC 991,36. (2000). Official Method 991.36, Fat (Crude) in Meat and Meat Products. *Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis*.
- Apolonio, J., Faleiro, M. M., & Neto, L. (2014). No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. *FEMS Microbiology Letters*, 92 - 101. doi:10.1111/1574-6968.12440
- Arias, R., Keim, J. P., Velásquez, A., & Vargas-Bello-Pérez, E. (2016). Are fatty acids from beef and milk from cattle harmful for human health? *Revista Chilena de Nutrición*, 43(4), 420 - 427. doi:DOI 10.4067/S0717-75182016000400013
- Banerjee A., M. M. (2003). Actividad antimicrobiana de *cuminum cyminum L.* *Ars Pharmaceutic*, 257 - 269.



- Bastos Oyarzabal, M. E. (05 de Marzo de 2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(3), 260 - 266. Recuperado el 05 de Marzo de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000300006&lng=es&tIng=es
- Blanco, S. J. (2005). *Contribución al conocimiento de los recursos fitogenéticos de extremadura: el caso de los tomillos*. Ed. Badajoz.
- Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L., & Hmamouchi, M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea*. *Journal of Ethnopharmacology*(89), 165 - 169.
- Burt S., R. R. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *E. coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*(36), 162 - 167.
- Burt S., R. R. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *E. coli* O157:H7. . *Letters in Applied Microbiology*. , 162 – 167.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food a review. *International Journal of Food Microbiology*, 223 - 253.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 223-253.
- Cantú-Valdéz, J. A.-S.-M.-G.-R.-B.-Z. (2020). Mexican oregano essential oils as alternatives to butylated hydroxytoluene to improve the shelf life of ground beef. *Food science & nutrition*, 8(8), 4555–4564.
doi:<https://doi.org/10.1002/fsn3.1767>
- Carbajal, S. I. (2001). *Valor nutricional y composición de la carne de res, cerdo y pollo*. Obtenido de Corporación de Fomento Ganadero San José Costa Rica: <https://es.scribd.com/document/23462796/Valor-nutricional-y-composicion-de-la-carne>



- Celikel N., K. G. (2008). Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against some Pathogenic Microorganisms. *Journal of Food Science.*, 26(3), 174 –18.
- Centeno, L. (2004). Plantas medicinales españolas: Inula helenium I. Asteraceae Ínula. *Botanica Complutensis*, 28, 127 - 132.
- Cerpa, M. G. (Marzo de 2007). Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y Caracterización. Valladolid, España: Tesis para el grado de Doctor en Ciencias. doi:DOI: 10.13140/2.1.1994.0644
- Chaieb K., H. H.-N. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. *Phytotherapy Research Phytoter*, 21, 501 - 506.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. *Phytotherapy Research. Phytoter*.(21), 501–506.
- Dias, R. M., Zimmermann, M., Amadio, C., Espejo, C., Dip, G., & Raimondo, E. (2003). Aceite esencial de tomillo como antioxidante y conservador en hamburguesas funcionales. *Rev. FCA UNCuyo*, 13 - 23.
- Dias, R. M., Zimmermann, M., Espejo, C., Amadio, C., Raimondo, E., Dip, G., & Dupertuis, L. (2003). Aceite Esencial de tomillo como antioxidante y conservador en hamburguesas funcionales. *XXXV*(2).
- Estrada, A. Z., & González, Q. C. (Septiembre - octubre de 2016). Red PulseNet y su impacto en la salud. *COFEPRIS Protección y Salud*(6), 22-25. Recuperado el 28 de Abril de 2019, de <http://revistacofepris.salud.gob.mx/images/no6/secciones/ciencia.pdf>



- FAO. (5 de marzo de 2015). *Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, Producción y Sanidad Animal*. Obtenido de http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html
- FDA, A. d. (marzo de 2018). *Food and Drug Administration*. Obtenido de TABLA DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERADOR Y CONGELADOR: <https://www.fda.gov/media/76116/download>
- Fennema. (2017). *Food Chemistry* (Fifth ed.). (S. D. Parkin, Ed.) Boca Ratón, Florida, E.U: Taylor & Francis Group LLC.
- Flores, G. M. (2010). *Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso. Análisis del estado de su regulación en Chile y en el mundo*. Santiago de Chile: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas/ Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica.
- FUN. (2001). La carne de vacuno en la alimentación humana. *Fundación Española de la Nutrición*(16).
- González-Torres, Y. O., & Torres-Neira, O. L. (2016). Utilización de orégano (*Origanum vulgare*) como promotor de crecimiento. *Conexión Agropecuaria*, 6(2), 57 - 71.
- Hammer K., C. C. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. , 985 – 990.
- Hernández. (19 de octubre de 2005). Substitution de solvants et matieres actives de synthese par un combine « solvant/actif » d'origine vegetale. Substitution de solvants et matieres actives de synthese par un combine « solvant/actif » d'origine vegetale. *Substitution de solvants et matieres actives de synthese par un combine « solvant/actif » d'origine vegetale. Substitution de solvants et matieres actives de synthese par un combine « solvant/actif » d'origine vegetale*. Toulouse, Cedex, France: Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques, 118 route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex, France.



- Hernández, G. A. (2010). *Carnes y derivados. Tratado de Nutrición Composición y Calidad nutritiva de los Alimentos* (Vol. 2). Madrid, España: Médica Panamericana.
- Hernández, J.-J. (2009). *Microencapsulación del aceite esencial de orégano (Lippia berlandieri Schauer) para su aplicación en la conservación de carnes de res*. Buena Vista, Saltillo, Coahuila, México.
- Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de Química Analítica* (Novena ed.). México: Cengage Learning. Recuperado el 28 de Abril de 2019, de https://www.academia.edu/34474929/Libro_Fundamentos_Analitica_Skoog_9ed?auto=download
- Jayathilakan, K., Sharma, G., Radhakrishna, K., & Bawa, A. (2007). Antioxidant Potential of Synthetic and Natural Antioxidants and its Effect on Warmed - Over Flavour in Different Species of Meat. *Food Chemistry*, 105, 908 - 916.
- Köhler, F. E. (1897). Plantas Medicinales de Köhler. En F. E. Köhler, *Plantas Medicinales de Köhler*.
- Lang G., B. G. (2012). A review on recent Research Results (2008–2010) on Essential Oils as Antimicrobials and Antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal* , 27, 13–39.
- Lee C.J., S. O. (2008). Antimicrobial activity of Inula helenium L. essential oil against Gram-positive and Gram-negative bacteria and Candida spp. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, 31 581 – 592.
- León Méndez, G., Osorio Fortich, M. d., & Martínez Useche, S. R. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de Citrus sinensis L. *Revista Cubana de Farmacia*, 49, 49(4). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000400014



- Levario, G. A. (2010). *Tesis; Orégano como antimicrobiano frente a cepas multirresistentes.* . Chihuahua, Chihuahua, Méx. : Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas. .
- Liolios, C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, J. (2009). Liposomal Incorporation of Carvacrol and thymol Isolated from the Essential Oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry.*, 112(1), 77 – 83.
- Lizano Cruz, I. (2013). *Efecto de la aplicación de los aceites esenciales extraídos a partir de las hojas de pimienta de Jamaica (Pimienta dioica), hojas de canela (Cinnamomum zeylani) y orégano (Oreganum vulgare) en la preservación de carne de res.* San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica Facultad de Ciencias Agroalimentaria.
- Lizano Cruz, I. (2013). *Efecto de la aplicación de los aceites esenciales extraídos a partir de las hojas de pimienta de Jamaica (Pimienta dioica), hojas de canela (Cinnamomum zeylanicum) y orégano (Oreganum vulgare) en la preservación de carne de res.* San José, Costa Rica: UNIVERSIDAD DE COSTA RICA.
- Lizano Cruz, I. (2013). *Efecto de la aplicación de los aceites esenciales extraídos a partir de las hojas de pimienta de Jamaica (Pimienta dioica), hojas de canela (Cinnamomum zeylanicum) y orégano (Oreganum vulgare) en la preservación de carne de res.* San José, Costa Rica: Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. Obtenido de <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3390/1/36169.pdf>
- López P., G. P.-L. (2009). Antimicrobial Activity in the Vapour Phase of a Combination of Cinnamon and Clove Essential Oils. . *Food Chemistry*(116), 982 – 989.
- López, H. L., Braña, V. D., & Hernández, H. I. (2013). *Estimación de la vida de anaquel de la carne* (primera ed.). (A. y. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. Instituto Nacional de



- Investigaciones Forestales, Ed.) Ajuchitán, Colón, Queretaro, México: Casa abierta al tiempo. Recuperado el 26 de mayo de 2019, de <http://www.anetif.org/files/pages/0000000034/21-estimacion-de-la-vida-de-anaquel-de-la-carne.pdf>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., & Farr, A. a. (1951). Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagents. . *Journal Biology Chemistry*, 265 - 275. Recuperado el 09 de Noviembre de 2020, de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/PROCEDIMIENTOS13-I_20566.pdf
- Macias, C. Y. (2009). *Tesis; Elaboración de películas antimicrobianas utilizando aceites esenciales y extractos funcionales*. . Chihuahua, Chihuahua, Méx. 15-18: Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas.
- Martínez, O. M. (2009). *Tesis Efecto del aceite esencial de oregano y sus componentes activos sobre células de Pseudomonasaeruginosa*. . Chihuahua, Chihuahua, Méx. 7-9: Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas. .
- Meléndez Abanto, A. R. (2014). *Influencia del selenio orgánico en la estabilidad oxidativa de la carne de cerdo (sus scrofa domestica)*. Lima Perú.
- NMX-F-545-1992. (1992). *NMX-F-545-1992. Alimentos. Método de prueba para la determinación de extracto etéreo (método soxhlet) en productos cárnicos. Normas mexicanas. Dirección general de normas*. Recuperado el 09 de Noviembre de 2020, de <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-545-1992.PDF>
- NOM- 110 SSA1 . (1994). Norma Oficial Mexicana NOM- 110- SSA1- Bienes y Servicios, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. *Diario Oficial de la Federación*.
- NOM110. (Mayo de 1994). Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis



microbiológico. *Diario Oficial de la Federación*. Obtenido de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>

NOM-210-SSA1. (2014). Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. *Diario Oficial de la Federación*.

NOM-251-SSA1. (2009). Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. *Diario Oficial de la Federación*.

Ortuño, S. M. (2006). *Manual Práctico de Aceites esenciales, aromas y perfumes*. Ed. Aiyana.

PAHO. (s.f.). *PanAmerican Health Organization*. Obtenido de Peligros Químicos Inocuidad de Alimentos, Control Sanitario HACCP: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10849:2015-peligros-quimicos&Itemid=41432&lang=en

Pateiro, M., Barba, F. J., Domínguez, R., Anderson, S. S., Mousavi Khaneghah, A., Gavahian, M., Lorenzo, J. M. (2018). Essential Oils as Natural Additives to prevent Oxidation Reactions. *Food Research International*, 1 - 44.
doi:10.1016/j.foodres.2018.07.014

Rodríguez-Sauceda, R., Rojo-Martínez, G. E., Martínez-Ruiz, R., Piña-Ruiz, H. H., Ramírez-Valverde, B., Vaquera-Huerta, H., & Cong-Hermida, M. d. (julio - diciembre de 2014). Envases Inteligentes para la Conservación de Alimentos. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 10(6), 151 - 173.
Recuperado el 15 de mayo de 2019, de <https://www.redalyc.org/pdf/461/46132135012.pdf>

Sánchez, F. (2006). Extracción de aceites esenciales. Experiencia colombiana. *En: Memorias II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas*. , 1 - 8.



- Schmidt, H. H. (1984). Carne y productos cárnicos, su tecnología y análisis. Santiago de Chile. Fundación Chile.
- Seaberg, A., Labbe, G., & Shetty, K. (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by elite clonal extracts of oregano (*Origanum vulgare*). *Food Biotechnology* (17), 129 - 149.
- Shufen L., W. G. (2007). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*, 101, 1558–1564.
- SINAVE. (2017). *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*.
- Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Am. J. Enol. Vitic. *Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents*. , 144 -158.
- Soto-Domínguez, A., García-Garza, R., Ramírez-Casas, Y., Morán-Martínez, J., & Serrano-Gallardo, L. B. (2012). El Extracto Acuoso de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) del Norte de México. *International Journal of Morphology*, , 3(30), 937 - 944. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022012000300029>
- Sowbhagya H., S. B. (2008). Evaluation of size reduction and expansion on yield and quality of cumin (*cuminum cyminum* L) seed oil. *Journal of Food Engineering*.(84), 595–600.
- Stashenko, E. E. (2009). *Aceites Esenciales* (Primera ed.). Colombia, Colombia: División de Publicaciones UIS. Recuperado el 15 de Mayo de 2019
- Teira, G., Perlo, F., Bonato, P., & Tisocco, O. (2006). Calidad de carnes bovinas. Aspectos nutritivos y organolépticos relacionados con sistemas de alimentación y prácticas de elaboración. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, XVII(33), 173 - 193.
- Tellez Monzón, L. A., & Nolzco Cama, D. M. (Enero - diciembre de 2017). Ingeniería Industrial n.º 35, enero-diciembre 2017, ISSN 1025-9929, pp. 195-205 Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*



- spp.) de Tacna. *Ingeniería Industrial*.(35), 195 - 205. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=337453922010>
- Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez-Lamela, C., Vázquez, M., & Simal-Gándara, J. (2001). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(2), 66 - 80.
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., & Tamás, P. (Mayo de 2010). Efecto antibacteriano de aceites esenciales e interacción con los componentes de los alimentos. *Open Life Science formerly Central European Journal of Biology*, 5, 641 - 648. doi:DOI: 10.2478/s11535-010-0058-5
- UCLA. (Mayo de 2019). *Library University of California at Los Angeles*. Obtenido de <https://unitproj.library.ucla.edu/biomed/spice/index.cfm?displayID=9>
- Umagat, H., & Kucera, P. (1982). Total Aminoacid Analysis Using Pre.Column Fluorescence Derivatization. *Journal of Chromatography*, 463 - 474.
- Vargas Vega, M. B. (2019). *Evaluación microbiológica de aceite esencial de canela y clavo de olor, en la conservación de carne molida de res tipo hamburguesa*. (U. A. Salud, Ed.) Machala: Universidad Técnica de Machala. Recuperado el 8 de Diciembre de 2020, de http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/14107/1/T-2898_VARGAS%20VEGA%20MARIA%20BELEN.pdf
- Veall, F. (1993). *Estructura y funcionamiento de mataderos medianos en países en desarrollo*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ FAO. Obtenido de <http://www.fao.org/3/T0566S/T0566S12.htm>
- Ventura Grández, A. E. (2017). *Comparación de tres métodos en la extracción de aceite esencial de orégano silvestre (Lippia ssp.)*. Chachapoya , Perú: Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas - UNTRM. Recuperado el 6 de Diciembre de 2020, de <http://repositorio.unrtm.edu.pe/handle/UNTRM/1192>



- Verde, C., Hurtado, M., Dorantes, A., & F., M. (1999). *Manual de prácticas de química analítica II*. México: Editado: Universidad Autonoma Metropolitana.
- WHO. (2010). *WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS)*. France. Recuperado el 8 de Diciembre de 2020, de World Health Organization:
<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s17534en/s17534en.pdf>
- WHO/FOS . (2015). *Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases*. Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Transmisión Alimentaria (FERG). Recuperado el 28 de Abril de 2019
- Yucra-Ticona, N. Y. (2015). "Evaluación del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*L.), en la vida útil de la carne fresca de res y la concentración inhibitoria de *Eschechichia coli*". Puno, , Perú: Universidad Nacional del Altiplano. Recuperado el 8 de Diciembre de 2020, de
http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3366/Yucra_Ticona_Nel_y_Yolanda.pdf?sequence=1&isAllowed=y