



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

**Evaluación de una solución a base de extracto fitoquímico y ácido acético
como desinfectante de carne cruda de res**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ALMA CRISTINA ARELLANO GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JAVIER CASTRO ROSAS

Mineral de la Reforma, Hgo

Enero 2011

Por cuestiones de confidencialidad el nombre de la planta bajo estudio, así como gran parte de la información referente a ella, ha quedado restringido en esta tesis.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres José Luis y Esther por su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos Aura, Abel y Beto por su apoyo, sus consejos y su cariño.

A mis sobrinas Emilia, Sara y Ana por su alegría e inocencia.

A mis amigos Alicia, Emmanuel, Empe, Liz, Juana y Anaid por su compañía, su tiempo, su confianza y por ser mi familia entre semana.

A Iván por su compañía, cariño y apoyo.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Antimicrobianos naturales	3
2.1.2 Mecanismo de acción bactericida	6
2.2 Matriz alimentaria: Carne de res	7
2.2.1 Flora microbiana de la carne	8
2.2.2 Técnicas de descontaminación en la carne	10
2.3 Microorganismos utilizados	14
2.3.1 <i>Salmonella</i> Typhimurium	14
2.3.2 <i>Escherichia coli</i>	15
2.3.2.1 <i>E.coli</i> O157:H7	16
III OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos	18
IV MATERIALES	19
4.1 Equipo	19
4.1.2 Reactivos	19
4.1.3 Medios de cultivo	19
V MÉTODOS	20
5.1 Obtención del extracto vegetal	20
5.2 Preparación de la carne	20
5.3 Contaminación de la carne	20
5.3.1 Cepas	20
5.3.2 Inoculación de la carne	21
5.4 Tratamiento con la solución del extracto vegetal y ácido acético	21
5.5 Recuento en placa	22
5.6 Análisis estadístico	22

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1 Comparación del efecto antimicrobiano de dos concentraciones de extracto vegetal en <i>E. coli</i> O157:H7.	24
6.2 Comparación del efecto antimicrobiano de dos concentraciones de extracto vegetal en <i>S. Typhimurium</i> .	25
6.3 Evaluación del efecto bactericida de tres concentraciones de ácido acético sobre <i>E. coli</i> O157:H7.	28
6.4 Efecto antimicrobiano de 0.05g/mL de extracto vegetal sobre <i>E. coli</i> O157:H7, sólo y combinado con tres concentraciones de ácido acético.	30
6.5 Evaluación del efecto antimicrobiano de 0.1 g/mL de extracto sólo y mezclado con tres concentraciones distintas de ácido acético, sobre <i>E. coli</i> O157:H7	33
6.6 Evaluación del efecto bactericida de tres concentraciones de ácido acético sobre <i>S. Typhimurium</i> .	36
6.7 Evaluación del efecto antimicrobiano de 0.05 g/mL de extracto vegetal sólo y combinado con tres concentraciones de ácido acético sobre <i>S. Typhimurium</i> .	39
6.8 Efecto antimicrobiano de 0.1 g/mL de extracto vegetal sólo y combinado con tres concentraciones de ácido acético sobre <i>S. Typhimurium</i>	41
VII CONCLUSIONES	45
VIII BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	51
Índice	i
Índice de tablas	iii
Índice de gráficas	iv
Índice de anexos	v

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Especies y sus compuestos con actividad antimicrobiana	3
Tabla 2. Comparación de medias de log UFC/mL de <i>E.coli</i> O157:H7 al utilizar dos concentraciones de extracto vegetal y su nivel de significancia	24
Tabla 3. Comparación de medias de log UFC de <i>S. Typhimurium</i> al utilizar dos concentraciones de extracto vegetal y su nivel de significancia	26
Tabla 4. Comparación de medias de UFC de <i>S. Typhimurium</i> en tres concentraciones de extracto durante cinco periodos de tiempo.	27
Tabla 5. Comparación de medias de UFC de <i>E. coli</i> O157:H7 al utilizar tres concentraciones de ácido acético y su nivel de significancia	28
Tabla 6. Comparación de medias de <i>E.coli</i> O157:H7 al utilizar 0.05g/ mL de extracto solo y mezclado con tres concentraciones de ácido acético.	31
Tabla 7. Comparación de medias de UFC de <i>E.coli</i> O157:H7 en 0.05 g/mL de extracto sólo y mezclado con tres concentraciones de ácido acético durante cinco periodos de tiempo.	32
Tabla 8. Comparación de medias de UFC de <i>E.coli</i> O157:H7 con una concentración de extracto de 0.1 g/mL y tres de ácido acético, y su nivel de significancia.	34
Tabla 9. Comparación de medias de UFC de <i>S.Typhimurium</i> al utilizar tres concentraciones de ácido acético	36
Tabla 10. Comparación de medias de UFC de <i>S.Typhimurium</i> en tres concentraciones de ácido acético durante cinco periodos de tiempo	37
Tabla 11. Comparación de medias de UFC de <i>S.Typhimurium</i> de 0.05g/mL de extracto sólo y con tres concentraciones de ácido acético.	39
Tabla 12. Comparación de medias de UFC de <i>S.Typhimurium</i> en durante cinco periodos de tiempo.	40

Tabla 13.	Comparación de medias de UFC de <i>S.Typhimurium</i> en 0.1g/mL de extracto solo y mezclado con tres concentraciones de ácido acético.	43
Tabla 14.	Comparación de medias de UFC de <i>S.Typhimurium</i> en 0.1 g/mL de extracto sólo y mezclado con tres concentraciones de ácido acético durante cinco periodos de tiempo.	44

Índice de gráficas

		Pág.
Gráfica 1.	Comportamiento de <i>E.coli</i> O157:H7 en tres concentraciones y tres periodos de tiempo	25
Gráfica 2.	Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> en dos concentraciones de extracto vegetal y cinco periodos de tiempo.	27
Gráfica 3.	Comportamiento de <i>E.coli</i> O157:H7 ante tres concentraciones de ácido acético.	29
Gráfica 4.	Comportamiento de <i>E.coli</i> O157:H7 ante 0.05g/mL de extracto vegetal sólo y con tres concentraciones de ácido acético.	33
Gráfica 5.	Comportamiento de <i>E.coli</i> O157:H7 en 0.1g/mL de extracto solo y combinado con tres concentraciones de ácido acético durante cinco periodos de tiempo.	35
Gráfica 6.	Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> ante tres concentraciones de ácido acético.	38
Gráfica 7.	Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> ante 0.05 g/mL de extracto vegetal sólo y mezclado con tres concentraciones de ácido acético.	41
Gráfica 8.	Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> ante 0.1 g/mL de extracto y su combinación con tres concentraciones de ácido acético en cinco periodos de tiempo.	43

Índice de anexos

	Pág.
Tabla 1A. Análisis de varianza para <i>E.coli</i> O157:H7 con dos concentraciones de extracto	51
Tabla 2A. Análisis de varianza para log UFC de <i>S. Typhimurium</i> con dos concentraciones de extracto	51
Tabla 3A. Análisis de varianza para UFC de <i>E. coli</i> O157:H7 en tres concentraciones de ácido acético.	52
Tabla 4A. Análisis de varianza para UFC de <i>E.coli</i> O157:H7 en 0.05g/mL de extracto vegetal y tres combinaciones con ácido acético.	52
Tabla 5A. Análisis de varianza para UFC de <i>E.coli</i> O157:H7 en 0.1g/mL de extracto vegetal y tres combinaciones con ácido acético.	53
Tabla 6A. Análisis de varianza para UFC de <i>S. Typhimurium</i> en tres concentraciones de ácido acético	53
Tabla 7A. Análisis de varianza para UFC de <i>S. Typhimurium</i> en 0.05g/mL de extracto vegetal y tres combinaciones con ácido acético.	53
Tabla 8A. Análisis de varianza para log de <i>S. Typhimurium</i> en 0.1g/mL de extracto y tres combinaciones con ácido acético	54
Tabla 9A. Comparación de medias de UFC de <i>E. coli</i> O157:H7 entre el efecto de todos los tratamientos utilizados al tiempo 0	55
Tabla 10A. Comparación de medias de UFC de <i>S. Typhimurium</i> entre el efecto de todos los tratamientos utilizados al tiempo 0	59

I. INTRODUCCIÓN

La actividad diaria de los consumidores se ha intensificado y el tiempo para preparar alimentos ha disminuido, así que la demanda de productos empacados, conservados y procesados se ha incrementado. Por otra parte, también hay una gran demanda de alimentos más saludables (menos sal, azúcar, y químicos) y producidos con nuevas tecnologías para prevenir el crecimiento de bacterias patógenas.

Es bien conocido que las bacterias más involucradas en las enfermedades transmitidas por alimentos son: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolytica*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, y *Campilobacter jejuni*. Las toxinas de hongos más encontradas en brotes de enfermedad han sido las de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus paraciticus*. Algunos virus implicados en intoxicaciones por el consumo de alimentos son los rotavirus, adenovirus, astrovirus, calicivirus y coronavirus.

La protección alimentaria contra microorganismos patógenos y deterioradores puede ser alcanzada por varios métodos, incluyendo manejo aséptico de los alimentos para prevenir contaminación, métodos físicos como lavado, calentamiento, irradiación; o métodos para inhibir el crecimiento microbiano tales como refrigeración, congelación, secado o adición de conservadores. Desafortunadamente estas técnicas no pueden ser aplicadas a todos los productos por los efectos indeseables que causarían en el alimento. En consecuencia se investiga el efecto antimicrobiano de sustancias naturales, con el fin de prevenir el desarrollo de microorganismos patógenos en alimentos, tales como derivados animales (lisozima, lactoferrina), derivados de

plantas (hierbas, extractos, especias) y metabolitos microbianos (bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos). Los extractos vegetales constituyen una fuente de sustancias antimicrobianas, que generalmente consisten en fenoles o compuestos aromáticos que por sus propiedades redox, actúan como agentes reductores. El uso de aceites esenciales se considera una alternativa natural a los conservadores químicos debido a la actividad antimicrobiana de distintas hierbas, especias y extractos. Algunos de los componentes vegetales con actividad antimicrobiana son: compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides. Los ácidos orgánicos y sus sales son utilizados como aditivos en la conservación de alimentos por su efecto antimicrobiano y acidulante. Los ácidos más empleados en alimentos son: acético, propiónico, láctico, cítrico, benzoico y sórbico.

La carne constituye una matriz alimentaria compleja, con alto contenido de proteínas y actividad de agua; condiciones que favorecen el desarrollo de microorganismos. La carne de res en México es de las más consumidas entre la población, con un consumo per cápita superior al de carne de porcino (17.3 kg/año vs 14.3 kg/año) y es uno de los alimentos en los que se ha encontrado con cierta frecuencia *Salmonella* y *E.coli* O157:H7; por lo que existe una regulación estricta para el control de estos patógenos en carne cruda. Debido a ello, se han propuesto diferentes procedimientos de desinfección de la carne cruda en canal para eliminar o reducir la concentración de los microorganismos patógenos a niveles no peligrosos.

En esta investigación se probó el efecto antimicrobiano de distintas concentraciones de extracto vegetal y de ácido acético en carne cruda de res, contra *E.coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium.

II. ANTECEDENTES

2.1 Antimicrobianos naturales

Los antimicrobianos de origen vegetal se extraen de plantas, hojas, flores, frutas, especias y hierbas (Naidu, 2000); la actividad antimicrobiana que poseen se atribuye a la fracción oleosa; sin embargo se limita el uso de aceites esenciales en alimentos porque tienen propiedades saborizantes y se requieren altas concentraciones para que sean efectivos (Saïdana *et al.* 2007). Se considera que especias como canela, semilla de mostaza, orégano, romero, tomillo, vainilla y ajo, poseen actividad antimicrobiana (Bower, 2003).

Aceites esenciales de especias como orégano y canela, poseen carvacrol, cinamaldehído y citral, compuestos que reducen la población de bacterias patógenas tales como *E. coli* O157:H7 (Wen-Xian, 2008). Otras especias y sus compuestos activos se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Especias y sus compuestos con actividad antimicrobiana

Hierba/espe- cia	Compuesto activo	Hierba/especia/ vegetal	Compuesto activo
Pimienta	eugenol, metil eugenol	Menta	α -, β -pineno, limoneno, 1,8-cineol
Alcaravea	Carvona	Cebolla	D- <i>n</i> -propil disulfuro, metil- <i>n</i> -propil disulfuro
Canela	cinamaldehido,eugenol	Orégano	Timol, carvacrol
Clavo	eugenol, eugenol acetato	Pimienta	monoterpenos
Cilantro	D-linalol, D- α -pineno β -pineno	Romero	Borneol, 1,8-cineol, bornil acetato
Comino	cuminaldehido	Salvia	1,8-cineol, borneol
Ajo	dialil disulfuro, dialil trisulfuro, alil propil disulfuro	Tomillo	Timol,carvacrol, mentol, mentona

Los compuestos fenólicos se encuentran en los tejidos vegetales como fenoles simples o sustituidos, principalmente como glucósidos o formas más complejas como moléculas polimerizadas con altos pesos moleculares. Flavonoides, ácidos fenólicos, lignina y polímeros fenólicos complejos (taninos poliméricos) son típicos de fresas, frambuesas y moras (Peter, 2004).

Las saponinas son compuestos que protegen a las plantas de stress y también poseen actividad antibacterial, antifúngica y antiviral. Este amplio espectro de actividad antimicrobiana puede ser utilizado en la protección de los alimentos; sin embargo, las diferentes formas de saponinas también difieren en su actividad y su aislamiento en grandes cantidades sigue siendo un reto.

Los glucosinolatos son abundantes en varias hortalizas que pertenecen a la familia de las crucíferas tales como coles de Bruselas, brócoli, mostaza, rábano y rutabaga. Los glucosinolatos volátiles tales como los isotiocianatos tienen un amplio rango de actividad antimicrobiana y antifúngica.

Probablemente los sistemas antimicrobianos mejor caracterizados se han encontrado en el jugo de cebolla (*Allium cepa*) y ajo (*Allium sativum*) a causa de que el crecimiento y la producción de toxinas de muchos microorganismos se han inhibido, al utilizar el jugo de estos vegetales, incluyendo *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* tipo A, *E.coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus aureus*, y el hongo *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Trichosporon*. El mayor componente antimicrobiano del ajo es la alicina (dialil tiosulfonato;tio-2-propeno-1-ácido sulfínico-5-alil éster) (Mendoza, 2008) y es más efectivo en Gram-positivas que en Gram-negativas (Bailey,

1944). La presencia de dialil sulfuro en carne de res reduce significativamente microorganismos aerobios nativos e inhibe el crecimiento de bacterias patógenas inoculadas (*S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Campylobacter jejuni*) los resultados de este estudio sugieren que la aplicación de estos compuestos organo sulfurados en carne o en otros sistemas alimentarios pueden elevar la seguridad microbiológica (Yin y Cheng, 2001).

Las pasas por su alta concentración de compuestos fenólicos tienen actividad antimicrobiana. Al utilizar un extracto de estos frutos secos se observó inhibición de *S. choleraesuis*, *E.coli* O157:H7 y *Saccharomyces fermenti* (Bower, 2003).

Los arándanos contienen algunos ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, flavonoides y muchos otros compuestos polifenólicos (Kim y Lee, 2005). Ácidos orgánicos tales como el cítrico y málico juegan papeles importantes en las propiedades antimicrobianas de los arándanos. Los ácidos fenólicos en arándanos incluyen ácido benzoico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido clorogénico y ácido ursólico (Chen *et al.* 2001). Un experimento en el que se utilizó el extracto de este fruto en carne de res inoculada con patógenos, la cual fue tratada con un concentrado de arándano y los resultados mostraron que bacterias como *S. Typhimurium* se redujeron significativamente después de 3 días a 21 °C, *E.coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. aureus* se redujeron de 2.3 - 4.1 log ufc/g a 7 °C (Xujian *et al.* 2007).

2.1.2 Mecanismo de acción bactericida

La membrana citoplasmática en los microorganismos se compone de una bicapa de fosfolípidos con proteínas embebidas. Es semipermeable y regula la transferencia de solutos y metabolitos dentro y fuera del citoplasma. También se asocia a importantes enzimas relacionadas a funciones metabólicas. La membrana citoplasmática es frecuentemente considerada como el mayor objetivo para agentes biocidas (Maillard, 2002). El fenol o ácido carbólico, y sus derivados son microbicidas que actúan al nivel de la membrana (Paulus, 1993).

Los aceites esenciales dañan las propiedades estructurales y funcionales de las membranas y esto se refleja en la disipación de dos componentes de la fuerza motriz de protones: el gradiente de pH (ΔpH) y el potencial eléctrico ($\Delta\Psi$). El carvacrol, un compuesto activo de muchos aceites esenciales, desestabiliza la membrana citoplasmática y las membranas exteriores y actúa como un “intercambiador de protones” resultando en una reducción del gradiente de pH. El colapso de la fuerza motriz de protones y el agotamiento de la reserva de ATP eventualmente causan la muerte celular (Peter, 2004).

Se ha propuesto que el mecanismo de acción antimicrobiano de los taninos incluye la inactivación de enzimas extracelulares y la privación de sustancias requeridas para el crecimiento microbiano a través de la inhibición de la fosforilación oxidativa. Otro mecanismo antimicrobiano puede ser la unión de los taninos con iones metálicos, necesarios para el desarrollo bacteriano (Scalbert, 1991).

En general el modo de acción de aceites esenciales es dependiente de la concentración; bajas concentraciones inhiben enzimas asociadas a la producción de energía mientras que cantidades más altas son capaces de precipitar proteínas. Sin embargo, es incierto si el daño a la membrana está cuantitativamente relacionado a la cantidad del compuesto antimicrobiano al cual la célula se expone (Peter, 2004).

En especies Gram-negativas, la membrana exterior es una barrera efectiva contra sustancias hidrofóbicas y macromoléculas. La permeabilidad de la membrana exterior se regula por canales hidrofílicos conocidos como porinas. Sin embargo, es posible debilitar específicamente a la membrana externa con varios agentes que desintegran la capa de lipopolisacárido. Estos agentes se llaman permeabilizantes. Se ha reportado que algunos compuestos de aceites esenciales, tales como pequeños terpenoides y compuestos fenólicos tienen actividad sobre la membrana externa (Poole 2004; Tegos *et al.* 2002; Nikaido, 2003).

En general bacterias Gram-positivas son más sensibles que las Gram-negativas a compuestos antimicrobianos presentes en especias (Peter, 2004).

2.2 Matriz alimentaria: Carne de res

La carne se define como aquellos tejidos animales que pueden emplearse como alimento y ha formado parte de la dieta humana desde la prehistoria y la aparición de la caza. El valor nutrimental de la carne es alto, pues se le considera un alimento altamente proteico, ya que aproximadamente el 95% del nitrógeno total del músculo es proteína y 5%: pequeños péptidos, aminoácidos

y otros compuestos. La carne es también una fuente de minerales y vitaminas (Forrest,1979; Varnam, 1998).

En el mundo hay una variedad muy grande de mamíferos, aves e incluso reptiles cuya carne es consumida por los humanos. Sin embargo, comercialmente el pollo, vacuno, cerdo y ovino son los animales que tienen mayor importancia en la producción, por ello estos mamíferos se domestican y crían específicamente para producir carne (Varnam, 1998).

La carne provee un ambiente ideal para el crecimiento microbiano tal como un pH óptimo (5.8-6.8), una elevada actividad de agua ($a_w = 0.99$), una gran variedad de compuestos nitrogenados y factores esenciales para el crecimiento tales como minerales y vitaminas (Davies, 1998).

Por tal razón la carne está asociada a una gran variedad de microorganismos patógenos, pues ha habido varios brotes de enfermedades causadas por éstos; relacionados al consumo de carne de pollo, res y otros animales (Ranken, 2000; Kerry, 2002).

Las carnes rojas y de pollo son las que provocan más intoxicaciones en los Estados Unidos y en otros países, por ejemplo 47% de los brotes en Bélgica, 38% en Suiza y 45% en Reino Unido son atribuidos al consumo de este tipo de carnes (Kerry, 2002).

2.2.1 Flora microbiana de la carne

La microbiología de la carne roja se determina por las condiciones bajo las cuales los animales son sacrificados y procesados, ya que una población

bacteriana elevada en las canales es propia de rastros que operan con deficientes prácticas sanitarias.

Por lo tanto los contaminantes bacterianos de mayor interés en la carne provienen del rumen, la piel, la materia fecal, el equipo y contaminación por parte de los operarios (Fernández, 2000).

La biota que generalmente se encuentra en la carne después del sacrificio o del almacenamiento, se conforma por bacterias Gram-negativas tales como: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Psychrobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella* y *Campylobacter*.

Entre las Gram-positivas se encuentran bacterias pertenecientes a los géneros: *Bacillus*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Kurthia*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Microbacterium* y *Brochotrix*.

Por su ubicuidad un gran número de hongos se encuentran en la carne, incluyendo los géneros *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Thamnidium*, *Sporotrichum*, *Monilia*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Monascus* y *Alternaria* (Fernández, 2000).

En cuanto a las levaduras las que se encuentran en mayor cantidad en carne son *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Debaromyces* y *Cryptococcus* (Jay, 2002).

Un grupo de especial importancia son las bacterias psicrótrofas debido a que ordinariamente la carne se mantiene bajo refrigeración. (Fernández, 2000).

2.2.2 Técnicas de descontaminación en la carne

La descontaminación es un tratamiento microbicida aplicado a la carne fresca con dos objetivos: reducir el número de patógenos en la carne y el segundo reducir la carga microbiana total (García, 2006).

Existen distintos procedimientos de descontaminación, los métodos físicos son:

1.- Lavado: para lavar la carne se utiliza agua, sin embargo, esta sólo sirve para remover suciedad, ya que no reduce significativamente la carga microbiana en la carne. Si el agua se utiliza a una alta temperatura la reducción de microorganismos es mayor, sin embargo, las altas temperaturas pueden afectar la apariencia de los tejidos. Por otro lado, se creía que el lavado con agua distribuía los microorganismos por todo el canal, pero estudios han encontrado que hay muy poca diferencia en la distribución de coliformes fecales antes y después del lavado en canales de res (Kerry, 2002).

2.- Tratamientos con vapor: se aplica vapor de 5 a 10 segundos a temperaturas de 80°C o más, seguido del enfriamiento rápido de la superficie, para lograr altas reducciones de bacterias en la carne sin afectar su apariencia.

3.- Pasteurización por vapor: Este sistema consiste en una cabina de pasteurización por vapor situado al final de la línea de faenado. En la primera etapa la superficie de las medias canales se seca con chorros de aire comprimido. A continuación, se somete al tratamiento en una cámara de vapor de baja presión a una temperatura de 90.5 °C. Finalmente se enfría por

aspersión de agua fría a 4.5 °C. La duración del proceso es de unos 30 segundos.

4.- Radiaciones ionizantes. Las radiaciones del orden de 2.5-3 kGy permiten eliminar los microorganismos patógenos no esporulados de procedencia entérica, y todo esto de forma inocua para el consumidor en términos de radioactividad inducida y de formación de sustancias tóxicas, sin efectos desfavorables en los caracteres organolépticos del producto. Su mayor inconveniente radica en que penetran sólo 1-2 cm, por lo que no pueden utilizarse para piezas grandes (García, 2006).

5.- Altas presiones. Esta tecnología se ha ensayado con cortes de carne pequeños y carne molida, en las cuales inactiva las formas vegetativas, pero no es eficaz frente a las esporas (García, 2006).

Algunos de los procedimientos químicos son:

1.- Ácidos orgánicos: los ácidos orgánicos son utilizados en la descontaminación de la carne debido a que inhiben el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (Theron *et al.* 2007); la acción de los ácidos orgánicos como bactericidas depende de tres factores: el pH, la disociación del ácido y el efecto específico relacionado a la molécula ácida (Price *et al.* 1994; Kerry, 2002).

Se piensa que la acción inhibitoria es el resultado de que la forma no disociada cruza la membrana plasmática y entra a la célula bacteriana. Una vez dentro de la célula el ácido se disocia porque hay un pH más alto (Theron, 2007).

El ácido acético y el láctico han sido los más aceptados para la sanitización de canales (Berry *et al.* 2000) y se encuentran en la formulación de varios compuestos empleados en la sanitización de canales de carne, como el Activin que es una combinación de lactoferrina y ácido láctico la cual resulta muy efectiva (Russell, 2003). La aplicación de este tipo de soluciones se aconseja que sea antes del enfriamiento, por duchado en cabinas especiales.

La eficacia de los ácidos orgánicos es mayor a temperaturas de 50-55°C. Las repercusiones negativas (cambio de color, la grasa adquiere un tono gris oscuro, sabores y olores anormales) parece que sólo se producen a concentraciones mayores del 2%. Existen dos hechos negativos: los ácidos orgánicos producen daños de los que las bacterias se pueden recuperar y el segundo es resistencia a estos ácidos (García, 2006).

Los ácidos orgánicos utilizados como bactericidas en carne para salchichas hacen que las cuentas totales disminuyan de 0.8 a 1.3 log₁₀ UFC/cm² cuando se usa L-ácido láctico al 1.25%. En carne desinfectada con ácido acético las cuentas microbianas de la superficie de la carne descienden en nivel de 1.47₁₀ UFC/cm² (Wan *et al.*, 2007).

2.- Agentes químicos: el cloro es el desinfectante más utilizado en la industria alimenticia; las formas en las que se utiliza son cloro gaseoso (Cl₂), hipoclorito de sodio (NaOCl), hipoclorito de calcio (Ca (OCl)₂) y dióxido de cloro (ClO₂).

La utilización de soluciones con altas concentraciones de cloro en el rastro tiene los inconvenientes de: olores intensos, corrosión del equipo, irritación de

los ojos de los operarios y posible formación de cloraminas, al reaccionar con los compuestos nitrogenados de la carne (García, 2006).

Cabe mencionar que en Estados Unidos no se permite el tratamiento de carne con este tipo de compuestos, no obstante, se han hecho estudios en los que se ha aplicado cloro en canales a una concentración de 200 ppm o más altas; dando como resultado una disminución de 2 log en el número de bacterias totales (Kerry, 2002).

El ozono es otra sustancia química utilizada por su efecto antimicrobiano. El ozono es soluble en agua, generalmente se encuentra como gas y es un poderoso agente oxidante. Se sabe que distintos factores como la temperatura, la humedad relativa, pH, etapa de desarrollo microbiano y materia orgánica presente afectan la acción antimicrobiana del ozono. Aunque puede ser usado como antimicrobiano puede afectar algunas características de la carne, tales como el color, pues los pigmentos de la carne son sensibles a la oxidación por altas concentraciones de ozono (>10 ppm) (Kerry, 2002).

Otros procedimientos para la descontaminación de la carne son:

1.- Combinaciones: Es el uso de dos o más de los tratamientos antes mencionados. Por ejemplo, en un estudio se utilizó un ácido orgánico junto con un proceso de irradiación para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos y bacterias deterioradoras como *L. monocytogenes*, *E.coli* O157:H7 y *Yersinia enterocolítica*. En dicho estudio se demostró que el uso de ácidos orgánicos (ácido ascórbico), en concentraciones de 0.5% p/p antes de un tratamiento de irradiación estabilizan el color de la carne durante el

almacenamiento incrementando su vida de anaquel sin afectar el color (Giroux *et al.* 2001)

2.- Otros métodos: El efecto antimicrobiano de las bacterias ácido lácticas ha sido usado por años para extender la vida de anaquel de los alimentos. Las bacterias ácido lácticas pueden producir un alto rango de metabolitos antimicrobianos los cuales incluyen ácidos orgánicos, diacetil, acetoina, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.

Se ha probado que las cepas de bacterias ácido láctica incluyendo *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus* han mostrado tener habilidad para reducir significativamente la descomposición de la carne (Katikou *et al.* 2005).

2.3 Microorganismos utilizados

2.3.1 *Salmonella* Typhimurium

Salmonella es un género bacteriano, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* integrado por gérmenes de forma bacilar, no esporulados, habitualmente móviles mediante flagelos peritricos que fermentan la glucosa con producción de gas. No fermentan la lactosa. (Anderson *et al.* 2000). Son bacterias Gram-negativas, aeróbicos facultativos relacionadas con *E.coli*, *Shigella* spp y otras bacterias entéricas (Madigan, 1997). El intervalo de pH en el que puede crecer está comprendido entre 4.1 y 9.0, multiplicándose en alimentos de baja acidez (Fernández, 2000).

Virtualmente, todas las *Salmonella* son patógenas para los humanos, más de 1400 serotipos son conocidos y clasificados como patógenos dentro de las

especies de *Salmonella*. *S. Typhimurium* es la causa más común de salmonelosis en humanos.

La salmonelosis más común es la enterocolitis producida por *Salmonella*. La ingestión de alimentos conteniendo 10^5 - 10^8 células de *Salmonella* viables deriva en la colonización del intestino delgado y grueso. La aparición de la enfermedad ocurre 8 a 48 horas después de la ingesta. Los síntomas incluyen un repentino dolor de cabeza, escalofríos, vómitos y diarrea, seguido de fiebre durante varios días. (Madigan, 1997)

Animales productores de alimento como los pollos y el ganado pueden también ser portadores de *Salmonella* patógena para humanos, que pueden pasar a los alimentos frescos como huevos, carne y productos lácteos.

Otros alimentos comúnmente implicados en los brotes de salmonelosis son las natillas, pasteles con crema, merengues y productos que incluyen huevo sin cocinar (Madigan, 1997).

2.3.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y es la bacteria más abundante en el intestino grueso del ser humano. La mayoría de las cepas actúan como comensales que protegen frente a la infección al competir con patógenos intestinales. Algunas cepas de *E.coli* son patógenas y constituyen la principal causa de diarrea en niños en países en vías de desarrollo. Las cepas patógenas de *E.coli* poseen una serie de factores de virulencia de los que carecen las cepas no patógenas; así las primeras pueden adherirse a las células humanas, invadir los tejidos y producir toxinas. Según

qué tipos de factores de virulencia posea una determinada cepa patógena, las que afectan al tracto intestinal pueden clasificarse en: cepas enterotoxígenas (ECET), enteroinvasivas (ECEI), enteropatógenas (ECEP), enterohemorrágica (ECEH), enteroadherente (ECEA) y enteroagregativa (ECEG) (Ingraham, 1998).

Las cepas enterotoxígenas poseen adhesinas que les permiten fijarse al epitelio intestinal. Las cepas enteroinvasivas causan un síndrome disentérico; estas cepas además de las adhesinas y las toxinas, producen proteínas codificadas por plásmidos que permiten que la bacteria invada las células del cuerpo humano. Esta toxina provoca la inhibición de la síntesis proteica y destruye las células de la mucosa intestinal, lo que produce disentería y colitis.

Las cepas enteropatógenas probablemente produzcan una toxina que destruye las microvellosidades del epitelio intestinal. En este tipo de cepa las adhesinas se encuentran en la membrana externa de su pared celular (Ingraham, 1998).

2.3.2.1 *E coli* O157:H7

E coli serotipo O157:H7 es una rara variedad de *E.coli*, un habitante normal en el intestino animal y humano. El patógeno produce grandes cantidades de una o varias toxinas, llamadas Shiga toxinas, que causan serios daños al tejido del intestino y a otros órganos. *E.coli* O157: H7 fue descubierta en 1982 durante un brote de diarrea sanguinolenta causada por hamburguesas contaminadas.

Los bovinos y otros rumiantes son considerados los principales reservorios de *E.coli* O157:H7, y es comúnmente aislado de materia fecal de bovinos y ovinos (Roldán *et al.* 2007).

En Estados Unidos se ha estimado que las infecciones por *E.coli* O157:H7 son responsables de al menos 20.000 casos de enfermedad y 250 muertes por año, con un costo financiero de entre 250 y 500 millones de dólares (Roldán *et al.* 2007).

Las infecciones por *E.coli* O157:H7 pueden ser una consecuencia del consumo de leche cruda o carne poco cocida. La contaminación de la carne durante la faena es el principal modo de transmisión de *E. coli* O157:H7 a los alimentos; así que los productos elaborados con carne picada han estado implicados en la mayoría de los brotes, fundamentalmente asociados al consumo de hamburguesas.

El consumo de leche cruda, inadecuadamente pasteurizada o contaminada después del proceso térmico, de crema de leche y de quesos elaborados con leche cruda ha sido asociado con brotes severos de enfermedades causadas por *E.coli* O157:H7(Roldán *et al.* 2007).

Otros alimentos identificados como vehículo de *E. coli* O157:H7 son carne asada, carne de venado ahumada, salami, yogurt, jugo de manzana no pasteurizado, melón, papas, brotes de rábanos y brotes de alfalfa.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluar la potencia de una solución a base de un extracto fitoquímico y ácido acético en la desinfección de carne cruda de res.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto fitoquímico en carne cruda de res contaminada con *Salmonella* Typhimurium y *E. coli* O157:H7.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de una mezcla de extracto fitoquímico y ácido acético en carne cruda de res contaminada con *Salmonella* Typhimurium y *E. coli* O157:H7.
- Comparar estadísticamente el efecto antimicrobiano de las distintas soluciones utilizadas.

IV. MATERIALES

4.1 Equipo

El material utilizado en esta investigación fue el siguiente:

Agitador Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, U.S.A)

Autoclave eléctrica SM 200 (Yamato Scientific, U.S.A)

Balanza analítica (Ohaus, U.S.A)

Campana de flujo laminar

Cuenta colonias (Darkfield Québéx, Cta. American Optical, U.S.A)

Incubadora bacteriológica (Blue M, U.S.A)

Parrilla eléctrica (Thermolyne Cimarec, U.S.A)

Refrigerador (Lab-line Environeers Inc., U.S.A)

Rotavapor

4.1.2 Reactivos

Agua destilada

Antibiótico Rifampicina

Etanol

Ácido acético

4.1.3 Medios de cultivo

Medios de cultivo marca Bioxon

Agar cuenta estándar (ACE)

Diluyente peptona de caseína (DP)

Caldo Soya Trypticaseína (CST)

Agar Base Sangre (ABS)

V. MÉTODOS

5.1 Obtención del extracto vegetal

Se pesaron 250 gr del vegetal y se licuaron con 500 mL de etanol. La mezcla se colocó en un matraz y se dejó a temperatura ambiente por 48 h. Posteriormente se tamizó en una malla de abertura 200 para remover todos los tejidos vegetales; el líquido obtenido se colocó en el rotavapor con una temperatura de baño de 60°C por 3 h a fin de eliminar el etanol. Se obtuvieron 29.04 gr de extracto de consistencia viscosa y olor agradable, lo que equivale a un 11.61% de rendimiento.

5.2 Preparación de la carne

Se utilizó pulpa de res, adquirida en una tienda departamental (Aurrerá) en Pachuca, Hgo. La carne se cortó en trozos de 2cm de largo por 1cm de ancho y 1 cm de profundidad aproximadamente, en un ambiente no estéril y se colocó en charolas de plástico.

5.3 Contaminación de la carne

5.3.1 Cepas

Se utilizaron 2 cepas resistentes al antibiótico Rifampicina: *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium. Para seleccionar las cepas resistentes a Rifampicina se inició con un cultivo incubado por 12 h a 35° C en CST, el cual se centrifugó por 20 min a 3000 rpm, posteriormente se desechó el líquido de los tubos centrifugados y la parte restante se suspendió en 1 mL de solución salina isotónica. Un mL de la suspensión obtenida se colocó en cajas petri que contenían ACE y Rifampicina al 0.01%.

Las placas inoculadas se incubaron a 35°C por 48-72 h. Las colonias que se desarrollaron en el medio se estriaron en nuevas placas de ACE con rifampicina. Las cepas se mantuvieron a 4-7°C en ABS inclinado y se activaron inoculándolas en CST, 48 h antes de utilizarlas.

5.3.2 Inoculación de la carne

Del cultivo de la cepa con una concentración aproximada de 10^9 UFC/mL se realizaron cuatro diluciones decimales en tubos con 9 mL de DP. Del cuarto tubo de dilución se tomaron 20 μ L y se colocaron sobre el trozo de carne, la carne inoculada se secó 1 h en la campana de flujo laminar.

5.4 Tratamiento con la solución de extracto vegetal y ácido acético

Se utilizaron dos concentraciones de extracto vegetal: 0.1 g/mL y 0.05 g/mL, que se colocaron en charolas de papel aluminio. La carne inoculada se introdujo en estas charolas por 10 min. Posteriormente los trozos de carne se retiraron de la charola con solución y se colocaban en una charola de plástico, la cual se almacenó a 4°C (esquema 1).

Se utilizaron tres concentraciones de ácido acético: 0.1%, 0.5% y 1%v/v. El tratamiento de la carne con las soluciones de ácido fue el mismo que con la solución de extracto. Cuando se testaba la solución con ácido acético y extracto, el extracto se solubilizaba en la solución de ácido acético y se procedía al tratamiento ya explicado.

Todos los estudios se realizaron por triplicado y el control se realizó poniendo los trozos de carne con agua destilada.

5.5 Recuento en placa

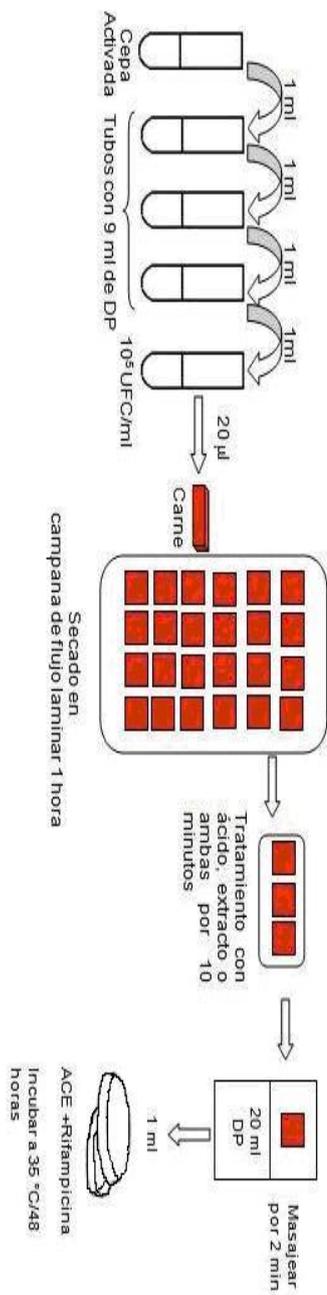
Cada trozo de carne sometido a un tratamiento se colocó en una bolsa de plástico con 20 mL de DP y se masajeó por 2 minutos, con el fin de extraer las células que se adhirieron a la carne. Se colocó 1 mL del DP de la bolsa, en una caja petri con AME y rifampicina al 0.01%. Las placas se incubaron durante 48 h a 35°C.

El recuento se realizó a tiempos de 0, 24, 48, 72 y 92 h.

Las colonias observadas se contaron y el valor obtenido se expresó como UFC/mL

5.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el procedimiento de análisis de varianza (SAS versión 8.0; SAS Institute Inc., Cary, N.C.). Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Se realizó la prueba de comparación de medias con el estadístico de la Diferencia Mínima Significativa al nivel de 5% de probabilidad de error.



Esquema 1. Inoculación de la carne y recuento en placa

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Comparación del efecto antimicrobiano de dos concentraciones de extracto vegetal en *E.coli* O157:H7.

Se evaluó el efecto antimicrobiano de dos concentraciones de extracto: 0.1 g/mL y 0.05 g/mL en trozos de carne de res inoculados con aproximadamente 2000 UFC de *E.coli* O157:H7. Los recuentos se realizaron en tres periodos de tiempo (0, 24 y 120 h), las pruebas se realizaron por triplicado.

De los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico (Tabla 1A de anexos y Tabla 2) para obtener la diferencia mínima significativa (DMS) entre el efecto antimicrobiano de las dos concentraciones de extracto y los tres periodos de tiempo.

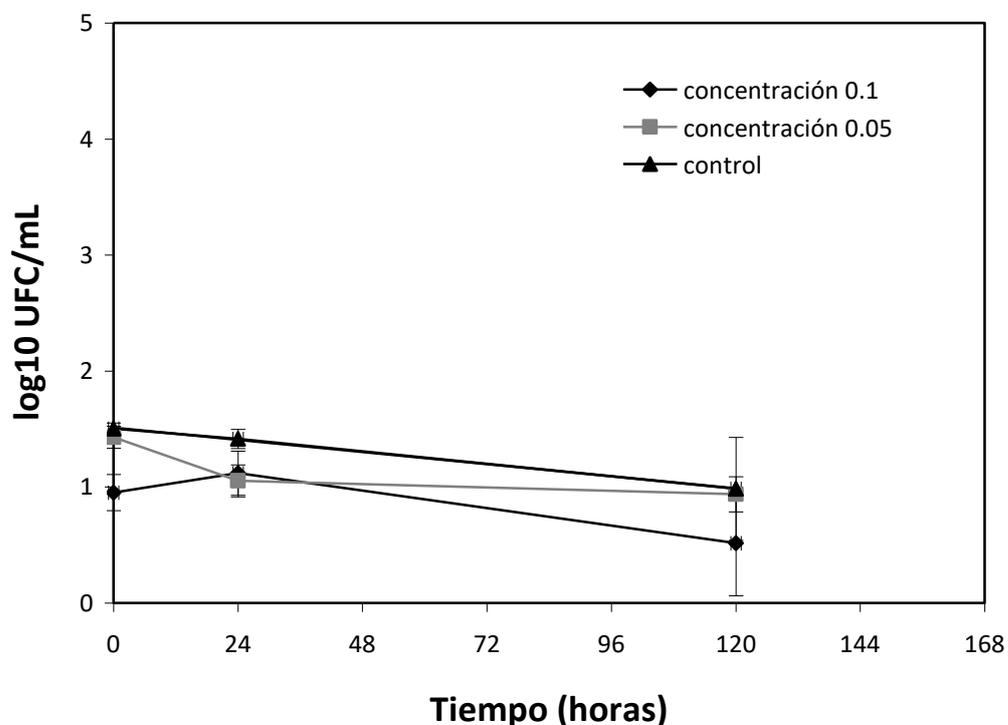
Tabla 2. Comparación de medias de log UFC/mL de *E.coli* O157:H7 al utilizar dos concentraciones de extracto vegetal y su nivel de significancia

Concentración de extracto	Media de log UFC/mL
Control	1.30 ^a
0.05 g/mL	1.23 ^a
0.1g/mL	0.86 ^b

Las medias con letra distinta son significativamente diferentes, DMS =0.2386

Por los resultados del análisis estadístico, se infiere que la concentración de 0.1g/mL es la más efectiva, porque tiene un efecto estadísticamente diferente a la otra concentración y la media más baja de log UFC/mL en todo el experimento. Este efecto se observa en la gráfica 1, en la que el efecto antimicrobiano se observa desde la hora 0 y se mantiene hasta las 120 horas; en comparación con el estudio hecho por Cutter (2000) en el cual el antimicrobiano herbal utilizado tuvo efecto hasta los 7 días de aplicado.

Gráfica 1. Comportamiento de *E.coli* O157:H7 en tres concentraciones y tres periodos de tiempo.



Con lo anterior se infiere que el extracto vegetal utilizado posee sustancias capaces de afectar el desarrollo de microorganismos inoculados en la carne al momento de su aplicación, y que el efecto antimicrobiano es proporcional a la concentración utilizada.

6.2 Comparación del efecto antimicrobiano de dos concentraciones de extracto vegetal en *S. Typhimurium*.

Se realizó un análisis estadístico (tabla 2A de anexos y tabla 3) de los recuentos obtenidos, para obtener la diferencia mínima significativa (DMS) de los efectos de 0.1g/mL y 0.05g/mL de extracto en cinco periodos de tiempo contra *S. Typhimurium*.

Tabla 3. Comparación de medias de log UFC de *S. Typhimurium* al utilizar dos concentraciones de extracto vegetal y su nivel de significancia

Concentración de extracto	Media de log UFC/mL
Control	1.89281 ^a
Extracto 0.05g/mL	1.88257 ^a
Extracto 0.1 g/mL	1.75011 ^b

Las medias con letra diferente son significativamente diferentes, DMS 0.1256

En este experimento se reafirma la proposición de que a mayor concentración del extracto vegetal utilizado en esta investigación hay una mayor reducción en los microorganismos inoculados, ya que el efecto de 0.1g/mL es estadísticamente diferente a los demás.

Existen otros extractos que tiene efecto antimicrobiano contra este patógeno en concentraciones menores (4.5mg/mL), tal como el aceite esencial de salvia (Hayouni, 2008).

Es probable que las sustancias presentes en el extracto hayan causado un stress en las células, lo cual debilita su desarrollo a lo largo del tiempo y provoque su muerte, tal como se observa en la gráfica 2.

Este experimento prueba que el extracto fitoquímico posee sustancias antimicrobianas contra microorganismos Gram-negativos, cuando se utiliza a una concentración de 0.1g/mL.

Gráfica 2: Comportamiento de *S. Typhimurium* en dos concentraciones de extracto vegetal y cinco periodos de tiempo.

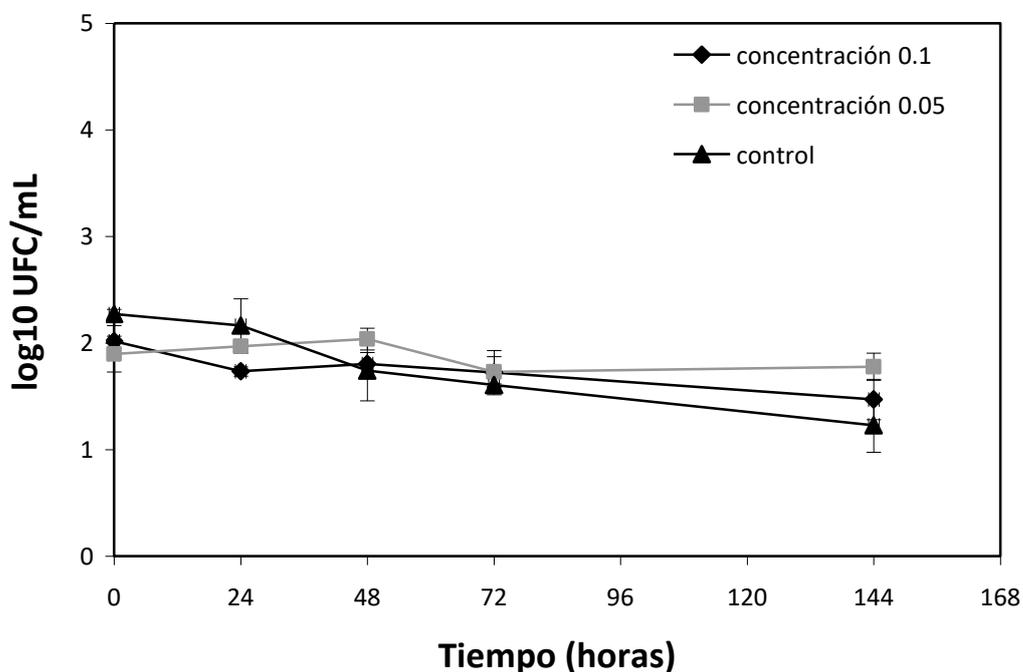


Tabla 4. Comparación de medias de UFC de *S. Typhimurium* en tres concentraciones de extracto durante cinco periodos de tiempo.

Concentración			
Tiempo(hora)	Control	0.1g/mL	0.05g/ml
0	2.2727 ^a	2.01793 ^a	1.89804 ^c
24	2.16275 ^b	1.73358 ^c	1.96856 ^b
48	1.74191 ^c	1.80427 ^b	2.03726 ^a
72	1.60554 ^d	1.72356 ^c	1.72917 ^d
144	1.22671 ^e	1.47121 ^d	1.77782 ^d

Las medias con letra diferente son significativamente diferentes E estándar = 0.0390777

Los resultados de la tabla 4 indican que el efecto antimicrobiano permanece en la carne a lo largo del tiempo, y que los recuentos más bajos se obtienen a la

hora 144, lo cual ha sucedido al utilizar extractos de semilla de uva, de pino y romero pues las mayores reducciones se midieron después de 9 días de haber refrigerado la carne con el tratamiento antimicrobiano (Ahn *et al.* 2007)

6.3 Evaluación del efecto bactericida de tres concentraciones de ácido acético sobre *E.coli* O157:H7.

Estudios han demostrado que los lavados con ácidos orgánicos reducen poblaciones de bacterias mesofílicas aerobias y disminuyen o suprimen el crecimiento de este grupo de bacterias durante el almacenamiento. El crecimiento de los microorganismos es más rápido en tejidos sin un tratamiento o lavados con agua (Berry, 1999).

De los resultados obtenidos de los recuentos se realizó un análisis estadístico (tabla 3A de anexos y tabla 5) para obtener la diferencia mínima significativa (DMS) de los efectos de tres concentraciones de ácido acético en cinco periodos de tiempo.

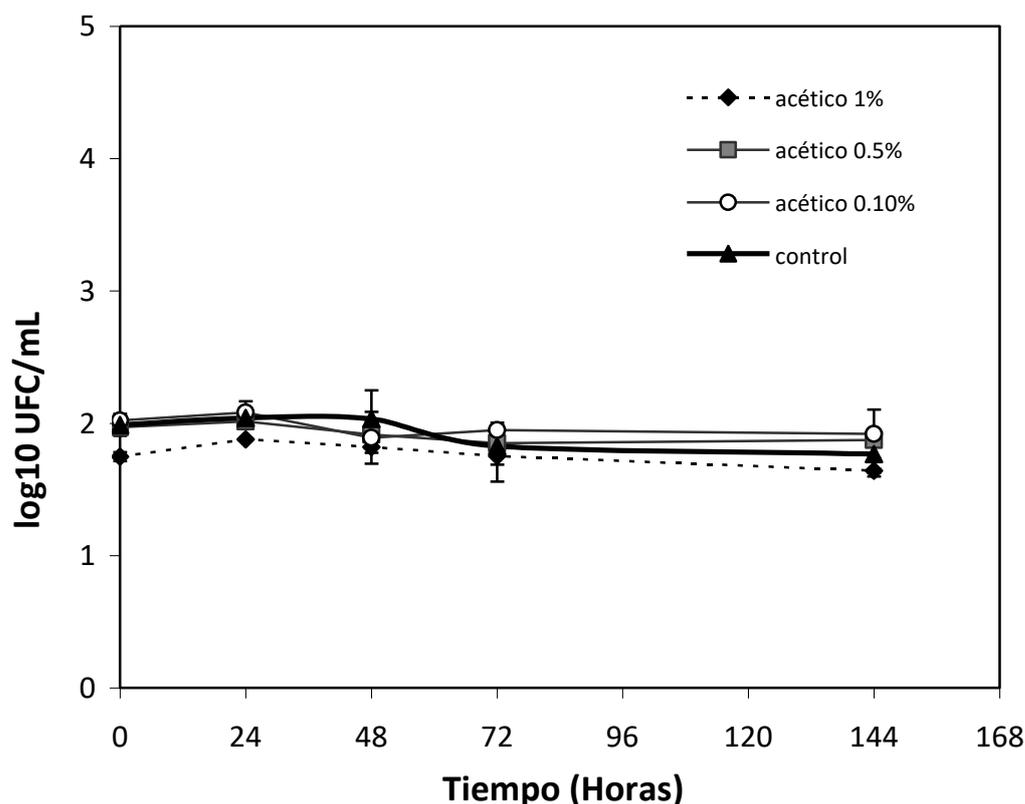
Tabla 5. Comparación de medias de UFC de *E. coli* O157:H7 al utilizar tres concentraciones de ácido acético y su nivel de significancia.

Concentración de extracto	Media de log UFC/mL
Ácido acético 0.1%	1.97 ^a
Ácido acético 0.5%	1.92 ^a
Control	1.92 ^a
Ácido acético 1%	1.78 ^b

Las medias con letra distinta son significativamente diferentes, DMS=0.08

El tratamiento más efectivo fue el ácido acético al 1% porque obtuvo una media más baja de log UFC/mL, como se observa en la gráfica 3 al tiempo 0, y su efecto es estadísticamente distinto a los demás tratamientos.

Gráfica 3. Comportamiento de *E.coli* O157:H7 ante cuatro concentraciones de ácido acético.



Estudios indican que al usar concentraciones de 1.5% a 3.0% de ácidos orgánicos se logran reducciones de 1.3 a 2.0 log UFC/cm² (Dorsa *et al*, 1997); esto comprueba que el efecto antimicrobiano del ácido acético es también proporcional a su concentración. Sin embargo no se utilizan concentraciones muy elevadas por el cambio sensorial que se produce en la carne.

En un estudio similar (Berry, 1999) la reducción de población de *E.coli* O157:H7 tuvo un comportamiento semejante al mostrado en este estudio. Al aplicar una solución de 2% v/v de ácido acético en spray, la mayor reducción se obtiene al

momento de aplicar el tratamiento y al paso del tiempo no hay diferencias en la reducción de log de UFC, cómo se observa en la gráfica 3 donde la población de *E.coli* O157:H7 es estable a lo largo del tiempo.

Se infiere que esto es producto de la resistencia de *E.coli* a ambientes ácidos, debido a que en brotes de enfermedad causados por esta cepa, los alimentos implicados son ácidos, tales como el jugo de manzana (pH 3.4) y salami fermentado (pH 5.0) (Leyer, 1995).

Se destaca que las células de *E. coli* sobreviven aún a las 144 horas y no tienden a morir como se observa en gráficas anteriores, esto puede deberse a un factor como la temperatura, ya que Conner y Kotrola (1995) reportaron que la presencia de ácidos orgánicos incluyendo acético, cítrico y láctico en un medio de cultivo a 4°C, mantiene la sobrevivencia de *E.coli* O157:H7, comparada con la que hay en medios sin acidificar mantenidos a la misma temperatura.

6.4 Efecto antimicrobiano de 0.05g/mL de extracto vegetal sobre *E.coli* O157:H7, sólo y combinado con tres concentraciones de ácido acético.

Se mezcló el ácido acético y el extracto vegetal para obtener un mayor efecto en la reducción de UFC en la carne.

De los resultados obtenidos en este experimento se realizó un análisis estadístico (tabla 4A de anexos y tabla 6) para obtener la diferencia mínima significativa (DMS) de los efectos de: 0.05g/mL de extracto vegetal y su combinación con tres concentraciones de ácido acético en cinco periodos de tiempo.

Tabla 6. Comparación de medias de *E.coli* O157:H7 al utilizar 0.05g/ mL de extracto solo y mezclado con tres concentraciones de ácido acético.

Concentración de extracto	Media de log UFC/mL
Control	2.12 ^a
Extracto 0.05g/mL	2.11 ^a
Mezcla 0.05g/mL extracto + 0.5% ácido acético	2.01 ^{ab}
Mezcla 0.05g/mL extracto + 1% ácido acético	1.92 ^b
Mezcla 0.05 g/mL extracto + 0.1% ácido acético	1.76 ^c

Las medias con letra diferente son significativamente diferentes, DMS = 0.1563

Con este experimento se comprobó que el extracto fitoquímico complementado con ácido acético posee mayor efecto antimicrobiano, pues el tratamiento más efectivo fue la mezcla de 0.05g/mL de extracto más 0.1% de ácido acético y al utilizar sólo 0.05g/mL de extracto el efecto es el mismo que poner la carne en contacto con agua.

En este experimento existe significancia en la interacción concentración-hora, la diferencia significativa entre la interacción se encuentra en la tabla 7.

Tabla 7. Comparación de medias de UFC de *E.coli* O157:H7 en 0.05 g/mL de extracto sólo y mezclado con tres concentraciones de ácido acético durante cinco periodos de tiempo.

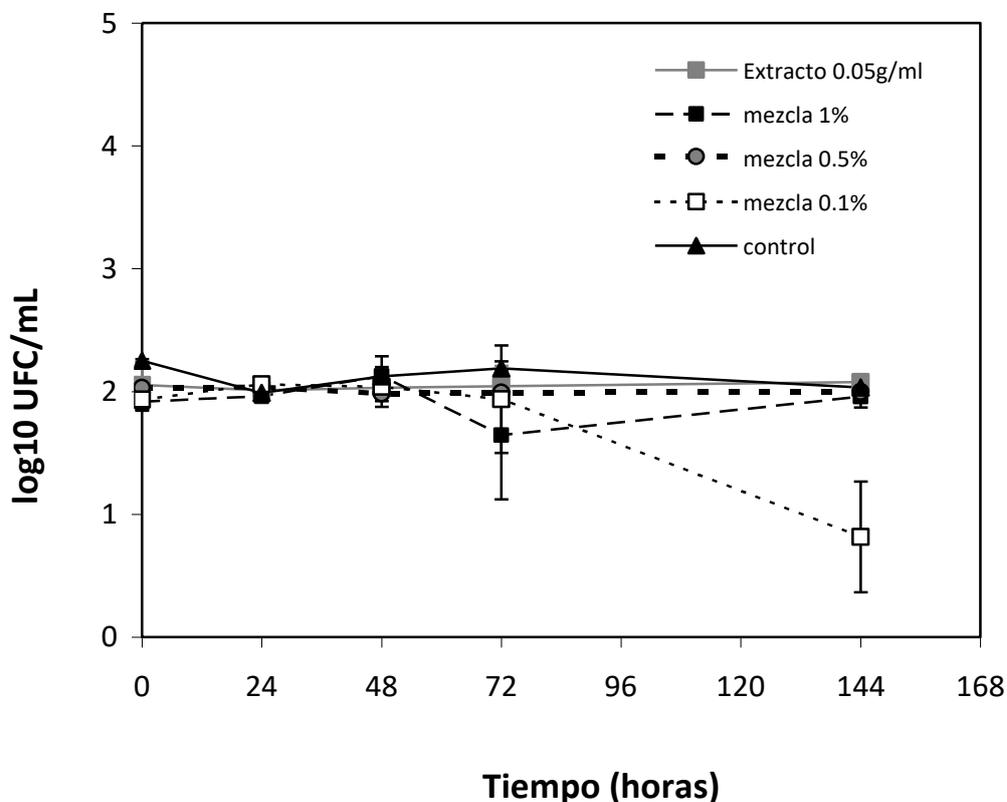
Concentración		0.05g/mL	0.05g/mL+	0.05g/mL+	0.05g/mL+0.1
Tiempo(horas)	Control	ext	1%	0.5%	%
0	2.25 ^a	2.05 ^a	1.92 ^b	2.03 ^a	1.93 ^b
24	1.99 ^b	2.01 ^a	1.96 ^b	2.04 ^a	2.06 ^a
48	2.12 ^c	2.03 ^a	2.13 ^a	2.00 ^a	2.04 ^a
72	2.19 ^c	2.04 ^a	1.64 ^c	2.00 ^a	1.94 ^b
144	2.03 ^d	2.07 ^a	1.95 ^b	2.00 ^a	0.82 ^c

Las medias con letra diferente son significativamente diferentes Error estándar= 0.0550

Los resultados de la interacción concentración-hora, indican que el efecto de 0.05g/mL es bacteriostático (gráfica 4); lo mismo se observa en la mezcla de extracto con 0.5% de ácido acético.

Las mezclas que tienen un efecto diferente a lo largo del tiempo son: la que tiene 1% y 0.1% de ácido acético. Esto puede deberse a que sustancias que sustancias presentes en el extracto vegetal en adición con el ácido acético, logren una mayor desestabilización de la membrana exterior de las células (Alakomi, 2007) provocando un desequilibrio en el interior de la misma que afecta sus funciones vitales.

Gráfica 4. Comportamiento de *E.coli* O157:H7 ante 0.05g/mL de extracto vegetal sólo y con tres concentraciones de ácido acético.



Al poner la carne en contacto con la mezcla con 0.1% de ácido acético y 0.05g/mL de extracto se observa que al tiempo 144 es el recuento más bajo comparado con los demás tratamientos, esto pudo deberse a que las condiciones de la carne como la aw fuera más baja en esos trozos que en los demás afectando al desarrollo de los microorganismos.

6.5 Evaluación de efecto antimicrobiano de 0.1 g/mL de extracto sólo y mezclado con tres concentraciones distintas de ácido acético, sobre *E.coli* O157:H7

En la bibliografía se indica que se utilizan ácidos orgánicos para realizar desinfecciones en canales de res (Mohamed *et al.* 2008); en éstos

experimentos se probó el efecto de tres concentraciones de ácido en combinación con 0.1g/mL de extracto vegetal.

De los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico (tabla 5A de anexos y Tabla 8) para obtener la diferencia mínima significativa (DMS) de los efectos de 0.1g/mL de extracto y su combinación con tres concentraciones de ácido acético, en cinco periodos de tiempo.

Tabla 8. Comparación de medias de UFC de *E.coli* O157:H7 con una concentración de extracto de 0.1 g/mL y tres de ácido acético, y su nivel de significancia.

Concentración de extracto	Media de log UFC/mL
Control	1.92 ^a
Extracto 0.1g/mL + acético1%	1.58 ^b
Extracto 0.1g/mL	1.57 ^b
Extracto 0.1g/mL+acético 0.5%	1.51 ^b
Extracto 0.1g/mL+acético 0.1%	1.48 ^b

Las medias con letra distinta son significativamente diferentes, DMS =0.1443

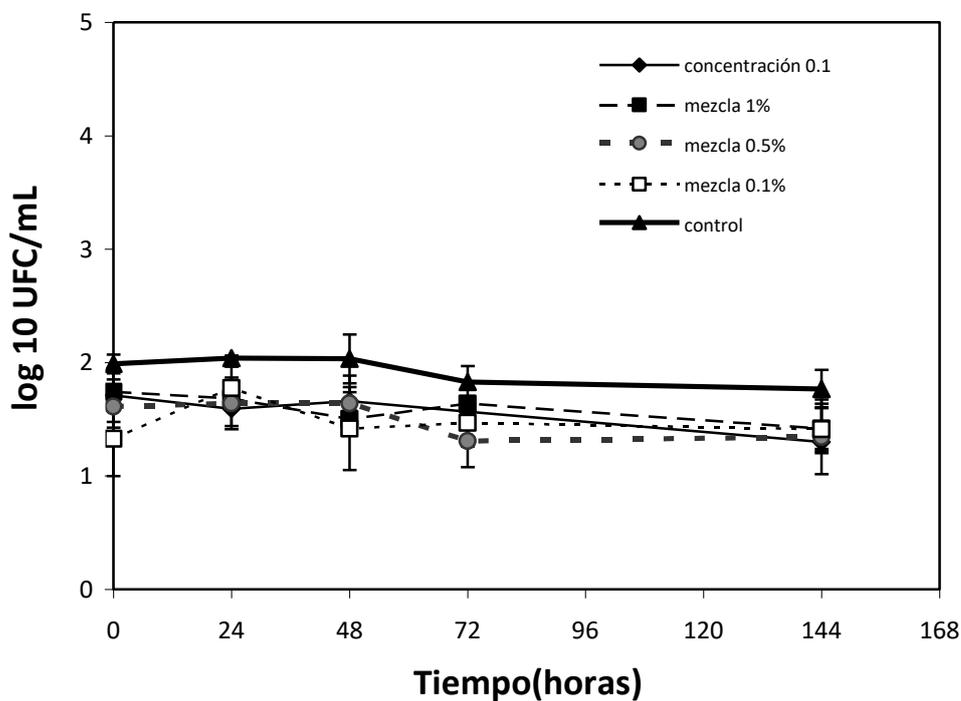
Al poner los trozos de carne en contacto con una solución con extracto y ácido acético se obtienen recuentos estadísticamente distintos al control.

En este experimento al aumentar a la solución de 0.1g/mL de extracto, ciertas concentraciones de ácido acético, se logra una mayor reducción que las obtenidas con 0.05 g/mL de extracto y sus combinaciones con ácido acético (Tabla 8 y tabla 9A de anexos). Por lo tanto se comprueba el efecto sinérgico del ácido acético con los componentes del extracto vegetal y se infiere que es mejor utilizar una concentración de 0.1g/mL con ácido acético para reducir *E.coli* O157:H7 en carne de res.

Al tiempo 0 en la gráfica 5 se observa que la mezcla de extracto con 0.1% de ácido acético fue uno de los tratamientos que lograron la mayor reducción de UFC comparado con los demás.

La interacción entre tratamiento y tiempo no tuvo efecto significativo.

Gráfica 5. Comportamiento de *E.coli* O157:H7 ante 0.1g/mL de extracto solo y combinado con tres concentraciones de ácido acético en cinco horas.



Se sabe que los ácidos orgánicos causan daños subletales en bacterias Gram-negativas y que su viabilidad es menor (Alakomi, 2007), es por eso que en la gráfica 5 se observa que la tendencia en la población microbiana al utilizar cualquier tratamiento es a morir, en comparación con el control en la que el crecimiento no tiene disminuciones drásticas.

6.6 Evaluación del efecto bactericida de tres concentraciones de ácido acético sobre *S. Typhimurium*.

Todos los tratamientos utilizados contra *E.coli* O157:H7 se utilizaron con *S. Typhimurium* para comparar la efectividad tanto del ácido acético como del extracto y sus mezclas entre los dos microorganismos.

De los recuentos obtenidos se realizó un análisis estadístico (tabla 6A de anexos y tabla 9) para obtener la diferencia mínima significativa (DMS) de los efectos de tres concentraciones de ácido acético en cinco periodos de tiempo.

Tabla 9. Comparación de medias de UFC de *S.Typhimurium* al utilizar tres concentraciones de ácido acético.

Concentración de extracto	Media de log UFC/mL
Control	2.27 ^a
Ácido acético 0.1%	2.09 ^b
Ácido acético 0.5%	2.07 ^b
Ácido acético 1%	1.77 ^c

Las medias con letra distinta son significativamente diferentes, DMS= 0.075

Las concentraciones de ácido acético utilizadas tienen efecto antimicrobiano y reducen la población de microorganismos en comparación con el control. Se considera a 1%v/v la concentración más efectiva por tener la media de UFC más baja.

La concentración de ácido acético es proporcional a la reducción de microorganismos debido a que al utilizar concentraciones del 2% al 4% de ácidos orgánicos se miden reducciones de 1.5 log en trozos de carne inoculada

con *S. Typhimurium*, aún en refrigeración (Harris *et al.* 2006), comparada con la reducción obtenida de 0.5 log al utilizar 1% de ácido acético en este estudio.

Existe significancia estadística en la interacción concentración-hora, los resultados se encuentran en la tabla 10.

Tabla 10. Comparación de medias de UFC de *S. Typhimurium* en tres concentraciones de ácido acético durante cinco periodos de tiempo.

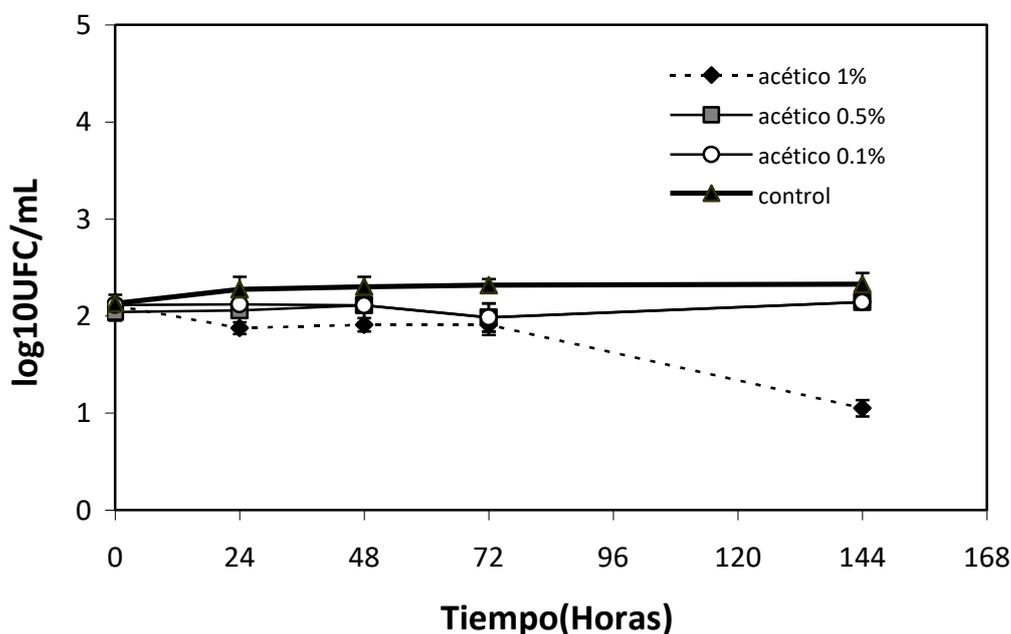
Concentración		acético		
Tiempo(horas)	Control	1%	acético0.5%	acético 0.1%
0	2.13 ^d	2.10 ^a	2.04 ^c	2.11 ^b
24	2.28 ^b	1.88 ^c	2.06 ^c	2.13 ^a
48	2.30 ^a	1.91 ^b	2.11 ^b	2.11 ^b
72	2.32 ^a	1.91 ^b	1.98 ^d	1.98 ^c
144	2.19 ^c	1.05 ^d	2.14 ^a	2.14 ^a

Error estándar= 0.02640

En los resultados de la interacción hora-concentración al usar ácido acético se observan semejanzas a lo largo del tiempo, lo que indica que los microorganismos pueden desarrollarse aún al haber tenido contacto con estas concentraciones de ácido.

El comportamiento de la población que se sometió a un tratamiento con ácido acético es distinto al control, en el que se observa una tendencia creciente (gráfica 6) y las sometidas a un tratamiento con ácido acético se mantienen o disminuyen.

Gráfica 6. Comportamiento de *S. Typhimurium* ante tres concentraciones de ácido acético.



Esto puede ser causa de que las moléculas de ácido acético penetran la membrana celular, acidifican el citoplasma e inactivan ciertas enzimas sensibles al ácido (Hirshfield *et al.* 2003), afectando el metabolismo y desarrollo del microorganismo.

En la gráfica 6 a la hora 144 cuando se utiliza una concentración de ácido acético 1%v/v hay una disminución que no se observa con los otros tratamientos; esto pudo ocurrir por el crecimiento de bacterias del ácido láctico, las cuales contribuyeron a la muerte de *S. Typhimurium*. Estas bacterias pueden estar presentes como flora natural de la carne y se desarrollan en medios con un pH bajo; el metabolismo de estas bacterias les permite fermentar azúcares y producir cantidades elevadas de ácido láctico que inhibe el crecimiento de otros microorganismos (Ingraham, 1998).

6.7 Evaluación del efecto antimicrobiano de 0.05 g/mL de extracto vegetal sólo y combinado con tres concentraciones de ácido acético sobre *S. Typhimurium*.

El objetivo de combinar ácido acético y extracto vegetal es provocar un mayor efecto antimicrobiano del extracto potenciado por el ácido acético. En este caso se utilizaron tres concentraciones de ácido acético y 0.05g/mL de extracto.

De los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico (tabla 7A de anexos y tabla 11) para obtener la diferencia mínima significativa (DMS) de los efectos de tres concentraciones de ácido acético y sus mezclas con extracto en cinco periodos de tiempo.

Tabla 11. Comparación de medias de UFC de *S. Typhimurium* de 0.05g/mL de extracto sólo y con tres concentraciones de ácido acético.

Concentración de extracto	Media de log UFC/mL
Control	2.02 ^a
Extracto 0.05g/mL	1.58 ^b
Extracto 0.05g/mL + 0.1% ácido acético	1.48 ^{bc}
Extracto 0.05g/mL + 0.5% ácido acético	1.40 ^c
Extracto 0.05g/mL + 1% ácido acético	1.19 ^d

Las medias con letra diferente son significativamente diferentes DMS = 0.0125

En este estudio se infiere que el tratamiento más efectivo fue 0.05g/mL de extracto más ácido acético al 1% pues su efecto es estadísticamente diferente al de los demás y que al mezclar el extracto con el ácido se aumenta el efecto antimicrobiano, pues se reduce en mayor cantidad la población de

microorganismos. En otros estudios se han probado distintos ácidos orgánicos (cítrico, acético, láctico y propiónico) con compuestos aromáticos presentes en extractos vegetales, sin embargo se determinó que eran más efectivos cuando se utilizaban por separado (Nazer *et al.* 2005).

Existe significancia en la interacción hora y concentración. Los resultados se encuentran en la tabla 12.

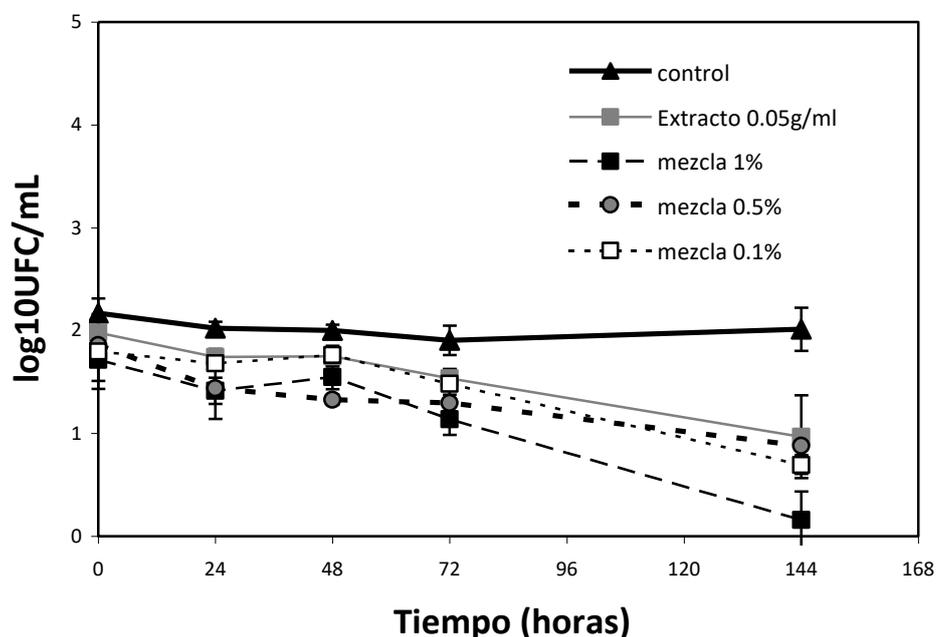
Tabla 12. Comparación de medias de UFC de *S.Typhimurium* en durante cinco periodos de tiempo.

Concentración					
	control	0.05g/mL ex	0.05g/mL ex+ 1%ac.	0.05g/mL ex+ 0.5%ac.	0.05g/mL ex+ 0.1%ac.
Tiempo(horas)					
0	2.17 ^a	1.98 ^a	1.72 ^a	1.86 ^a	1.79 ^a
24	2.02 ^b	1.74 ^b	1.41 ^d	1.44 ^b	1.68 ^b
48	2.00 ^b	1.75 ^b	1.55 ^b	1.33 ^c	1.76 ^a
72	1.90 ^c	1.53 ^c	1.14 ^c	1.30 ^c	1.48 ^c
144	2.01 ^b	0.97 ^d	0.16 ^c	0.88 ^d	0.69 ^d

Las medias con letra diferente son significativamente diferentes Error estándar= 0.0442

En la gráfica 7 se observa que la tendencia de la población en la carne que fue sometida a algún tratamiento es a morir; esto se refuerza con los resultados de la tabla 12, pues las medias más bajas se obtienen a las 144 h.

Gráfica 7 Comportamiento de *S. Typhimurium* ante 0.05 g/mL de extracto vegetal sólo y mezclado con tres concentraciones de ácido acético.



Todos los tratamientos provocan una reducción en la población inoculada, comparada con el control, esto puede ser por el daño a la membrana que causan sustancias presentes en el extracto, dado que en otros estudios se ha probado que los ácidos orgánicos presentes en extractos vegetales desestabilizan la membrana exterior de *S. Typhimurium* actuando como agentes permeabilizantes (Alakomi *et al.* 2007), permitiendo la entrada de sustancias que desequilibran el metabolismo de la célula.

6.8 Efecto antimicrobiano de 0.1 g/mL de extracto vegetal sólo y combinado con tres concentraciones de ácido acético sobre *S. Typhimurium*.

De los recuentos obtenidos se realizó un análisis estadístico (tabla 8A de anexos y tabla 13) para obtener la diferencia mínima significativa (DMS) de los

efectos de 0.1 g/mL de extracto vegetal y tres concentraciones de ácido acético en cinco periodos de tiempo.

Tabla 13. Comparación de medias de UFC de *S.Typhimurium* en 0.1g/mL de extracto solo y mezclado con tres concentraciones de ácido acético.

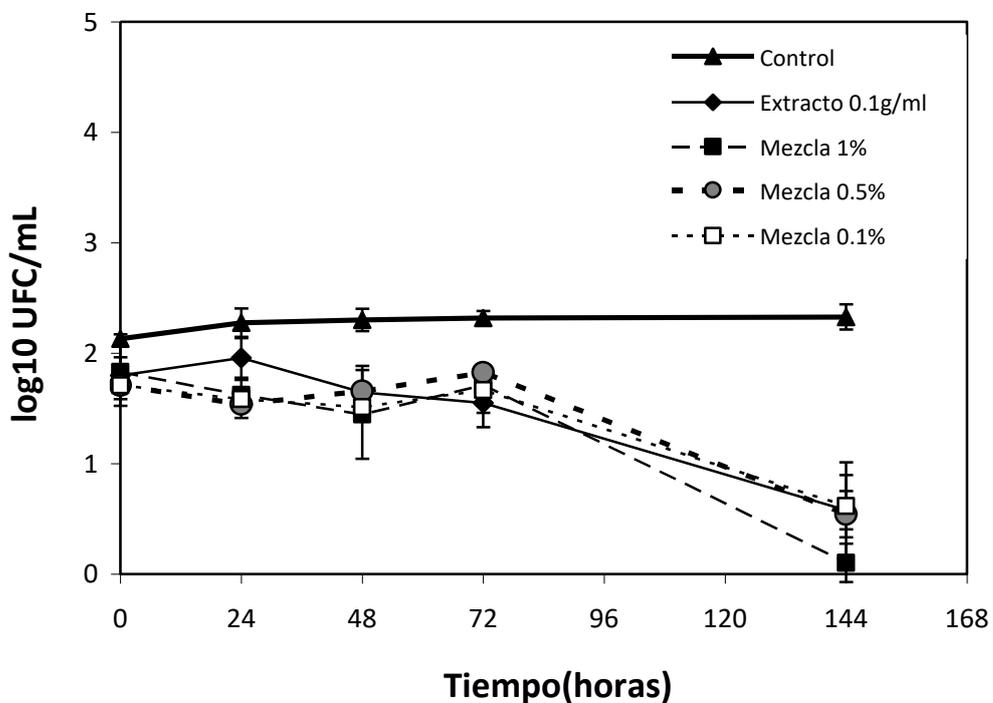
Concentración de extracto	Media de log UFC/mL
Control	2.27 ^a
Extracto 0.1g/mL	1.50 ^b
Extracto 0.1g/mL+ 0.5% ácido acético	1.45 ^{bc}
Extracto 0.1g/mL+0.1%ácido acético	1.43 ^{bc}
Extracto 0.1g/mL+1%ácido acético	1.34 ^c

Las medias con letra diferente son significativamente diferentes DMS= 0.14

En la gráfica 8 se observa que las medias de log UFC/mL de los trozos de carne que recibieron un tratamiento, fueron menores a las del control, esto significa que el extracto y las mezclas con ácido acético poseen efecto antimicrobiano contra *S. Typhimurium*, además que su efecto es estadísticamente distinto al obtenido con el control (Tabla 13).

Se considera que el tratamiento más efectivo es la mezcla de 0.1g/mL de extracto con 1% de ácido acético pues logró una reducción de 1.73 log UFC/mL; ésta reducción es similar a la obtenida con altas concentraciones de ácido acético (2 a 4%) (Harris *et al.* 2006), por lo tanto el uso de extractos vegetales como el utilizado en esta investigación combinado con tratamientos convencionales puede ser una alternativa en tratamientos de descontaminación de carne de res (Zhou *et al.* 2007).

Gráfica 8. Comportamiento de *S. Typhimurium* ante 0.1 g/mL de extracto y su combinación con tres concentraciones de ácido acético en cinco periodos de tiempo.



La tendencia de la población cuando se sometió a un tratamiento es a morir (gráfica 6), en comparación con el control que mantiene un comportamiento estable, lo que indica que los tratamientos utilizados provocan daños irreversibles en las células inoculadas.

Existe significancia entre la interacción hora-concentración, y los resultados se encuentran en la tabla 14

Tabla 14. Comparación de medias de UFC de *S.Typhimurium* en 0.1 g/mL de extracto sólo y mezclado con tres concentraciones de ácido acético durante cinco periodos de tiempo.

Concentración	0.1g/mL+1%				
	Control	0.1g/mL	ac.	0.1g/mL+0.5%ac.	0.1g/mL+0.1%ac.
Tiempo(horas)					
0	2.13 ^c	1.80 ^b	1.83 ^a	1.71 ^b	1.71 ^a
24	2.28 ^a	1.96 ^a	1.62 ^c	1.54 ^d	1.58 ^b
48	2.30 ^a	1.64 ^c	1.44 ^d	1.66 ^c	1.51 ^c
72	2.32 ^a	1.55 ^d	1.71 ^b	1.82 ^a	1.66 ^a
144	2.20 ^b	0.58 ^e	0.10 ^e	0.54 ^e	0.61 ^d

Error estándar= 0.04994

Las reducciones en los log UFC/mL a lo largo del tiempo indican que el efecto antimicrobiano del extracto y sus mezclas con ácido acético permanece en la carne.

VII. CONCLUSIONES

- El extracto vegetal obtenido fue capaz de reducir la población de *E. coli* y *S. Typhimurium* en carne cruda de res, de forma proporcional a la concentración utilizada.
- La mezcla de extracto vegetal y ácido acético presentó un efecto sinérgico en la reducción de la población de microorganismos y fue más efectiva que el observado con el extracto y ácido acético por separado.
- La mayor reducción de *E.coli* O157:H7 se obtuvo con la mezcla de ácido acético al 0.1% y 0.1g/mL de extracto.
- El mejor tratamiento antimicrobiano para *S. Typhimurium* es la mezcla de 1% de ácido acético y 0.1 g/mL de extracto.
- Es posible considerar el uso de extractos vegetales junto con ácidos orgánicos como alternativas de descontaminación de carne cruda de res.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahn, J., Grün, I., Mustapha, A., (2007). Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*. 24:7-14 Consultado en línea en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WFP-4JX9MPH-2&_user=10&_coverDate=02%2F28%2F2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_searchStrId=1579720676&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=8cde5b667beb900cdd194b5c9356d97e&searchtype=a el 14 de diciembre del 2010
2. Alakomi, H. (2007). Weakening of the Gram-negative bacterial outer membrane. *VTT Publications*. Consultado en línea en: <http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2007/P638.pdf> . Consultado el 10 de diciembre 2010
3. Alakomi, H., Pimiä-Puupponen, R., Aura, A., Helander, M., Nohynek, L. (2007). Weakening of *Salmonella* with selected microbial metabolites of berry derived phenolic compounds and organic acids. *J. Agric.Food Chem.*, 55:3905-3912
4. Bailey, H., Cavallito, C. (1944). Allicin, the Antibacterial Principle of *Allium sarivum*. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action. *J. Am. Chem. Soc.* 66: 1950-1951
5. Berry, D., Cutter, C., (1999). Effects of Acid Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on Efficacy of Acetic Acid Spray Washes to Decontaminate Beef Carcass Tissue. *Applied and Enviromental Microbiology*, 66:1493-1498
6. Bower, K., Schilke, F., Daeschel, M. (2003). Antimicrobial Properties of Raisins in Beef Jerky Preservation. *Journal of Food Science*, 68:1484-1489.
7. Chen, H., Zuo, Y., Deng, Y. (2001). Separation and determination of flavonoids and other ohenolic compounds on cranberry juice by high perfomance liquid chromatography. *J. Chromatography*, 93:387-385
8. Conner, D., Kotrola, J. (1995). Growth and survival of *Escherichia coli* under acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol*, 61:382-385.
9. Cutter, C. (2000). Antimicrobial Effect of Herb Extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium Associated with Beef . *Journal of Food Protection*, 63: 601-607.
10. Davies, A., Board, R. (1998). The microbiology of meat and poultry . *Thomson Science London* Consultado en línea en:

http://books.google.com.mx/books?id=w3adQSPSrD8C&printsec=frontcover&dq=microbiology+meat&hl=es&ei=ZaJ0TJPol5H2swPxyPTwBQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q&f=false

Consultado el 14 septiembre del 2010.

11. Dorsa, W., Cutter, C., Siragusa, G. (1997) Effects of Acetic Acid, Lactic Acid and Trisodium Phosphate on the Microflora of Refrigerated Beef Carcass Surface Tissue Inoculated with *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua*, and *Clostridium sporogenes*. *Journal for Food Protection*. 60(619:624)
 12. Fernández, E. (2000). Microbiología e inocuidad de los alimentos. *Universidad Autónoma de Querétaro*.
 13. Forrest, A., Judge, H. (1979). Fundamentos de la ciencia de la carne. España : *Acribia*
 14. García, B. García F. (2006). Higiene e inspección de carnes. *Ediciones Díaz de Santos*. España 261-269. Consultado en línea en: http://books.google.com.mx/books?id=aOuMC7Dm59kC&printsec=frontcover&dq=Higiene+e+Inspecci%C3%B3n+en+carnes&hl=es&ei=wD aTKrgMpDSsAOgj6GxBw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CDoQ6AEwAQ#v=onepage&q=Higiene%20e%20Inspecci%C3%B3n%20en%20carnes&f=false
- Consultado el 23 de agosto del 2010
15. Giroux, M., Outtara, B., Yefsah, R., Smoragiewicz, W., Saucier, L., Lacroix, M. (2001). Combined Effect of Ascorbic Acid and Gamma Irradiation on Microbial and Sensorial Characteristics of Beef Patties during Refrigerated Storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49:919-925.
 16. Harris, K., Miller, M., Loneragan, G., Brashears, M. (2006) Validation of the Use of Organic Acids and Acidified Sodium Chlorite To reduce *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in Beef Trim and Ground Beef in a Simulated Processing Environment. *Journal of food Protection* 69:1802-1807 Consultado en línea en: <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2006/00000069/0000008/art00005> el 14 de diciembre del 2010
 17. Hayouni, A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. And *Schinus molle* L. Essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125:242-251
 18. Hirshfield, I., Terzulli, S. (2003). Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Science Progress*. 86: 245-269

19. Ingraham, J.L, Ingraham, C. (1998). Introducción a la microbiología. Ed. Reverté. Barcelona. 159-162 Consultado en línea el 2 de septiembre del 2010: http://books.google.com.mx/books?id=dUEZSXaz2UC&printsec=frontcover&dq=Introducci%C3%B3n+a+la+m microbiolog%C3%ADa&hl=es&ei=EgTaTOnmJouCsQPWI5X1Bw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q=Salmonella&f=false
20. Institute of Medicine U.S (2002) *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef:review of a draft risk assessment.
21. Jay, J. (2002) A Review of Aerobic and Psychrotrophic Plate Count Procedures for Fresh Meat and Poultry Products. *Journal of Food Protection*, 65 : 1200-1206
22. Katikou, P., Ambrodiasis, D., Georgantelis, P., Koidis P., Georgakis, S. (2005). Effect of Lactobacillus-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1303-1313).
23. Kerry, J., Ledward, D. (2002). Meat processing Improving Quality. England: *Woodhead Publishing Limited*.
24. Kim, D.O., Lee, C.Y. (2005). HPLC Separation of polyphenolics. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, Unit 11.3 (R.E. Wrolstad, T.E: Acree, E:A: Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S:J: Schwartz, C.F. Shoemaker, D.M. Smith and P. Sporns, eds.), *John Wiley & Sons*, Hoboken.
25. Leyer, G., Wang, L-L., Johnson, E. (1995) Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic fppds. *Appl Environ Microbiol*, 61:3752-3755
26. Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2002). Brock Biología de los Microorganismos. *Pearson Education* Madrid.
27. Maillard, J. (2002). Bacterial target sites for biocide action, *J Appl Microbiol*, 92:16-27:
28. Mendoza, A. (2008). Efecto antimicrobiano del extracto de un vegetal sobre microorganismos de importancia en alimentos. *UAEH*
29. Mohamed, B., Jamilah, k., Abbas, R.(2008) A Review on Some Organic Acids Additives as Shelf Life Extenders of fresh Beef Cuts. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 3:566-574. Consultado en línea en

30. Naidu, A.S. Natural food antimicrobial systems (2000). *CRC Press*.US
31. Nazer, A., Kobilinsky, A., Tholozan, J.L., & Dubois-Brissonnet, F. (2005). Combination of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Thyphimurium: a synergistic effect?. *Food Microbiology*, 22:391:398
32. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67:593:656
33. Paulus, W. (1993). Microbicides for the protection of materials a handbook. *Chapman & Hall*, London
34. Peter., K. (2004). Handbook of Herbs and Spices. Woodhead Publishing. Vol.2 Cambridge England.
35. Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*, 10:12-26
36. Price, F., Schweigert, B. (1994). Ciencia de la Carne y de los Productos cárnicos. España : *Acribia*.
37. Ranken, M.D. (2000). Handbook of Meat Product Technology [versión electrónica]. *Blackwell Publishing*. Versión disponible en http://knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=18998_VericalID=0 Consultado el 3 de julio del 2009
38. Roldán, M., Chinen, J., Otero, L., Miliwebsky, N., Alfaro, N. (2007) Aislamiento y caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. *Rev. Argent. Microbiol.* 39 Consultado en línea en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-75412007000200012&script=sci_arttext&tlnq=pt Consultado el 11 de diciembre del 2010.
39. Russell, J. (2003). Effectively Treating Carcasses. *The National Provisioner* ,217:56-59
40. Saïdana, D., Mahjoub, S., Boussaada, O., Chriaa, J., Mahjoub, A., Chéraif, I., Daami, M., Mighri, Z., Helal, N. (2007). Antibacterial and Antifungal Activities of the Essential Oils of Two Saltcedar Species from Tunisia. *Journal of American Chemical Society*, 85:817-126
41. Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry. Oxford: Pergamon Press*, 30: 3875-3883

42. Tegos, G, Stermitz, F., Lomovsaka, O., Lewis, K. (2002). Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46:3133-3141
43. Theron, M., Lues, F. (2007). Organic Acids and Meat Preservation: A Review. *Food Reviews International*, Taylor & Francis 23 (141-158).
44. Varnam, H. A. (1998). Carne y productos cárnicos, Tecnología Química y Microbiología. España : Acribia
45. Wan, T., Lin, C., Sakata, R. (2007). Effect of organic acids on the microbial quality of Taiwanese-style sausages. *Animal Science Journal*, 78 :407-412.
46. Wen-Xiang, D., Carl, O., Bustillos, R., McHugh, T. (2008) Storage Stability and Antibacterial Activity against *Escherichia coli* O157:H7 of Carvacrol in Edible Apple Films Made by Two Different Casting Methods. *J. Agric. Food Chem*, 56:3082-3088
47. Xujian, Q., Wu, V. (2007). Evaluation of *Escherichia Coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus Aureus* in ground beef with cranberry concentrate by thin agar layer method. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 15:282-294
48. Yin Mei-Chin, Wen-shen Cheng. (2001). Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science*, 63:23-28
49. Zhou, F., Ji, B., Zhang, H. Jiang, H., Yang, Z., Li, J. (2007). Synergistic Effect of Thymol and Carvacrol Combined with Chelators and Organic Acids against *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Food Protection*. 70:1704-1709 Consultado en línea en: <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2007/00000070/00000007/art00022> el 14 de diciembre del 2010

ANEXOS

Tabla1A. Análisis de varianza para *E.coli* O157:H7 con dos concentraciones de extracto.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr F
Concentración	2	0.99	0.49	8.50	0.0025
Tiempo	2	1.36	0.68	11.74	0.0005
Interacción concentración-tiempo	4	0.08	0.02	0.33	0.8522

Coeficiente de variación = 21.32

Tabla 2A. Análisis de varianza para log UFC de *S. Typhimurium* con dos concentraciones de extracto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr F
Concentración	2	0.19	0.09	4.15	0.0257
Tiempo	4	2.13	0.53	23.21	0.0001
Interacción concentración-tiempo	8	1.04	0.13	5.66	0.0002

Coeficiente de variación= 8.21

Tabla 3A. Análisis de varianza para UFC de *E. coli* O157:H7 en tres concentraciones de ácido acético.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr F
Concentración	3	1.90	0.47	12.26	0.0001
Hora	4	0.82	0.21	5.31	0.0012
Interacción concentración-tiempo	16	0.57	0.04	0.93	0.5464

Coeficiente de variación 5.781

Tabla 4A. Análisis de varianza para UFC de *E.coli* O157:H7 en 0.05g/mL de extracto vegetal y tres combinaciones con ácido acético.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr F
Concentración	3	1.34	0.33	7.38	0.0001
Tiempo	4	1.02	0.25	5.61	0.0008
Interacción concentración-tiempo	16	3.10	0.19	4.27	0.0001

Coeficiente de variación 10.749

Tabla 5A. Análisis de varianza para UFC de *E.coli* O157:H7 en 0.1g/mL de extracto vegetal y tres combinaciones con ácido acético.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr F
Concentración	3	1.89	0.47	12.26	<0.0001
Hora	4	0.82	0.21	5.31	0.0012
Interacción concentración-tiempo	16	0.57	0.036	0.93	0.5464

Coefficiente de variación 12.21

Tabla 6A. Análisis de varianza para UFC de *S. Typhimurium* en tres concentraciones de ácido acético

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr F
Concentración	3	1.94	0.65	61.79	0.0001
Hora	4	0.30	0.07	7.06	0.0002
Interacción concentración-hora	12	1.92	0.16	15.33	0.0001

Coefficiente de variación = 4.9880

Tabla 7A. Análisis de varianza para UFC de *S. Typhimurium* en 0.05g/mL de extracto vegetal y tres combinaciones con ácido acético.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr F
Concentración	4	5.86	1.46	49.94	0.0001
Tiempo	4	7.91	1.98	67.49	0.0001
Interacción concentración-tiempo	16	2.52	0.16	5.37	0.0001

Coefficiente de variación 11.183

Tabla 8A. Análisis de varianza para log de *S. Typhimurium* en 0.1g/mL de extracto y tres combinaciones con ácido acético

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr F
Concentración	4	8.59	2.15	57.36	0.0001
Tiempo	4	11.24	2.81	75.07	0.0001
Interacción concentración-tiempo	16	4.23	0.26	7.07	0.0001

Coefficiente de variación 12.077

Tabla 9A. Comparación de medias de UFC de *E. coli* O157:H7 entre el efecto de todos los tratamientos utilizados al tiempo 0

Tratamiento	Media de log UFC
Control en el experimento de 0.05g/mL mezclado con ácido acético	178.00 ^a
0.05g/mL de extracto en el experimento con ácido acético	118.33 ^b
0.05 g/mL de extracto con 0.5% de ácido acético	107.33 ^{bc}
Ácido acético 0.1%	105.00 ^{bc}
Control del experimento de 0.1g/mL de extracto con ácido acético	98.33 ^{bc}
Ácido acético 0.5%	93.33 ^{bc}
0.05g/mL de extracto con 0.1% de ácido acético	87.00 ^c
0.05g/mL de extracto con 1% de ácido acético	83.33 ^{dc}
Ácido acético 1%	56.67 ^{dc}
0.1g/mL de extracto con 1% de ácido acético	56.00 ^{de}
0.1 g/mL de extracto	56.00 ^{de}
0.1 g/mL de extracto con 0.5% de ácido acético	43.67 ^{fe}
Control en la comparación entre dos concentraciones de extracto	32.00 ^{gfe}
0.05 g/mL de extracto en el experimento de comparación de concentraciones	27.33 ^{gf}
0.1 g/mL de extracto con 0.1% de ácido acético	25.00 ^{gf}
0.1g/mL de extracto en el experimento de comparación de concentraciones	9.33 ^g

Tabla 10A.Comparación de medias de UFC de *S. Typhimurium* entre el efecto de todos los tratamientos utilizados al tiempo 0

Tratamiento	Media de log UFC
Control en el experimento de comparación de concentraciones	188.00 ^a
Control en el experimento de 0.05g/mL de extracto	152.97 ^{ab}
Control en el experimento de 0.1 g/mL de extracto	135.00 ^{cb}
Ácido acético 0.1%	132.67 ^{cb}
Ácido acético 1%	128.00 ^{cdb}
Ácido acético 0.5%	111.33 ^{dceb}
0.1g/mL de extracto en experimento de comparación de concentraciones	108.33 ^{dceb}
0.05g/mL de extracto en experimento con ácido acético	96.00 ^{dcef}
0.05g/mL de extracto en experimento de comparación de concentraciones	83.33 ^{def}
0.05g/mL de extracto con 0.1% de ácido acético	75.67 ^{ef}
0.1g/mL con 1% de ácido acético	75.33 ^{ef}
0.05g/mL de extracto con 0.5% de ácido acético	74.00 ^{ef}
0.1g/mL de extracto en experimento con ácido acético	65.67 ^{ef}
0.05g/mL con 1% de ácido acético	56.00 ^f
0.1g/mL con 0.5% de ácido acético	54.33 ^f
0.1 g/mL de extracto con 0.1% de ácido acético	51.67 ^f