

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO FENÓLICO DE
HOJAS DE OLIVO (*Olea europaea L.*) VAR. SEVILLANA
SOBRE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS DE
LA CARNE DE RES FRESCA MAGRA”**

TESIS

Presentada por:

Bach. KERLY ALEXIS CAMPOS MONTENEGRO

Para Optar el Título Profesional de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TACNA - PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TESIS

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO FENÓLICO DE HOJAS DE OLIVO
(*Olea europaea* L.) VAR. SEVILLANA SOBRE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS
DE LA CARNE DE RES FRESCA MAGRA”**

Sustentada y aprobada el 18 de julio del 2016, siendo el jurado calificador:

PRESIDENTE:


.....
Dra. Liliana Lanchipa Bergamini

SECRETARIO:


.....
MSc. Enrique De Florio Ramirez

VOCAL:


.....
MSc. Marcial Castillo Cohaila

ASESOR:


.....
Mgr. Nicolás Sequeiros Flores

Dedicatoria:

Con todo el amor del mundo a mis padres:
Elías Samuel Campos Fustamante y Edis
Claribel Montenegro Chamaya; a mi
hermana y a toda mi familia, por su cariño,
apoyo incondicional, paciencia y confianza.

A todos mis amigos, en especial para mis
amigas Edith S. F. y Magaly F. A., quienes
me dieron su apoyo y consejos para no
desistir.

A Mayte M.V., por su amor y apoyo, en esos
momentos en que necesite de su ayuda.

Agradecimientos:

A Dios por darme la oportunidad de compensar con una alegría el esfuerzo y la confianza que familia y amigos pusieron en mí.

A mi asesor Msc. Nicolás Sequeiros Flores, por su amistad, su apoyo y consejos en el desarrollo y culminación de la presente tesis.

Al Dr. César J. Cáceda Q., Prof. Edwin D. Obando V., Prof. Leonardo Espillico C.; por su apoyo, sugerencias y recomendaciones durante el desarrollo de la investigación.

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1	Planteamiento del problema	17
1.2	Formulación del problema.....	19
1.3	Delimitación del problema.....	19
	1.3.1. Delimitación temporal.....	19
	1.3.2. Delimitación espacial	19
	1.3.3. Delimitación teórica.....	20
1.4	Justificación.....	20
1.5	Limitaciones	21
1.6	Objetivos.....	22
	1.6.1 Objetivo general.....	22
	1.6.2 Objetivos específicos.....	22

CAPÍTULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1	Conceptos generales y definiciones.....	24
	2.1.1 Olivo.....	24
	2.1.2 Hojas de olivo.....	25
	2.1.3 Extracto de hojas de olivo.....	26

2.1.4	Compuestos fenólicos de la hoja de olivo.....	28
2.1.5	Mecanismo de acción antimicrobiana de los compuestos fenólicos.....	31
2.1.6	Oleuropeína.....	32
2.1.7	Hidroxitirosol.....	33
2.1.8	Carne de res.....	34
2.1.9	Contaminación bacteriana de carne de res.....	36
2.1.10	Bacterias aerobias mesófilas.....	37
2.1.11	Conservantes alimentarios.....	41
2.1.12	Condiciones aceleradas de conservación.....	43
2.2	Enfoque teórico – técnicos.....	44
2.2.1	Extracción hidroalcohólica o maceración.....	44
2.2.2	Determinación del contenido de fenoles totales.....	44
2.2.3	Recuento de bacterias aerobias mesófilas.....	46
2.3	Marco referencial.....	48
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES		
3.1	Hipótesis.....	52
3.1.1	Hipótesis de la investigación.....	52
3.1.2	Hipótesis nula.....	52
3.1.3	Hipótesis específicas.....	52
3.2	Variables.....	53

3.2.1	Identificación de variables.....	53
3.2.2	Indicadores de variables.....	54
3.3	Operacionalización de variables.....	55
3.4	Matriz de consistencia.....	56
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		
4.1	Tipo de investigación	57
4.2	Población y muestra.....	57
4.3	Materiales y métodos.....	58
4.3.1	Materiales.....	58
4.3.2	Métodos.....	61
CAPÍTULO V: TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS		
5.1.	Técnicas aplicadas en la recolección de la información.....	81
5.2.	Resultados.....	83
5.1.1.	Obtención del extracto fenólico de hojas de olivo.....	83
5.1.2.	Análisis microbiológico.....	85
5.3.	Discusión de resultados.....	108
CONCLUSIONES.....		115
RECOMENDACIONES.....		117
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Compuestos fenólicos del extracto de hojas de olivo var. Arbequina.....	27
Tabla 2.	Clasificación de los compuestos fenólico.....	29
Tabla 3.	Cortes magros de carne de res y contenido de grasa total para 100 g de carne.....	35
Tabla 4.	Géneros de bacterias aerobias más frecuentes aislados en carnes frescas.....	39
Tabla 5.	Límite permisible de colonias de bacterias aerobias mesófilas de algunos alimentos.....	40
Tabla 6.	Reactivos y volúmenes para determinar la curva de calibración y para la muestra de extracto fenólico de hojas de olivo.....	67
Tabla 7.	Distribución de muestras de carne.....	70
Tabla 8.	Balance de materia prima durante el proceso de extracción.....	83
Tabla 9.	Recuento de BAM de la réplica A durante las 5 horas de tratamiento.....	86

Tabla 10.	Recuento de BAM de la réplica B durante las 5 horas de tratamiento.....	90
Tabla 11.	Recuento de BAM de la réplica C durante las 5 horas de tratamiento.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Oleuropeína.....	33
Figura 2.	Diagrama de flujo de la obtención del extracto fenólico de hojas de olivo	61
Figura 3.	Diagrama procedimental para el tratamiento con extracto de hojas de olivo a muestras de carne de res fresca.....	68
Figura 4.	Muestra de carne sumergida en extracto de hojas de olivo a determinada concentración.....	71
Figura 5.	Agua peptonada tamponada.....	75
Figura 6.	Reducción de tamaño de sub muestras.....	76
Figura 7.	Inoculación en el centro de la placa petrifilm.....	78
Figura 8.	Recuento de colonias de bacterias aerobias mesófilas..	79
Figura 9.	Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a los 10 min post tratamiento – Réplica A.....	87
Figura 10.	Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a las 3 horas post tratamiento – Réplica A.....	88
Figura 11.	Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a las 5 horas post tratamiento – Réplica A.....	89

Figura 12.	Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a los 10 min post tratamiento – Réplica B.....	90
Figura 13.	Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a las 3 horas post tratamiento – Réplica B.....	91
Figura 14.	Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a las 5 horas post tratamiento – Réplica B.....	92
Figura 15.	Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a los 10 min post tratamiento – Réplica C.....	93
Figura 16.	Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a las 3 horas post tratamiento – Réplica C.....	94
Figura 17.	Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a las 5 horas post tratamiento – Réplica C.....	95
Figura 18.	Recuento de BAM respecto al tiempo de tratamiento correspondiente a la réplica A.....	96
Figura 19.	Recuento de BAM respecto al tiempo de tratamiento correspondiente a la réplica B.....	97
Figura 20.	Recuento de BAM respecto al tiempo de tratamiento correspondiente a la réplica C.....	98
Figura 21.	Medias marginales – Recuento de bacterias aerobias mesófilas vs. Concentración de extracto de hojas de olivo a los 10 minutos post tratamiento.....	102

Figura 22.	Medias marginales – Recuento de bacterias aerobias mesófilas vs. Concentración de extracto de hojas de olivo a las 3 horas post tratamiento.....	106
Figura 23.	Medias marginales – recuento de bacterias aerobias mesófilas vs. Concentración de extracto de hojas de olivo a las 5 horas post tratamiento.....	108

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.	Recomendaciones de uso de placas petrifilm.....	131
ANEXO 2.	Guía de interpretación para el recuento de bacterias aerobias.....	133
ANEXO 3.	Constancia de asesoramiento para el desarrollo de los análisis microbiológicos.....	137
ANEXO 4.	Lecturas de absorbancia y determinación de la concentración de BAM por interpolación de valores.....	138
ANEXO 5.	Base de datos para análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento.....	140
ANEXO 6.	Tabla ANOVA del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento.....	141
ANEXO 7.	Tabla de homogeneidad de varianzas del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento.....	142
ANEXO 8.	Prueba de Tukey del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento....	143
ANEXO 9.	Subconjuntos homogéneos del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento.....	144

ANEXO 10.	Base de datos para análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento.....	145
ANEXO 11.	Tabla ANOVA del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento.....	146
ANEXO 12.	Tabla de homogeneidad de varianzas del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento.....	147
ANEXO 13.	Prueba de Tukey del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento.....	148
ANEXO 14.	Subconjuntos homogéneos del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento.....	149
ANEXO 15.	Tabla ANOVA del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 5 horas post tratamiento.....	150

RESUMEN

La presente investigación tiene por objetivo, determinar el efecto antimicrobiano del extracto fenólico de hojas de olivo, en adelante EFHO, sobre las bacterias aerobias mesófilas, en adelante BAM, presentes en carne de res fresca magra. Para la primera parte del desarrollo de la investigación, será necesario obtener un extracto fenólico a partir de hojas de olivo; utilizando para ello el método de extracción hidroalcohólica y determinando la cantidad de fenoles totales presentes en la solución mediante el método de Folin - Ciocalteu. Una vez obtenido el extracto fenólico, se evalúa su poder antimicrobiano; para ello se tratan muestras cárnicas con el extracto por un determinado periodo de tiempo, dentro del cual se les realizan análisis microbiológicos usando el método oficial AOAC 990.12: Recuento de bacterias aerobias en placas petrifilm.

Los resultados, permiten concluir que el EFHO posee propiedades antimicrobianas.

Palabras clave: extracto fenólico, hojas de olivo, fenoles, oleuropeína, antimicrobiano, bacterias aerobias mesófilas, carne de res.

ABSTRACT

This research aims to determine the antimicrobial effect of phenolic extract of olive leaves, hereinafter EFHO, on mesophilic aerobic bacteria, hereinafter BAM, present in fresh beef lean. For the first part of the development of research, you must obtain a phenolic extract from olive leaves; by using the hydroalcoholic extraction method and determining the amount of total phenolics present in the solution by the Folin – Ciocalteu method. once obtained the phenolic extract, its antimicrobial power is evaluated; for this purpose meat samples are treated with the extract for a given period of time, into which microbiological analyzes were performed using the AOAC 990.12 official method: aerobic bacteria count on Petrifilm plates.

The results allow concluding that the EFHO has antimicrobial properties.

Keywords: phenolic extract, olive leaves, phenols, oleuropein, antimicrobial, aerobic mesophilic bacteria, beef.

INTRODUCCION

La conservación de los alimentos es un tema de gran importancia en la industria alimentaria; actualmente, existe gran variedad de agentes antimicrobianos utilizados para lograr este objetivo, los cuales están supeditados a ser utilizados en cantidades mínimas para evitar efectos adversos al ser consumidos; a este problema se suma la demanda de los consumidores por adquirir alimentos con ingredientes lo más naturales posibles; lo que sugiere utilizar otros medios antimicrobianos.

Por lo anterior, el presente estudio intenta demostrar el poder antimicrobiano del EFHO sobre las BAM presentes en carne de res, mediante tratamientos con tres concentraciones diferentes del extracto. En teoría, debido a la presencia de compuestos fenólicos en la hoja de olivo, el extracto obtenido a partir de esta materia prima debería de actuar como antimicrobiano.

El estudio presenta dos etapas. En la primera, se buscará obtener el extracto fenólico de hojas de olivo por medio del método hidroalcohólico, y la segunda etapa comprende el tratamiento de muestras cárnicas con el extracto fenólico y su posterior análisis

microbiológico, con lo cual se podrán obtener conclusiones respecto al poder antimicrobiano del EFHO.

El principal método de análisis, que responde directamente al objetivo general, es el método AOAC 990.12: Recuento de bacterias aerobias mesófilas usando placas petrifilm. Otro método utilizado y que juega un papel importante en la presente investigación es la determinación del contenido de fenoles utilizando el reactivo Folin - Ciocalteu, el cual permitirá determinar la cantidad de fenoles presentes en el EFHO concentrado y por ende en cada una de las tres diluciones utilizadas para el tratamiento.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

Ibañez F., Torres P. e Irigoyen A. (2003) afirman: “Los microorganismos (bacterias, levaduras y mohos) son la principal causa del deterioro de los alimentos”. “Este deterioro microbiano puede producir pérdidas económicas sustanciales, tanto para la industria alimentaria así como para distribuidores y usuarios consumidores” (Castillo J., Ruíz C., 2014). “Se sabe con certeza que más del 20 % de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos” (Peña E., 2013). Hoy en día se usan en su mayoría aditivos sintéticos para proteger a los alimentos tanto de cambios químicos, como de ataques microbiológicos. La realidad local precisa que se busquen alternativas, ya que el expendio de alimentos en la mayoría de mercados de abastos se realiza sin control de temperaturas. Rubio M., Braña D. y Méndez R. (2012) indican que: “El expendio a temperatura ambiente reduce sustancialmente la seguridad alimentaria de la carne; a este proceso se le llama venta de carne caliente”.

En los últimos años, se ha originado una cierta presión social para reducir el uso de aditivos químicos en la industria alimentaria (González A., 2010). Esta presión ha hecho que aumente el interés por la investigación y el uso de agentes antimicrobianos naturales. Dentro de estos los más estudiados son los que se encuentran presentes en hierbas y especias (García R. y Palou E., 2008).

Como desecho de la industria del aceite y producto de la poda, se obtiene gran cantidad de hojas que actualmente no poseen aplicaciones tecnológicas económicamente viables. Las hojas del olivo poseen un interesante y amplio perfil de polifenoles, siendo la oleuropeína el principal compuesto fenólico presente. (Urzua C., 2015)

Precisamente la necesidad de proteger los alimentos, dejando de lado el uso de aditivos químicos y utilizando para ello productos naturales, los cuales tienen escasa rentabilidad como es el caso de las hojas de olivo, es lo que propicia el presente estudio.

1.2 Formulación del problema

¿Qué efecto tendrá el extracto fenólico de las hojas de olivo (*Olea europaea L.*) var. sevillana sobre las bacterias aerobias mesófilas de la carne de res fresca magra?

1.3 Delimitación de la investigación

1.3.1 Delimitación Temporal

La investigación se llevó a cabo en un periodo de 4 meses; iniciando en agosto del 2015 y finalizando en noviembre del 2015.

1.3.2 Delimitación espacial

Las hojas de olivo (*Olea europaea L.*) var. sevillana se obtuvieron de la Cooperativa 28 de agosto, parcela 13, zona de La Yarada departamento de Tacna. La carne de res fresca magra fue adquirida en el Mercado Grau de la ciudad de Tacna.

El trabajo experimental respecto a la obtención del extracto fenólico se realizó en el laboratorio de Tecnología

Pesquera de la Escuela de Ingeniería Pesquera (ESIP) y lo referente a la evaluación del efecto microbiológico del extracto sobre carne de res, se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias (FACI).

1.3.3 Delimitación teórica

La investigación se centrará en analizar el efecto del EFHO sobre BAM. Para ello se realizarán tratamientos a muestras de carne de res con tres concentraciones de extracto fenólico diluido; y se analizará el efecto del extracto sobre las colonias microbianas aerobias utilizando el método oficial AOAC 990.12: Recuento de colonias aerobias en placas petrifilm (Anexo 1) y la guía de interpretación dada por la empresa 3M Microbiology fabricantes de las placas petrifilm (Anexo 2).

1.4 Justificación

La conservación de los alimentos ha sido una tarea de capital importancia para el ser humano desde la alborada de la humanidad (Barreiro, J. y Sandoval A., 2006); por lo que cualquier estudio destinado a este fin es de vital importancia.

Se justifica el desarrollo del trabajo ya que origina un punto de partida para realizar investigaciones posteriores que permitan aunar esfuerzos en post de la obtención de un nuevo conservante alimentario natural; lo que supondría un gran impacto socioeconómico; ya que, y justificando su uso como materia prima para esta investigación, las hojas de olivo que actualmente no tiene un uso rentable, tendrían un valor económico agrícola e industrial si se lograra impulsar la elaboración y comercialización de un nuevo conservante; además no solo la carne, si no los alimentos tratados con este producto tendrían un valor agregado desde el punto de vista sanitario. Todo esto conllevaría a que tanto en el sector agrícola como empresarial alimentario de Tacna se creen puestos de trabajos directos e indirectos; beneficiando también a los consumidores, asegurando para ellos alimentos con mejor calidad sanitaria dejando de lado conservantes sintéticos.

1.5 Limitaciones

Debido a que se utiliza la hoja del olivo, materia prima poco estudiada, es que nos encontramos con escasas investigaciones referenciales; por lo que los procedimientos de obtención y

aplicación serán adaptaciones de diferentes investigaciones sobre extractos de hojas con componentes similares a la hoja de olivo.

Otra limitación fue el tiempo de disponibilidad de los laboratorios, motivo por el cual se tuvo que buscar la forma de realizar los análisis microbiológicos en tiempos cortos; siendo uno de los motivos por los cuales se optó por trabajar en condiciones de conservación aceleradas y usar placas petrifilm como método para el recuento de colonias.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del EFHO (*Olea europaea L.*) var. sevillana sobre las bacterias aerobias mesófilas de carne de res fresca magra.

1.6.2 Objetivos específicos

- Determinar el contenido de fenoles totales presentes en el EFHO.

- Determinar la concentración de EFHO, que presente la acción más efectiva contra bacterias aerobias mesófilas en carne de res fresca magra.
- Evaluar el comportamiento del poder antimicrobiano del EFHO durante el tiempo de tratamiento.

CAPÍTULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Conceptos generales y definiciones

2.1.1 Olivo

El olivo, *Olea europaea L.*, es un árbol perteneciente a la familia Oleaceae. Dentro de esta existen 29 géneros diferentes y unas 600 especies. Presenta dos subfamilias: Oleoideae y Jasminoideae. El olivo pertenece a la primera, Oleoideae, que comprende otros géneros con interés agronómico como *Fraxinus* (fresno), *Syringa* (lilo), *Ligustrum* (aligustre). La especie con mayor importancia económica y la única que se utiliza como alimento es el olivo (Ramírez M., 2001).

La superficie mundial cultivada de olivos alcanza las 8 885 450 ha (Ticona W., 2013). Es el cultivo más importante en Tacna, con 10 987 ha, con rendimientos de 4 306 kg/ha (Ministerio de Agricultura y Riego. Anuario Producción agrícola 2013-MINAGRI. 2013).

Veciana C. (2013) afirma que, cada árbol de olivo da lugar a unos 7 kg de residuos durante la poda, compuestos de ramas y hojas. Las hojas de olivo se generan también durante la recogida y separación de la aceituna y se considera como una fuente natural de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

2.1.2 Hojas de olivo

Usaquen S. (2008) afirma: “Las hojas de olivo son simples, de forma lanceolada y bordes enteros; verde oscuras por el haz, con un característico brillo debido a la existencia de una gruesa cutícula” y; “por el envés presenta una coloración gris, debido a la presencia de tricomas peltados que le confieren la vellosidad característica” (Quezada L. et al., 2005).

Tabera J. et al. (2005) señala: “la hoja de olivo es un subproducto del olivar (...) del que actualmente se obtiene escasa rentabilidad”. Por su parte Quirantes R. (2012) aporta que, solo en la poda se producen 25 kg de

ramas y hojas por árbol al año, y que las hojas suponen un 5 % del peso de las aceitunas recolectadas para la producción de aceite de oliva.

2.1.3 Extracto de hojas de olivo

Los extractos hidroalcohólicos obtenidos del olivo y derivados, son ricos en compuestos fenólicos (Tabla 1). Entre ellos se encuentran: principalmente el hidroxitirosol ($C_8H_{10}O_3$), oleuropeína ($C_{25}H_{32}O_{13}$), tirosol ($C_8H_{10}O_2$), ácido gálico ($C_7H_6O_5$), ácido cafeico ($C_9H_8O_4$). En general el componente mayoritario de los extractos de hoja de olivo es la oleuropeína, también son abundantes las referencias relacionadas con el hidroxitirosol, que se considera el principal compuesto derivado de la oleuropeína con una capacidad antioxidante superior (Veciana C., 2013).

Tabla 1*Compuestos fenólicos del extracto de hojas de olivo var. arbequina.*

Componente	Porcentaje (%)		
	Extracción alcohol/agua	Extracción con prensa	Extracción supercrítica
Hidroxitirosol	0,4	7,3	6,2
Hidroxitirosol glicósido	0,8		
Ácido vanílico hexóxido	0,3		
Ácido cafeico hexóxido	0,4		
Oleósido	1,5	0,9	0,1
Ácido clorogénico	0,3		
Pinoresinol	0,8		
Verbascósido	3,0	15,7	7,1
Ligustrósidoagliconadecarboximetil	0,6		
Luteolina – O – rutinósido	2,2		
Acetoxipinoresinol	1,6		
Luteolina – 7 – glicósido	2,2	2,7	1,2
Hesperidina - rutina	2,2		
Quercetina – 3 – O – galatósido e isoquercetina	1,1		
Oleuropeína	29,1	0,8	6,7
Ácido oleurósido – 10 – carboxílico	8,2		
Oleurósido	13,2	0,8	2,3
Ligustrósido	1,5	0,5	1,8
Luteolina – 3 – 7 – diglicósido	1,6		
Quercetina	1,1	0,8	

Fuente: Jiménez P. (2010).

2.1.4 Compuesto fenólicos de la hoja de olivo

Los compuestos fenólicos constituyen una de las familias más numerosas y ampliamente distribuidas en el reino vegetal, con más de 8 000 estructuras actualmente conocidas. Tienen un anillo aromático en común, con uno o más grupos hidroxilos. Estos compuestos pueden ser divididos en varios grupos de acuerdo con su estructura química básica (Vélez M. y Villa N., 2012). En la Tabla 2 se puede observar la clasificación de los principales compuestos fenólicos de acuerdo con su estructura química.

Entre las funciones de los compuestos fenólicos del olivo, cabe destacar la defensa natural frente a ataques de patógenos. El mecanismo de defensa frente a algunos patógenos (bacterias, microhongos e insectos) exhibido en el olivo por estos compuestos, se debe a los complejos componentes fenólicos del grupo secoiridoides, como la oleuropeína y el ligustrósido (Morillo J., 2007).

Tabla 2*Clasificación de los compuesto fenólicos*

Estructura Carbonatada	Clasificación
C6	Fenoles simples, benzoquinonas
C6 – C1	Ácidos fenólicos
C6 – C2	Ácido feniácético, acetofenoles
C6 – C3	Ácido hidroxicinámico, polipropano, cumarina, isocumarina
C6 – C4	Naftoquinona
C6 – C1 – C6	Xantanos
C6 – C2 – C6	Antraquinona, estilbeno
C6 – C3 – C6	Flavonoides, isoflavonas
(C6 – C3) ²	Lignatos, neolignato
(C6 – C3 – C6) ²	Bioflavonoides
(C6 – C3) ⁿ	Ligninas
(C6) ⁿ	Melanoidinas
(C6 – C3 – C6) ⁿ	Taninos

Fuente: Vélez M. y Villa N. (2012).

Ticona W. (2013) menciona: “La composición cuantitativa de compuestos fenólicos en el olivo, es el resultado de una compleja interacción entre diversos

factores, incluyendo el clima, grado de maduración, cultivo, secado de la planta, etc.”.

Con respecto a sus propiedades fisicoquímicas, Serra B. (2002) menciona que los fenoles son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, pero con puntos de ebullición altos. Son incoloros, no obstante se oxidan con facilidad dependiendo de la exposición a la luz, al aire y a la presencia de impurezas metálicas. La mayor parte de los fenoles son poco solubles en agua.

Los componentes fenólicos de la hoja de olivo no presentan problemas de toxicidad para los seres humanos. Con el afán de reforzar este enunciado, se cita a Gonzáles M. (2005), quien menciona que un extracto comercial de pulpa de olivo (HIDROX®) que contiene 60 mg/g de componentes fenólicos es reconocido por la FDA (Food and Drug Administration) como seguro para su uso alimentario en humanos.

2.1.5 Mecanismo de acción antimicrobiana de los compuestos fenólicos

García R. y Palou E. (2008) en su estudio sobre mecanismos de acción antimicrobiana de compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol, menciona que, se reconoce que los compuestos activos de las plantas, hierbas y especias son compuestos fenólicos. Los aceites y extractos de plantas principalmente de clavo, orégano, tomillo y algunos otros, presentan actividad inhibitoria contra ciertos microorganismos de importancia en alimentos. El mecanismo de acción se da sobre algunas partes de la célula en donde ocurren los siguientes efectos: daño a la membrana citoplasmática, degradación de la pared celular, daño a las proteínas, filtración del contenido celular, coagulación de citoplasma y disminución de la fuerza motriz. Algunas investigaciones señalan que la pérdida de la funcionalidad de la membrana es sólo una parte de la explicación de la actividad antimicrobiana que presentan dichos agentes o componentes.

2.1.6 Oleuropeína (C₂₅H₃₂O₁₃)

Fue descubierta y nombrada por Bourquelot y Vintilesco en 1908. La oleuropeína puede alcanzar concentraciones muy elevadas en materia seca de hoja y de olivas jóvenes, siendo fácil de extraer de la fracción fenólica de hojas y frutos (González C., 2009).

La oleuropeína pertenece al grupo de los secoiridoides, que son uno de los principales compuestos de los fenoles (Ólea, 2013). Es un glucósido esterificado con un alcohol fenilpropanoide (hidroxitirosol + ácido elenólico + glucosa) tal como se muestra en la figura 1. Es el componente fenólico mayoritario de la pulpa de las aceitunas verdes y las hojas de olivo. (Veciana C., 2013).

Este compuesto disminuye el crecimiento de esporas de *Bacillus cereus* (Hennen W., 2000), siendo este microorganismo uno de los principales agentes que provoca brotes entéricos en Europa y que se ha encontrado en platos preparados con carne contaminada (Elika, 2013). Las concentraciones bajas de oleuropeína

también retardan el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Hennen W., 2000).

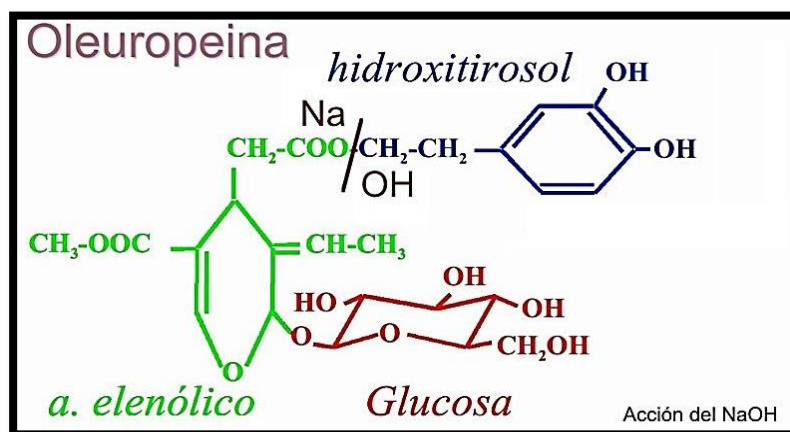


Figura 1. Oleuropeína

Fuente: <http://www.datuopinion.com/oleuropeina>

2.1.7 Hidroxitirosol (C₈H₁₀O₃)

Entre los compuestos fenólicos del olivo se encuentra el (3,4 - dihidroxifenil) etanol, más conocido como hidroxitirosol (González M., 2005). Se presenta como fenol simple o esterificado con el ácido elenólico para formar oleuropeína aglicona. El hidroxitirosol presenta una elevada actividad antioxidante. (Veciana C., 2013). Este sencillo compuesto fenólico se encuentra en gran cantidad en la hoja de olivo (Ticona W., 2013).

El hidroxitirosol es un buen agente antimicrobiano contra bacterias patógenas en seres humanos entre ellas *Salmonella spp.* (Ferrant M., 2015)

2.1.8 Carne de res

Parte de la canal o carcasa formado por el tejido blando que rodea a la estructura ósea, músculos, tejido conectivo (tendones y aponeurosis), vasos, y nervios (NTP 201.018.2001).

Se entiende por carne magra al conjunto de masas musculares, una vez desprovista de la grasa de cobertura (Norma Mexicana – FF- 081 - 2003).

En la tabla 3, se indican algunos cortes magros realizados a la carcasa de res; entre ellos se menciona al chambarete u ossobuco, corte con el cual se llevará a cabo la presente investigación, ya que permite trabajar con muestras de espesor y diámetro similar debido a la forma circular del corte, manteniendo la homogeneidad tanto en tratamientos como en los análisis.

Tabla 3

Cortes magros de carne de res y contenido de grasa total para 100 g de carne

Corte	Grasa saturada (g)	Grasa total (g)
Bistec y cuete en trozos	1,4	4,0
Bistec de punta de lomo lateral	1,6	4,1
Asado y bistec de centro	1,6	4,6
Asado bistec de contracara	1,7	4,9
Bistec de aguayón	1,9	4,9
Pecho de res	1,9	5,1
Chambarete u ossobuco	1,9	5,4
Corazón de paleta en trozos	1,8	5,7
Asado y bistec de punta de lomo central	2,1	5,8
Bistec de paleta	1,9	6,0
Bistec de pulpa	2,2	6,0
Bistec de lomo	2,3	6,0
Paletilla	2,6	6,1
Falda	2,6	6,3
Bistec de pierna	3,0	8,2

Fuente: Departamento de Agricultura de los EE.UU. (USDA). Servicio de Investigación Agrícola, 2005.

2.1.9 Contaminación bacteriana de la carne de res

La carne se halla expuesta a la contaminación microbiana desde el momento en que se desangra al animal hasta el momento de su consumo. Suele encontrarse, en la piel y en la canal, los mismos microorganismos bacterianos entre ellos *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* y *Pseudomónas*. La contaminación puede ocurrir también durante las demás operaciones de manejo a que se someta posteriormente la carne, tales como la refrigeración, congelación, industrialización, empacado, etc. (Arguedas P., 1998); debido a la gran variedad de fuentes de contaminación, los tipos de microorganismos que suelen encontrarse en las carnes son muchos y muy variables. La contaminación de canales bovinos, después del sacrificio y enfriamiento es variable y puede ser constituida de 10^1 - 10^5 mesófilos aerobios por cm^2 . Los contaminantes más comunes de las canales son bastones Gram- negativos y micrococcos, incluidas *Pseudomónas spp.*, *Moraxella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Flavobacterium spp.*, entre otras. Siendo la contaminación muy variable pueden incluirse

patógenos como *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterolítica/pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum* (Restrepo D. et al., 2001). Las *Pseudomonas* y las bacterias del grupo *Moraxella/Acinetobacter* son habitualmente los microorganismos aerobios presentes en las microbiota de la carne. (Mateauda J., 2013)

2.1.10 Bacterias aerobias mesófilas

Grupo heterogéneo de bacterias capaces de crecer entre 15 y 45 °C con un rango óptimo de 35 °C (Argüello J., 2010). Su presencia en los alimentos puede estar relacionada directamente con la manipulación, la frescura o la descomposición del producto y su temperatura de conservación (Venegas et. al., 1990).

Según Restrepo, D. et al., 2001, entre algunas alteraciones a la carne desencadenadas en condiciones de aerobiosis tenemos:

- Mucosidad superficial: producidas por *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*.
- Modificaciones en el color: Puede variar a verde, pardo o gris, como consecuencia de la producción de oxidantes por parte de bacterias especialmente de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*.
- Modificaciones sufridas por las grasas (enranciamiento): producidas por especies lipolíticas como *Pseudomonas* y *Bacillus*.
- Olores y sabores extraños: Por el crecimiento bacteriano en la superficie de la carne y es el primer síntoma de alteración. Los géneros de bacterias involucrados en esta alteración son *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Microbacterium* y *Lactobacillus*

Los géneros de bacterias aerobias mesófilas que con mayor frecuencia se aíslan durante el proceso de alteración de carne de res, se señalan en la tabla 4.

Tabla 4

Géneros de bacterias aerobias mesófilas más frecuentes aislados en carnes frescas

Género	Reacción de Gram	Frecuencia
		X: se sabe ocurre XX: indicado con más frecuencia
Acinetobacter	-	XX
Aeromonas	-	XX
Alcaligenes	-	X
Bacillus	+	X
Corynebacterium	+	X
Enterococcus	+	XX
Escherichia	-	X
Flavobacterium	-	X
Lactobacillus	+	X
Lactococcus	+	X
Leuconostoc	+	X
Listeria	+	X
Microbacterium	+	X
Moraxella	-	XX
Pseudomónas	-	XX
Salmonella	-	X
Serratia	-	X
Staphylococcus	+	X
Yersinia	-	X

Fuente: Jay J. (2000).

En la tabla 5 se indica el límite permisible de bacterias aerobias mesófilas en alimentos considerados de alto riesgo; entre ellos figura la carne de res.

Tabla 5

Límite permisible de colonias de bacterias aerobias mesófilas de algunos alimentos

Alimento	Límite ufc/ g o ml	
	m	M
Leche	2×10^4	5×10^4
Carne bovina	10^5	10^7
Pescado fresco	5×10^5	10^6
Crustáceos frescos	5×10^5	10^6
Huevo frescos	10	10^2
Mayonesa	10^4	5×10^4

Fuente: NTS N° 071-. MINSA/DIGESA-V.01.

En el recuento de bacterias aerobias mesófilas se estima la microflora total, sin especificar los tipos de microorganismos. Los resultados del recuento, refleja la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación y las condiciones higiénicas de la materia prima. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica ni asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas; de la

misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena (Serrano D., 2014).

2.1.11 Conservantes alimentarios naturales

Pineda M. (2003) afirma: “Los conservantes son sustancias que se añaden a los productos alimentarios para protegerlos de la alteraciones biológicas como fermentaciones, enmohecimiento y putrefacciones. Los conservantes deben reunir los siguientes requisitos: no ser tóxicos ni perjudiciales en las dosis añadidas, no descomponerse en productos tóxicos, no deben utilizarse para enmascarar ingredientes o alimentos en mal estado y deben de ser de fácil identificación analítica.”

Rodríguez E. (2011) menciona que los conservadores se adicionan con el propósito de controlar el crecimiento de microorganismos (bacterias y hongos) y pueden ser químicos (artificiales) o naturales. A pesar de que la mayor parte de los conservadores usados en alimentos son de origen químico, existen productos de origen natural provenientes de plantas. El uso de aditivos

alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y a su garantía sanitaria. Esto se logra manteniendo los costos de formulación, procesamiento o comercialización. Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen en:

- Origen animal, incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosán.
- Origen vegetal, incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas.
- Origen microbiano, incluye compuestos producidos por microorganismos.

2.1.12 Condiciones aceleradas de conservación

Para algunos productos alimenticios, determinar la vida de anaquel, significa tenerlos bajo estudio varios meses, razón por la cual se utilizan pruebas aceleradas para obtener resultados rápidos. En una prueba acelerada se modifica uno o más de los factores responsables del deterioro del alimento como son la temperatura, la humedad, la luz y el oxígeno. En estas pruebas, es importante considerar que todos los microorganismos tienen una temperatura óptima, mínima y máxima de crecimiento, esto significa que a determinada temperatura la velocidad de duplicación (o la velocidad de crecimiento poblacional) es mayor. Las pruebas aceleradas han sido muy útiles en la industria de alimentos para determinar la estabilidad en anaquel de productos que al evaluarlos en condiciones ambientales llevaría mucho tiempo (Morales A., 2007).

2.2 Enfoques Teórico – Técnicos

2.2.1 Extracción hidroalcohólica o maceración

La extracción hidroalcohólica se llevará a cabo según lo realizado por Ortuño M. (2006), quien describe que este procedimiento se opera por extracción de la planta (generalmente seca) con una disolución de alcohol en agua del 25 al 50 %. La planta triturada se mezcla con la disolución alcohólica y se conserva en un recipiente, en un lugar fresco y oscuro. El líquido debe cubrir totalmente el material vegetal. Periódicamente se agita el recipiente para homogeneizar la mezcla. Pasado el tiempo previsto se cuela y filtra el extracto que se envasa y se almacena en forma adecuada.

2.2.2 Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método de Folin – Ciocalteu aplicado por Trujillo M. (2010); quien realizó la cuantificación utilizando una curva estándar de ácido gálico (0 – 20 µg/ml). Como variante, en el presente estudio se

reemplazó el ácido gálico por ácido tánico. La curva de calibración se realizó a diferentes concentraciones de ácido tánico (AT) a partir de una solución estándar de 0,1 mg/ml (de 20 a 100 μ l). Los volúmenes se completaron a 0,5 ml con la cantidad correspondiente de agua destilada. Para la reacción colorida, se agregaron 250 μ l del reactivo de Folin - Ciocalteu 1 N; finalmente, se añadieron 1 250 μ l de una solución de carbonato de sodio al 20 % y se dejó reposar por 2 horas. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 725 nm. Para la determinación de compuestos fenólicos en la muestra se tomaron 500 μ l de extracto, por lo que no se adicionó agua, se mezcló con 250 μ l de reactivo Folin - Ciocalteu, posteriormente se adiciona 1 250 μ l de carbonato de sodio al 20 %, se dejó reposar en oscuridad por 2 h y finalmente se realizó la lectura espectrofotométrica a 725 nm. El valor obtenido de la muestra se interpoló con la curva estándar de ácido tánico previamente realizada. El contenido de fenoles totales se expresó en microgramos equivalente de ácido tánico por ml de extracto (μ g EAT/ml).

2.2.3 Recuento de bacterias aerobias mesófilas

Se lleva a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante, 3M Petrifilm™ AC, (Anexo 1); que a su vez se basa en el método oficial AOAC 990.12.

Se señalan pues cuatro pasos generalizados. El primero se refiere a la preparación de la muestra, donde se indica el modo de preparar una dilución 10^{-1} , se deberá pesar una cantidad de muestra en una bolsa Stomacher o cualquier otro contenedor estéril, luego se adiciona la cantidad apropiada de diluyente estéril para llegar a la dilución requerida. Este diluyente estéril puede ser: tampón Butterfield, agua peptonada, diluyente de sal peptonada, buffer de agua peptonada, solución salina, caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada; procurando no utilizar buffers que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato de sodio. Una vez añadido el diluyente se homogeniza la muestra mediante métodos usuales. En la presente investigación a partir de esta dilución (10^{-1}) se pueden obtener diluciones sucesivas dependiendo de la carga microbiana con la que se

espera trabajar, para ello se usan tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada en cada uno; al primero se le añadirá 1 ml de la dilución 10^{-1} , al segundo se le añadirá 1 ml del tubo anterior y así sucesivamente. El segundo paso es la inoculación, para lo cual es necesario contar con una superficie plana donde colocar el petrifilm. Una vez posicionada la placa, se levanta la película superior de la misma y con una micropipeta perpendicular a la placa se coloca 1 ml de muestra en el centro de la película cuadriculada inferior, posteriormente se deja caer libremente la película superior sobre la dilución, para finalmente con el dispersor, el cual tiene forma de disco, se realiza una suave presión para distribuir la muestra sobre el área circular, levantamos el disco esperamos 1 minuto para que solidifique el gel e incubamos. El tercer paso es la incubación, la cual requiere colocar las placas apiladas en un máximo de 20 unidades, con la cara hacia arriba. El tiempo de incubación según el método AOAC 990.12 es de $48 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ a $35 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$. El cuarto paso es la interpretación de resultados, que se realiza utilizando una lupa si es que la

iluminación es adecuada o en todo caso un contador de colonias. Para la interpretación de resultados se utiliza la guía brindada por el fabricante del producto la cual se registra en el Anexo 2.

2.3 Marco Referencial

Jiménez P. (2010), en su tesis *“Efectos de la Adición de Extractos de Hojas de Olivo o Palto en la Estabilidad Termooxidativa de Aceites de Diferente Insaturación”*, seca las hojas en una estufa a 45 °C por 18 horas hasta obtener una humedad de 8 – 10 %. Para el proceso de obtención del extracto usa el método hidroalcohólico, donde menciona un tiempo de extracción de 24 horas (no indica la temperatura de trabajo), usa una relación agua:etanol v/v de 50:50; indica también que se deberá evaporar el extracto hasta un 50 % de su volumen inicial; pero no indica a que temperatura.

Gómez, A. et al. (2012), en la investigación *“Optimización de la Extracción de Compuestos Fenólicos Naturales a partir de Orujos de Uva”*, tiene por objetivo aumentar el rendimiento de compuestos fenólicos en el extracto de orujo de uva utilizando el

método hidroalcohólico. Extrae los componentes fenólicos a una temperatura de 40 °C. El extracto obtenido, una vez centrifugados, se somete a evaporación rotatoria a 40 °C para evaporar el etanol (no indica el tiempo de evaporación).

Alvis, A. et al. (2011), en la investigación “*Obtención de Extractos Hidro-Alcohólicos de Limoncillo (Cymbopogon citratus) como Antioxidante Natural*”, estudia la relación agua:etanol v/v en la extracción de compuestos fenólicos. Utiliza etanol de 95° (indicando que 95° representa una concentración del 100 %) y una relación de hojas/solvente de 1:20 p/v. Determinó el contenido de fenoles totales por el método Folin – Ciocalteu. Los resultados demuestran que la relación agua/etanol 50/50 v/v es la que permite obtener mayor contenido fenólico.

Roncales P. (2010), estudió los efectos de los antioxidantes y antimicrobianos de extractos de plantas para mejorar la conservación de carnes. El estudio se realizó sobre plantas como el romero y el orégano, los cuales poseen componentes fenólicos, demostrando que poseían un importante efecto inhibitor del crecimiento microbiano en carnes frescas. Estos resultados

permiten fortalecer la idea de que el extracto de hojas de olivo, al igual que el orégano y el romero, también posee la propiedad de inhibir el crecimiento bacteriano.

Robles M. (2010), en su tesis titulada "*Efecto de extractos de productos naturales para controlar la presencia de Campylobacter jejuni y Salmonella spp. en carne molida de pollo*", tiene por objetivo general, evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas in vitro sobre *Salmonella spp.* y *Campylobacter jejuni*; y probar su eficacia en carne molida de pollo contaminada artificialmente y conservada a 4 °C. Cuando se aplicó los extractos a carne molida de pollo solamente el extracto de tomillo presento efecto antimicrobiano sobre el *Campylobacter jejuni*. El poder antimicrobiano del tomillo se perdió al tercer día de tratamiento.

Lizcano A. y Vergara J. (2008), en su tesis titulada "*Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Herperomeles ferruginea, Myrciantes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos*", tiene por objetivo observar y determinar el efecto

antimicrobiano de extractos etanólicos vegetales con componentes fenólicos frente a organismos patógenos como el *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Candida albicans* y *Alternaria sp.* La conclusión a la que llega es que todos los extracto presentan poder antimicrobiano; siendo el extracto de *Passiflora manicata* el de mayor actividad antimicrobiana. Hay que señalar que trabajó con bacterias aerobias (*Bacillus subtilis*) y aerobias facultativas (*E. coli*, *S. aureus*).

Estrada S. (2010), en su tesis titulada “*Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (Rosmarinus officinalis) y tomillo (Thymus vulgaris)*”. Evalúa la acción de extractos de romero y tomillo sobre bacterias como *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y *Pseudomóna aeruginosa*. Concluye que los extractos de ambas plantas presentan actividad antibacteriana debido a componente fenólicos, frente a *S. aureus* y *Pseudomóna aeruginosa*.

CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1 Hipótesis

3.1.1. Hipótesis de la investigación (Hi)

La aplicación de extracto fenólico de hojas de olivo (EFHO) *reduce* la carga inicial de bacterias aerobias mesófilas presentes en carne de res.

3.1.2. Hipótesis nula (Ho)

La aplicación de extracto fenólico de hojas de olivo (EFHO) *no reduce* la carga inicial de bacterias aerobias mesófilas presentes en carne de res.

3.1.3. Hipótesis específicas

- H1: Al menos una de las concentraciones de EFHO utilizadas para el tratamiento de carne de res fresca magra presenta un efecto antimicrobiano significativamente superior al efecto producido por las otras dos concentraciones.

Ho: Ninguna de las tres concentraciones de EFHO utilizadas para el tratamiento de carne de res fresca magra presenta diferencias significativas en relación a su poder antimicrobiano.

- H1: El tiempo de tratamiento afectará el poder antimicrobiano del EFHO.

Ho: El tiempo de tratamiento no afectará el poder antimicrobiano del EFHO

3.2 Variables

3.2.1. Identificación de variables

a. Variable independiente

- Concentración de EFHO para el tratamiento de carne de res fresca.
- Tiempo de tratamiento.

b. Variables dependientes

- Recuento de colonias de bacterias aerobias mesófilas.

3.2.2. Indicadores de las variables

a. Indicador de la variable concentración de EFHO para el tratamiento de carne de res fresca magra:

Concentración porcentual de extracto diluido expresado en % v/v.

b. Indicador de la variable tiempo de tratamiento:

tiempo de tratamiento expresado en minutos y horas de tratamiento.

c. Indicador de la variable recuento de colonias de bacterias aerobias mesófilas:

Conteo de colonias de BAM en placa petrifilm expresado en ufc/g de muestra.

3.3 Operacionalización de variables

Título: “Evaluación del efecto del extracto fenólico de hojas de olivo (<i>Olea europaea L.</i>) var. sevillana sobre las bacterias aerobias mesófilas de la carne de res fresca magra”			
Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador
Independiente			
Concentración porcentual de EFHO	Concentración del extracto diluido, que se aplicará a cada muestra de carne de res fresca magra. Las diluciones se harán con respecto a 100 ml de extracto diluido.	10 % v/v = 10 ml de EFHO + 90 ml de agua destilada. 20 % v/v = 20 ml de EFHO + 80 ml de agua destilada. 30 % v/v = 30 ml de EFHO + 70 ml de agua destilada.	Concentración del extracto expresado en % v/v.
Tiempo de tratamiento	Tiempo durante el cual la carne se pondrá en contacto con el extracto fenólico diluido (concentración determinada). Tiempo en el cual se ha de realizar los análisis microbiológicos.	Tiempo total: 5 horas. Primer análisis microbiológico: 10 minutos. Segundo análisis microbiológico: 3 horas. Tercer análisis microbiológico: 5 horas.	Tiempo de tratamiento expresado en minutos y horas
Dependientes			
Recuento de bacterias aerobias mesófilas	Método que muestra el grado alteración de los alimentos. Calificando la calidad de la carne de acuerdo al número de colonias bacterianas contadas.	Según guía de interpretación para el recuento de bacterias aerobias en placas petrifilm (Anexo 2).	ufc/g

3.4. Matriz de consistencia

TITULO: "Evaluación del efecto del extracto fenólico de hojas de olivo (<i>Olea europaea L.</i>) var. sevillana sobre las bacterias aerobias mesófilas de la carne de res fresca magra"							
Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Población y muestra	Diseño	Técnicas e instrumentos	Estadígrafo
<p>Problema Principal</p> <p>¿Qué efecto tendrá la aplicación de EFHO var. sevillana sobre las bacterias aerobias mesófilas (BAM) presentes en la carne de res fresca magra?</p> <p>Problemas Secundarios</p> <p>a. ¿Cuál será el contenido total de fenoles del EFHO?</p> <p>b. ¿Cuál concentración tendrá la acción más efectiva contra las bacterias aerobias mesófilas de la carne de res fresca magra?</p> <p>c. ¿Qué efecto tendrá el tiempo de tratamiento sobre el poder antimicrobiano del EFHO?</p>	<p>Objetivo General</p> <p>Estudiar el efecto del extracto fenólico de hojas de olivo (<i>Olea europaea L.</i>) var. sevillana sobre las bacterias aerobias mesófilas de carne de res fresca magra.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>a. Determinar el contenido de fenoles totales presentes en el EFHO.</p> <p>b. Determinar la concentración de EFHO que presente la acción más efectiva contra bacterias aerobias mesófilas en carne de res fresca magra.</p> <p>c. Evaluar el comportamiento del poder antimicrobiano del EFH durante el tiempo de tratamiento.</p>	<p>Hipótesis General</p> <p>La aplicación de extracto fenólico de hojas de olivo (EFHO) en carne de res fresca magra <i>reduce</i> la carga de bacterias aerobias mesófilas.</p> <p>Hipótesis Nula</p> <p>La aplicación de extracto fenólico de hojas de olivo (EFHO) en carne de res fresca magra <i>no reduce</i> la carga de bacterias aerobias mesófilas.</p> <p>Hipótesis Específicas</p> <p>- H1: Al menos una de las concentraciones de EFHO utilizadas para el tratamiento de carne de res fresca magra presenta un efecto antimicrobiano significativamente superior al efecto producido por las otras dos concentraciones. Ho: Ninguna de las tres concentraciones de EFHO utilizadas para el tratamiento de carne de res fresca magra presenta diferencias significativas en relación a su poder antimicrobiano.</p> <p>- H1: El tiempo de tratamiento afectará el poder antimicrobiano del EFHO. Ho: El tiempo de tratamiento no afectará el poder antimicrobiano del EFHO.</p>	<p>Independiente</p> <p>Variable X1</p> <p>- Concentración porcentual de EFHO para el tratamiento de carne de res fresca.</p> <p>Variable X2</p> <p>- Tiempo de tratamiento.</p> <p>Dependientes</p> <p>Variable Y</p> <p>- Recuento de colonias de bacterias aerobias mesófilas.</p>	<p>Población</p> <p>Para la obtención del extracto fenólico, la población estará formada por árboles de olivo pertenecientes a una hectárea de terreno ubicado en la Cooperativa 28 de Agosto, parcela 13, zona de La Yarada.</p> <p>Para evaluar el poder antimicrobiano del EFHO en carne de res fresca magra la población estará dada por los puestos de venta de carne de res del mercado Miguel Grau de Tacna.</p> <p>Muestra</p> <p>Mediante muestreo no probabilístico, se recolectaron hojas hasta completar 250 g; tomando de 25 árboles de olivo un aproximado de 10 g de hojas.</p> <p>Para evaluar el poder antimicrobiano del EFHO en carne de res fresca magra se usa un muestreo no probabilístico; donde las muestras fueron cortes de carne de res magra tipo ossobuco, cada pieza de 250 g aproximadamente.</p>	<p>Tipo</p> <p>Experimental</p> <p>Nivel</p> <p>Correlacional Explicativo</p>	<p>Espectrofotómetro</p> <p>Método AOAC 990.12: Recuento de bacterias aerobias en placas petrífilm</p> <p>Guía de interpretación de recuento de bacterias aerobias en placas petrífilm</p>	<p>Cuadro ANOVA.</p>

CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. Tipo de investigación

La investigación es del tipo experimental y de nivel correlacional explicativo.

4.2. Población y muestra

Para la obtención del extracto fenólico, la población estará conformada por árboles de olivo pertenecientes a una hectárea de terreno ubicado en la Cooperativa 28 de Agosto, parcela 13, zona de La Yarada, con coordenadas: 18° 09' 46,3" S 70° 27' 34,2" O. La recolección se realizó durante el mes de agosto. Ureña J. (2009) indica que para un análisis foliar, se deben tomar cuatro hojas de cada uno de los árboles tratando de tomar en los cuatro puntos cardinales; y para que la muestra sea representativa se debe recolectar mínimamente 70 hojas. En este caso siguiendo un muestreo no probabilístico se recolectaron hojas hasta completar 250 g; tomando de 25 árboles de olivo un aproximado de 10 g de hojas. Para evaluar el poder antimicrobiano del EFHO en carne de

res fresca magra se usa un muestreo no probabilístico; siendo la población los puestos de venta de carne de res del mercado Miguel Grau de Tacna, y las muestras fueron cortes de carne de res magra corte ossobuco, cada pieza de 250 g aproximadamente.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1 Materiales

a. Laboratorio

- Tubos de ensayo.
- Gradillas.
- Pipetas.
- Matraces.
- Vasos de precipitado.
- Embudo de vidrio.
- Embudo Büchner.
- Bandejas espectrofotométricas 1mm de espesor.
- Placas Petrifilm™ AC.
- Bolsas estériles Stomacher.
- Mecheros.
- Lupa.

b. Otros

- Frascos de vidrio color ámbar.
- Tapers de plástico.
- Hilo.
- Papel kraft.
- Algodón.
- Tijeras.
- Cuchillo.

c. Equipos

- Secador de aire caliente: Temperatura establecida 50 °C.
- Equipo de filtración al vacío: Presión de succión producida por el motor entre 0 – 1 bar.
- Evaporador rotatorio marca IKKA. Modelo RV 05 BASIC 1-B 115V. Capacidad 1L. Rango de temperatura entre 20 – 225 °C.
- Espectrofotómetro HP UV- Vis Agilent 8453. Longitud de onda UV entre 190 - 800 nm. Longitud de onda visible entre 370 – 1 100 nm.
- Autoclave. Rango de presión entre 0 – 4 bar.

- Balanza analítica marca Ohaus Adventure AR 1 140. Capacidad de 65 – 210 g. Sensibilidad 0,1 g.
- Balanza mecánica DIAL – O – GRAM®. Capacidad 310 g. Sensibilidad 0,01 g.
- Equipo Stomacher – Homogeneizador marca Seward con un rango de velocidades de entre 75 y 300 rpm.
- Mezclador vertical VWR. Capacidad máx. 294 g. rango de velocidades entre 500 – 3 000 rpm.
- Incubadora. Temperatura constante de 35 °C.
- Refrigeradora marca INRESA modelo I450GWB1.

d. Reactivos

- Alcohol 96°.
- Carbonato de sodio anhidro.
- Ácido tánico.
- Reactivo Folin - Ciocalteu 1N.
- Peptona Merck.

4.3.2 Métodos

4.3.2.1. Diagrama de flujo para la obtención de extracto fenólico de hojas de olivo

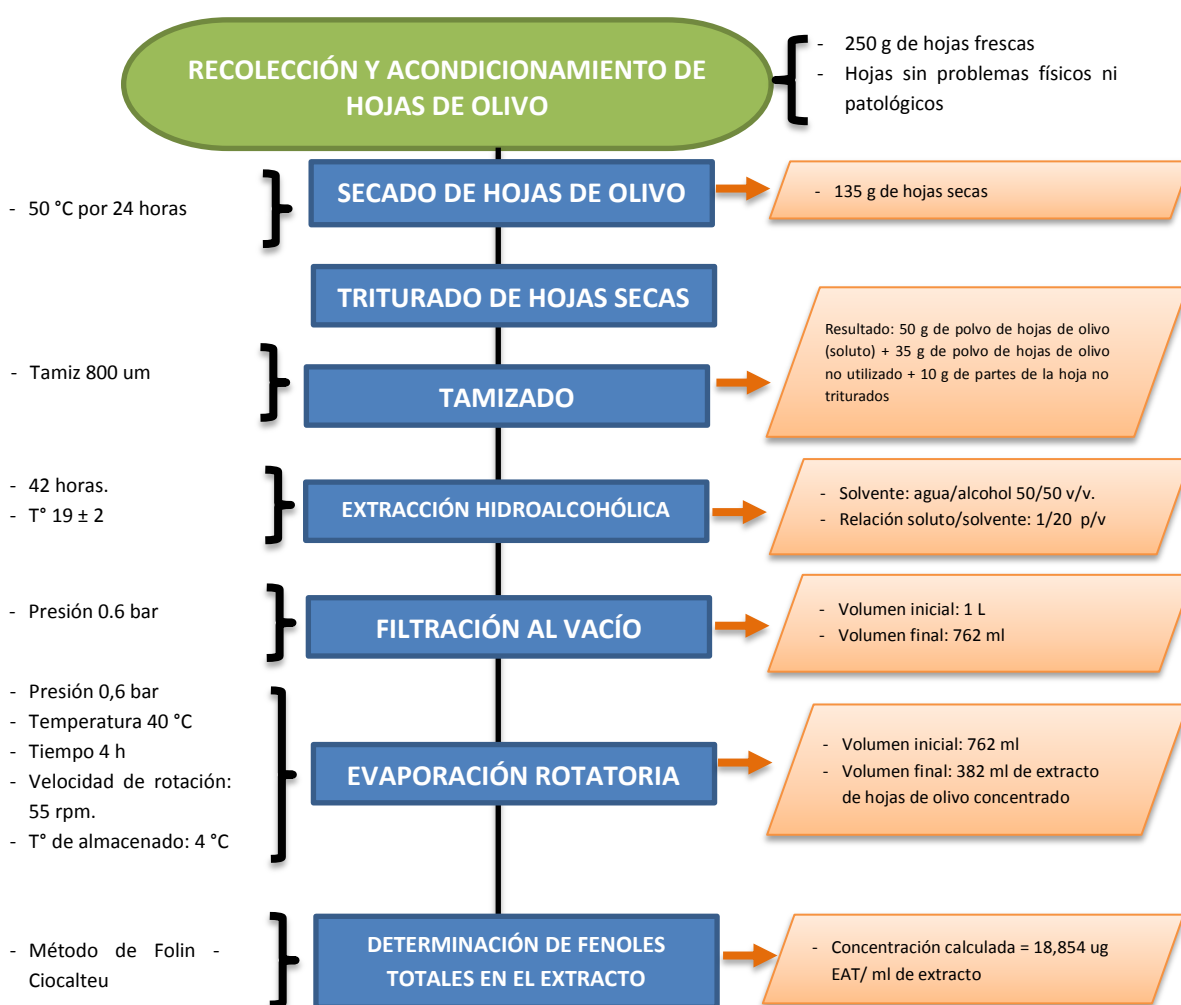


Figura 2. Diagrama de flujo de la obtención del extracto fenólico de hojas de olivo

Fuente: Elaboración propia, 2015.

a. Recolección y acondicionamiento de hojas de olivo

Se recolectaron 250 g de hojas de olivo, según lo establecido en el ítem de población y muestra; además se tomaron en cuenta técnicas usadas en laboratorios dedicados al análisis foliar; descartando hojas que presenten problemas patológicos. Terminada la recolección, las hojas fueron sometidas a lavado con agua potable, para finalmente ser secadas al aire libre (secado primario).

b. Secado de hojas de olivo con aire caliente

Se colocaron las hojas en bandejas de metal; procurando que no queden unas sobre otras para que el secado sea homogéneo. Un total de 250 g de hojas de olivo se sometieron a secado por aire caliente a 50 °C. El proceso se llevó a cabo en un tiempo de 24 h; después del cual las hojas presentaban una estructura quebradiza lo que permitió pulverizarlas.

c. Triturado

Utilizando un mortero se redujo el tamaño de las hojas hasta obtener un polvo. Algunas partes como el peciolo o la nervadura principal de las hojas no pudieron ser trituradas, no siendo este ningún problema ya que serían eliminadas en el proceso de tamizado.

d. Tamizado

Se llevó a cabo con un tamiz de 800 μm . Se tamizó el material triturado y se separaron 50 g de polvo fino de hojas de olivo que será usado para la preparación de 1L de extracto; pues la relación hojas: solvente establecida por bibliografía es de 1:20 p/v.

e. Extracción hidroalcohólica

En un vaso de precipitado de 1L se preparó la mezcla de agua y alcohol en una relación de 50/50 v/v. A continuación el solvente hidroalcohólico se depositó en un matraz que contenía el polvo fino de hojas de olivo tamizado (50 g), finalmente se agitó la mezcla para

homogeneizar. Se dejó macerar en un ambiente oscuro, para proteger los componentes fenólicos sensibles a la luz, por un período de 42 horas; durante este tiempo se realizaron agitaciones periódicas.

f. Filtración al vacío

Para esta operación se utilizó el equipo de filtración al vacío: motor, manguera, matraz kitasato, embudo Büchner con tapón, papel filtro N°1. Se llevó a cabo el proceso con una presión de trabajo de 0,6 bar.

g. Evaporación rotatoria

Para este proceso, cuyo objetivo es eliminar el alcohol que forma parte del extracto primario, se usó un rotavapor marca IKA RV 05 BASIC; a una velocidad de rotación 55 rpm (velocidad 1). Se inicia la evaporación con 762 ml del extracto obtenido de la filtración. La presión y la temperatura de trabajo fueron de 0,6 bar y 40 °C, respectivamente. El tiempo de evaporación fue de 4 h hasta que se obtuvo un concentrado igual al 50 % del volumen inicial. El extracto concentrado se almacena

en un envase ámbar y se mantiene en refrigeración (4 °C) hasta su uso o análisis.

h. Determinación de fenoles: Método Folin - Ciocalteu

➤ Preparación de carbonato de sodio al 20 %.

La solución se preparó un día antes de la lectura espectrofotométrica. En un tubo de ensayo se diluyeron 2 g de carbonato de sodio anhidro en 8 ml de agua destilada, se llevó a ebullición y se enfrió al finalizar. Se cubrió el tubo para evitar la exposición a la luz y al aire. Se Dejó reposar 24 horas a temperatura ambiente; luego de lo cual se filtró y enrazó hasta completar 10 ml.

➤ Preparación de solución stock de ácido tánico (0,1 mg/ml)

Se pesaron 25 mg de ácido tánico y se los disolvió en 25 ml de agua destilada (solución primaria de ácido tánico). Se tomó una alícuota de 1 ml, aforando a 10 ml de agua destilada en un tubo de ensayo, de este modo se obtuvo la solución

stock. Es importante resaltar que esta solución se debe usar lo más fresca posible, por lo que es preferible prepararla al instante ya que si se mantiene conservada, al momento de su aplicación no tendrá reacción cuando se le adicione el reactivo Folin - Ciocalteu.

➤ **Preparación de la curva de calibración de ácido tánico**

Este procedimiento se debe llevar a cabo en un ambiente con poca luz. Se requerirán 6 tubos de ensayo de preferencia pequeños; ya que los volúmenes de reactivos a adicionar están establecidos en microgramos; estos tubos estarán a su vez cubiertos con papel para evitar la reacción del ácido tánico con la luz. Terminada la preparación de tubos para la curva de calibración, se repite el procedimiento reemplazando el ácido tánico por el EFHO; para ello, en un tubo de ensayo se agrega los volúmenes indicados en la tabla 6, referente al EFHO. Luego de haber añadido los volúmenes

indicados de reactivos se deja reposar por 2 h. Para la lectura en el espectrofotómetro a 725 nm, se utilizaron cubetas de plástico de 1 mm de paso óptico, en las cuales se colocó el contenido de cada uno de los tubos de ensayo.

Tabla 6

Reactivos y volúmenes para determinar la curva de calibración y para la muestra de extracto fenólico de hojas de olivo.

	Tubo	µl de solución stock Ác. Tánico 0,1 mg/ml	Agua destilada (µl)	Reactivo Folin - Ciocalteu (µl)	Solución Na ₂ CO ₃ (µl)
Curva de calibración	Blanco	0	500	250	1 250
	1	20	480	250	1 250
	2	40	460	250	1 250
	3	60	440	250	1 250
	4	80	420	250	1 250
	5	100	400	250	1 250
EFHO	M	500	0	250	1 250

Nota: M =Extracto

Fuente: Elaboración propia, 2015

4.3.2.2. Diagrama procedimental para el tratamiento con extracto de hojas de olivo a muestras de carne de res fresca.

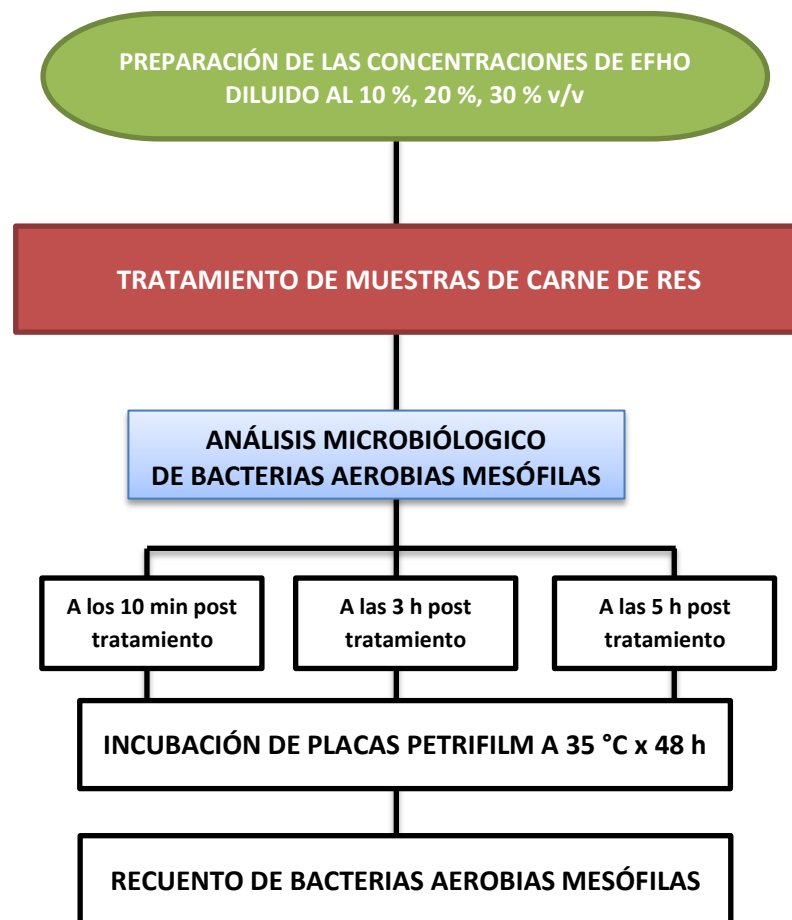


Figura 3. Diagrama procedimental para el tratamiento con extracto de hojas de olivo a muestras de carne de res fresca.

Fuente: Elaboración propia, 2015.

a. Preparación de las concentraciones de extracto fenólico de hojas de olivo diluido.

Para comprobar el efecto antimicrobiano del extracto, se trabajara con concentraciones de 10 %, 20 % y 30 %, diluyendo el extracto concentrado con agua destilada. La investigación se realiza sobre la base de 100 ml de extracto diluido; por lo tanto para las diluciones se procede de la siguiente manera:

- Para una concentración de 10 %: a 90 ml de agua destilada se adicionó 10 ml de extracto de hojas de olivo.
- Para una concentración de 20 %: a 80 ml de agua destilada se adicionó 20 ml de extracto de hojas de olivo.
- Para una concentración de 30 %: a 70 ml de agua destilada se adicionó 30 ml de extracto de hojas de olivo.

b. Tratamiento de muestras de carne de res magra con extracto de hojas de olivo

La investigación se llevó a cabo sobre 12 muestras de carne de res fresca etiquetadas como: muestra A (4 piezas), muestra B (4 piezas) y muestra C (4 piezas) distribuidas según la tabla 7. Las piezas tienen un peso individual aproximado de 250 g.

Tabla 7

Distribución de muestras de carne de res

Réplica A			
Muestra A0	Muestra A1	Muestra A2	Muestra A3
(0 %)	(10 %)	(20 %)	(30 %)

Réplica B			
Muestra A0	Muestra B2	Muestra B3	Muestra B3
(0 %)	(10 %)	(20 %)	(30 %)

Réplica C			
Muestra A0	Muestra C2	Muestra C3	Muestra C3
(0 %)	(10 %)	(20 %)	(30 %)

Fuente: Elaboración propia, 2015

Para todas las réplicas, el volumen de trabajo de extracto diluido fue de 100 ml de cada una de las tres concentraciones para cada muestra de carne de res (250 g). Para cada tratamiento, se adicionó en un recipiente 100 ml de extracto diluido a la concentración requerida; posteriormente se sumerge la muestra exponiéndola por 5 minutos al extracto diluido (Figura 4).



Figura 4. Muestra de carne sumergida en extracto de hojas de olivo a determinada concentración.

Fuente: Elaboración propia, 2015

Terminado el tiempo de tratamiento se colocaron las muestras en tapers individuales y se conservaron a 25 °C por un tiempo total de 5 horas. Se realiza el mismo procedimiento para cada una de las réplicas.

c. Análisis microbiológico de bacterias aerobias mesófilas

El análisis microbiológico de bacterias aerobias mesófilas de las 4 muestras de carne de cada una de las réplicas, se llevó a cabo a los 10 minutos post tratamiento, a la tercera hora post tratamiento y a la quinta hora post tratamiento. Los análisis son realizados bajo condiciones de conservación aceleradas controlando la temperatura para crear un ambiente propicio para el crecimiento de las bacterias las cuales crecen a una temperatura entre 15 y 45 °C; y a la vez emulando una temperatura ambiente promedio; así pues, se conservan las muestras a 25 °C en un refrigerador al cual se le ha desactivado la producción de frío,

utilizando el dispositivo de nivelación de temperatura que tiene incorporado al cual se le ha bajado hasta un nivel de 0 (cero). Se hace de importancia dejar en claro que los análisis se realizaron bajo asesoramiento profesional, lo cual se deja constancia en el anexo 3.

Días antes se realizó una prueba ensayo sobre una muestra de carne de res sin tratamiento conservada a 25 °C, para determinar la dilución con la que se debería de comenzar a trabajar, se determinó que una dilución de 10^{-3} permitía realizar el recuento a los 10 minutos post tratamiento.

Conocida la dilución inicial de trabajo, se procedieron a realizar los análisis microbiológicos de las muestras. Es necesario indicar que las réplicas no se realizaron en simultáneo por motivos de tiempo, espacio de trabajo y material de laboratorio, realizándose con un margen de espacio de una

semana entre ellas, manteniendo el extracto a temperatura de refrigeración y protegido de la luz.

Para el análisis de las 4 muestras de la réplica A, a los 10 minutos, 3 horas y 5 horas, se utilizaron 1 440 ml de agua peptonada (90 ml para cada matraz y 9 ml para cada tubo de ensayo). Para su preparación se utilizaron 36,72 g de peptona y 1 440 ml de agua destilada (Figura 5). El volumen de agua peptonada fue distribuida de la siguiente manera:

- 432 ml de agua peptonada para el análisis a los 10 minutos post tratamiento. Donde, se trabajó hasta una dilución de 10^{-3} , por lo que se usaron 4 matraces y 8 tubos de ensayo.
- 468 ml de agua peptonada para el análisis a las 3 horas post tratamiento. Donde, se trabajó hasta una dilución de 10^{-4} , por lo que se usaron 4 matraces y 12 tubos de ensayo.
- 540 ml de agua peptonada para el análisis a las 5 horas post tratamiento. Donde se trabajó hasta

una dilución de 10^{-6} , por lo que se usaron 4 matraces y 20 tubos de ensayo.



Figura 5. Agua peptonada tamponada

Fuente: Elaboración propia, 2015

A continuación se describe el procedimiento general realizado para las réplicas A, B y C.

- El primer análisis se realizó a los 10 minutos post tratamiento. Donde se utilizaron 432 ml de agua peptonada, la cual fue colocada en 4 matraces y 8 tubos de ensayo, material que fue llevado a esterilización en autoclave. Una vez esterilizada el agua peptonada, se rotularon los

matraces y tubos de acuerdo a las muestras para las que vayan a ser destinados, respecto a la concentración usada para el tratamiento. Antes de llevar a cabo los análisis, se acondicionó el área de trabajo; para ello se desinfectó con alcohol la superficie de trabajo y se dispusieron hasta 3 mecheros para asegurar la asepsia del aire; luego se pesaron sub muestras de 10 g de cada una de las muestras y se las redujo de tamaño por medio de cortes (Figura 6); estas sub muestras se añaden a los matraces respectivos que contiene agua peptonada y finalmente se agitan.



Figura 6. Reducción de tamaño de sub muestras

Fuente: Elaboración propia, 2015

La mezcla de cada matraz, de forma individual, se introduce en una bolsa estéril Stomacher para ser homogeneizada en el equipo Stomacher por 30 segundos. La mezcla homogeneizada representa la dilución 10^{-1} .

Se procedió a realizar diluciones sucesivas; para esto, de la mezcla homogeneizada contenida en la bolsa estéril (dilución 10^{-1}) se tomó 1 ml con micropipeta, este volumen se adicionó al primer tubo, lo que permitió obtener la dilución 10^{-2} ; a partir de ella se tomó 1 ml y se le adicionó al segundo tubo, obteniendo la dilución 10^{-3} ; luego de cada adición se debe agitar el tubo en el mezclador vertical o vórtex para homogeneizar la solución.

Una vez obtenida la dilución de inoculación (10^{-3}) para todas las muestras de la réplica A (A0, A1, A2, A3); se procedió a inocular en las placas petrifilm (Figura 7). Para ello se

tomó 1 ml de la dilución de trabajo con micropipeta, se ubicó el petrifilm en una superficie plana y con cuidado se levantó la lámina superior. Se colocó en el centro de la placa el ml tomado de la dilución de inoculación, se dejó caer la lámina superior haciendo una suave presión con el dispersor para que la dilución se distribuya en el área circular que forma el dispersor. Ver Anexo 1, referido a las recomendaciones de uso del petrifilm.

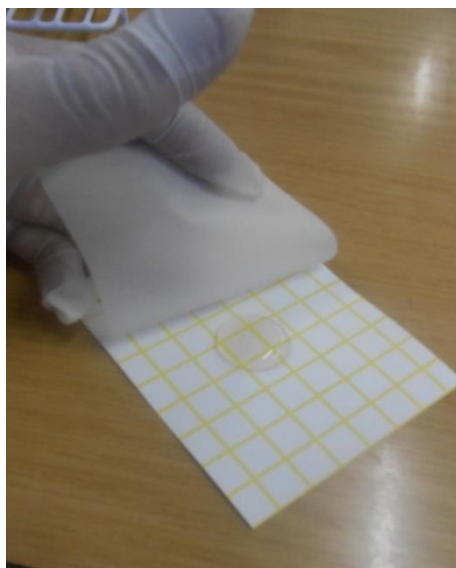


Figura 7. Inoculación en el centro de la placa petrifilm.

Fuente: Elaboración propia, 2015

Una vez inoculadas, se colocaron los petrifilm a la incubadora a 35 °C por 48 horas. Luego de lo cual se realizó el recuento de colonias, las cuales fueron contadas con la ayuda de una lupa (Figura 8). El recuento de colonias se realizó según lo especificado en el anexo 1, guía de interpretación para el recuento de bacterias aerobias en placas petrifilm.



Figura 8. Recuento de colonias de bacterias aerobias mesófilas.

Fuente: Elaboración Propia, 2015

- A la tercera hora post tratamiento se trabajó hasta una dilución de incubación de 10^{-4} . Siguiendo los mismos pasos que los descritos anteriormente, realizándose el recuento 48 horas después de su incubado.
- A la quinta hora post tratamiento, se trabajó hasta una dilución de 10^{-6} . Siguiendo los mismos pasos que los descritos anteriormente, realizándose el recuento 48 horas después de su incubado.

Se realizaron 2 inoculaciones por cada concentración a determinado periodo de tiempo de tratamiento.

CAPÍTULO V: TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

5.2 Técnicas Aplicadas en la Recolección de la Información

La técnica utilizada para obtener el contenido total de fenoles en el EFHO, fue la de Folin - Ciocalteu. Los datos derivaron de la lectura espectrofotométrica, producto de la variación colorimétrica de cada una de las muestras de soluciones fenólicas preparadas con ácido tánico y extracto diluido. Los datos obtenidos fueron recolectados en una tabla de registro (Anexo 4) para formar una curva de calibración; donde por medio de interpolación de valores se pudo obtener el contenido total de fenoles en el extracto de hojas de olivo.

La técnica para obtener datos acerca del efecto del EFHO sobre bacterias aerobias mesófilas se realizó mediante recuento de colonias bacterianas haciendo uso del método AOAC 990.12. Los datos fueron analizados mediante el programa SPSS v. 20, para lo cual fueron registrados en una base de datos y obteniendo resultados a través de cuadro ANOVA; donde se pudo determinar el grado de significancia de cada concentración respecto al

recuento de colonias microbianas registradas y relacionando entre sí las 3 réplicas realizadas así como los tiempos de tratamiento en los cuales se realizaron los análisis microbiológicos. Esto permitió determinar la mejor concentración.

Los datos obtenidos en el recuento de bacterias aerobias se utilizan también para buscar explicar el comportamiento del efecto antimicrobiano del extracto diluido a través del tiempo de tratamiento. Ya que los grados de significancia respecto al número de colonias contadas entre los tiempos de tratamiento, eran evidentes; no se creyó necesario realizar un análisis estadístico; por lo que solo se procedió a registrar los datos en el programa Microsoft Excel 2010, con los cuales se realizaron gráficos de Tiempo vs Recuento de colonias bacterianas; con ello se busca entender el porqué de su comportamiento utilizando bibliografía y trabajos referenciales.

5.3 Resultados

5.3.1. Obtención del extracto fenólico de hojas de olivo

Para la obtención del extracto fenólico se trabajó con el balance de materia prima registrado en la Tabla 8

Tabla 8

Balance de materia prima durante el proceso de extracción

Procedimiento		Peso o volumen del producto
Secado de hojas de oliva	Peso de entrada	250 g
	Peso de salida	135 g
Triturado de hojas	Peso obtenido	95 g
Tamizado	Peso obtenido	50 g ^(*) + 35 g ^(**) + 10 g ^(***)
Extracción hidroalcohólica	Volumen Agua/alcohol	1 L
	Peso de polvo de hojas de olivo	50 g
Extracto fenólico pre filtración	Volumen	1 L
Extracto fenólico post filtración	Volumen	762 ml
Extracto pre evaporación	Volumen	763 ml
Extracto concentrado post evaporación	Volumen	382 ml

(*) Peso de polvo de hojas de olivo utilizado en la elaboración del extracto

(**) Peso de polvo de hojas de olivo no utilizado.

(***) Peso compuesto por partes de las hojas no trituradas como la nervadura central o el peciolo.

Fuente: Elaboración propia, 2015

a. Determinación del contenido de fenoles totales

Se realiza mediante espectrofotometría e interpolación, lo que permite calcular el contenido total de fenoles. En el anexo 4 se presentan, los μg de AT (ácido tánico) que presentan cada uno de los tubos con los cuales se elabora la curva de calibración; estos valores derivan de la concentración de la solución stock (SS) de AT (0,1 mg/ml de SS o 100 μg / 1 000 μl) y del volumen de solución stock agregada al tubo de ensayo (X μl ss) dada en la tabla 6. Para hallar los μg de ácido tánico, se dedujo la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de AT} = \frac{(X \mu\text{l ss}) \times (100 \mu\text{g})}{1\ 000 \mu\text{l ss}}$$

Dónde:

X μl ss= Volumen de solución stock agregada al tubo de ensayo

$\frac{(100 \mu\text{g})}{1\ 000 \mu\text{l ss}}$ = Concentración de la solución stock (SS) de ácido tánico

Usando bandejas espectrofotométricas de plástico de 1 mm de espesor, se midieron las absorbancias de las soluciones de cada tubo de ensayo; las cuales se presentan en el anexo 4; donde también se registra la interpolación de valores, con ello determinamos la cantidad de fenoles; obteniendo un resultado de 18,854 y expresándolo en $\mu\text{g EAT/ml}$ de extracto.

5.3.2. Análisis microbiológico

Se realizaron 2 inoculaciones por cada concentración a determinado tiempo; a cada inoculación se le realiza el recuento de bacterias aerobias mesófilas y se obtiene un promedio con el cual se trabaja. Se indica que, si bien se trabaja con diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-6} dependiendo del tiempo de tratamiento 10 minutos, 3 horas y 5 horas respectivamente, los valores que se presentan en las tablas están expresados en 10^3 ; esto para facilitar su comparación, pero por supuesto respetando la dilución de trabajo. Ejemplo: un recuento a la quinta hora nos arroja un valor de $182\ 000 \times 10^3 \text{ ufc/g} = 182 \times 10^6 \text{ ufc/g}$.

a. En relación a la variable concentración porcentual de extracto

En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos para la réplica A respecto al recuento de bacterias aerobias mesófilas realizadas a las muestras de carne de res con las tres concentraciones

Tabla 9

Recuento de BAM de la réplica A durante las 5 horas de tratamiento.

	RECuento				RECuento PROMEDIO			
	0 %	10 %	20 %	30 %	0 %	10 %	20 %	30 %
10 min	288	140	135	52	273	135	140	56
	258	141	134	60				
3 horas	3 410	2 140	2 270	2 330	3 590	2 110	2 565	2 355
	3 770	2 080	2 860	2 380				
5 horas	178 000	145 000	169 000	158 000	182 000	142 500	166 500	154 500
	186 000	140 000	164 000	151 000				

Nota: Los resultados se deberán leer multiplicándolos por el coeficiente 10^3 ufc/g.

Fuente: Elaboración propia, 2015

La figura 9, nos muestra el efecto inmediato que tiene el extracto sobre las bacterias aerobias mesófilas, ya que se puede apreciar en el gráfico una marcada diferencia entre la carga microbiana de la muestra sin tratamiento (273×10^{-3} ufc/g de carne) y las muestras tratadas; sobre todo aquella

muestra tratada con una concentración de extracto diluido del 30 % (56×10^{-3} ufc/g de carne). Así pues, se visualiza que las concentraciones de 10 y 20 % (135×10^{-3} ufc/g de carne y 140×10^{-3} ufc/g de carne, respectivamente) no difieren en gran medida en su efecto pero que sí evidencian un poder bactericida importante; por su parte y con una diferencia evidente, la concentración de 30 % disminuye en un 79,5 % la carga bacteriana presente en la muestra de carne de res fresca.

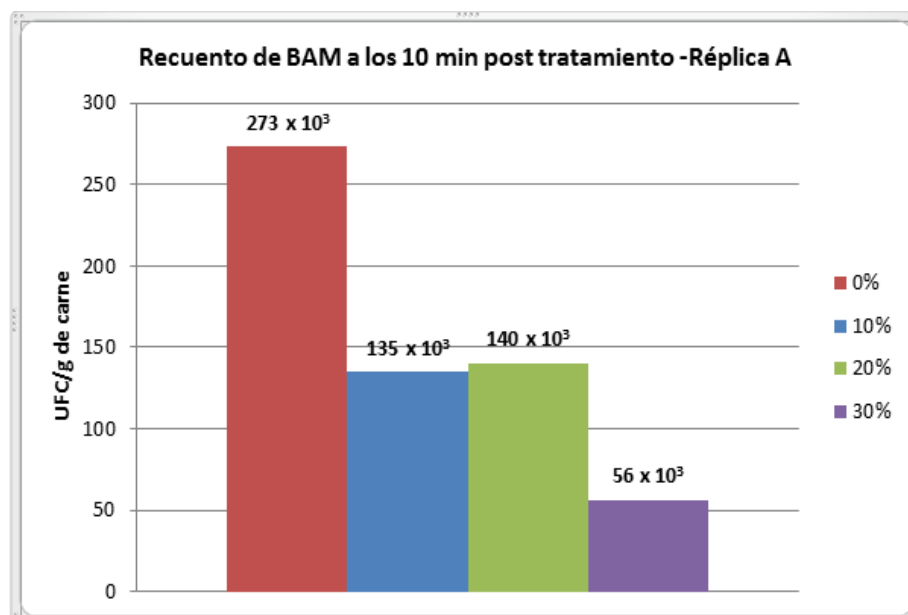


Figura 9. Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a los 10 min post tratamiento – Réplica A.

Fuente: Elaboración propia, 2015

Las figuras 10 y 11, nos permiten apreciar la pérdida progresiva del poder antimicrobiano del extracto de hojas de olivo. Las gráficas también nos muestran que aunque la concentración de 30 % es la que tuvo mejor efecto, es la que pierde su poder antimicrobiano de manera más acelerada en comparación con las otras dos concentraciones.

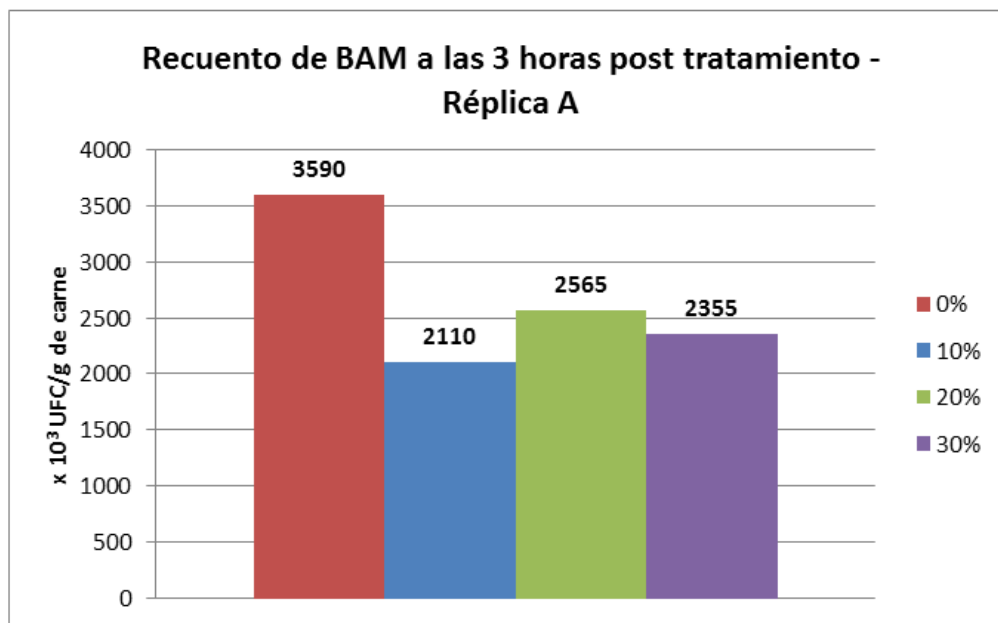


Figura 10. Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a las 3 horas post tratamiento – Réplica A.

Fuente: Elaboración propia, 2015

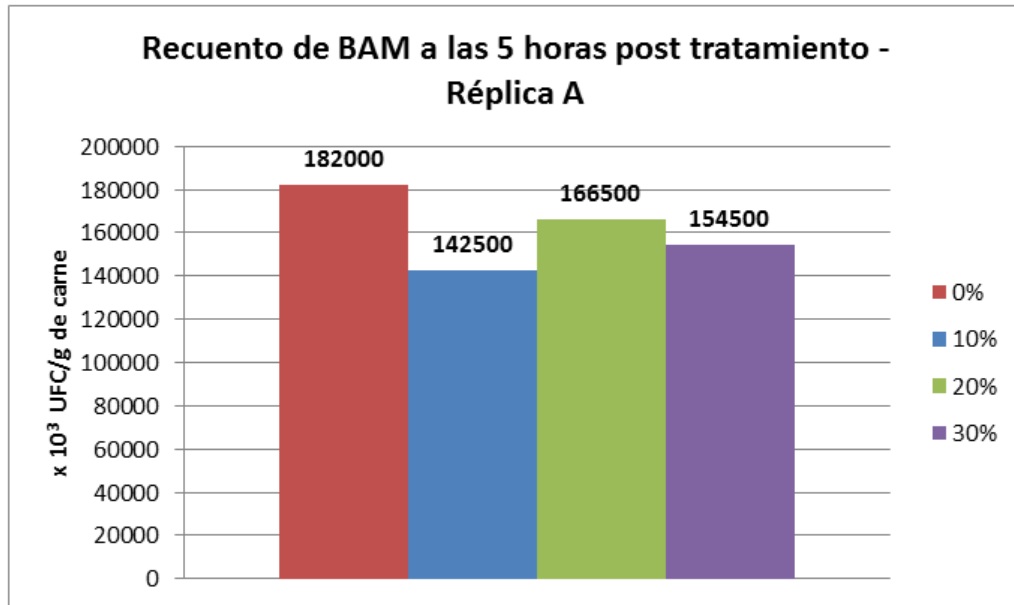


Figura 11. Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a las 5 horas post tratamiento – Réplica A.

Fuente: Elaboración propia, 2015

En la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos para la réplica B respecto al recuento de bacterias aerobias mesófilas realizadas a las muestras de carne de res con las tres concentraciones. Según lo que se puede apreciar en la figura 12, se reitera que la concentración de 30 % es la que obtuvo mejores resultados antimicrobianos inmediatos.

Tabla 10

Recuento de BAM de la réplica B durante las 5 horas de tratamiento.

	RECuento				RECuento PROMEDIO			
	0 %	10 %	20 %	30 %	0 %	10 %	20 %	30 %
10 min	143	74	57	55	144	70	55	51
	145	66	53	47				
3 horas	3 230	1 130	410	410	2 855	1 205	365	350
	2 480	1 280	320	290				
5 horas	111 000	82 000	86 000	92 000	103 500	73 500	85 000	92 500
	96 000	65 000	84 000	93 000				

Nota: Los resultados se deberán leer adjuntando a los mismos el coeficiente $\times 10^3$ ufc/g.

Fuente: Elaboración propia, 2015

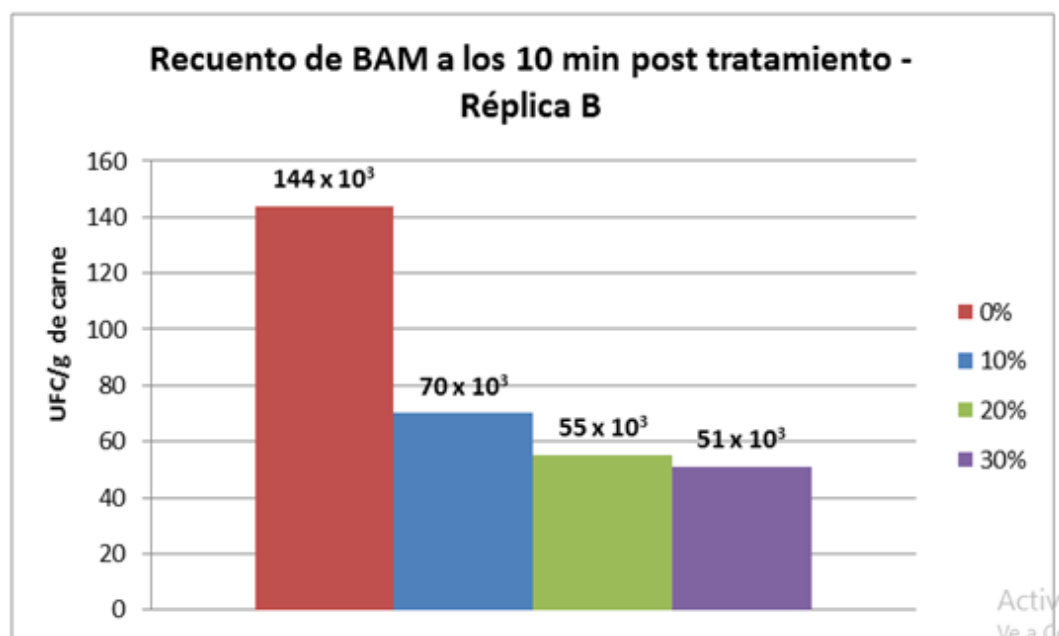


Figura 12. Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a los 10 min post tratamiento – Réplica B.

Fuente: Elaboración propia, 2015

La figura 13 muestra que a las tres horas de tratamiento, el extracto aún posee poder bacteriostático, manteniendo los niveles de la muestra dentro de los rangos permitidos, con una gran diferencia frente a la muestra testigo.

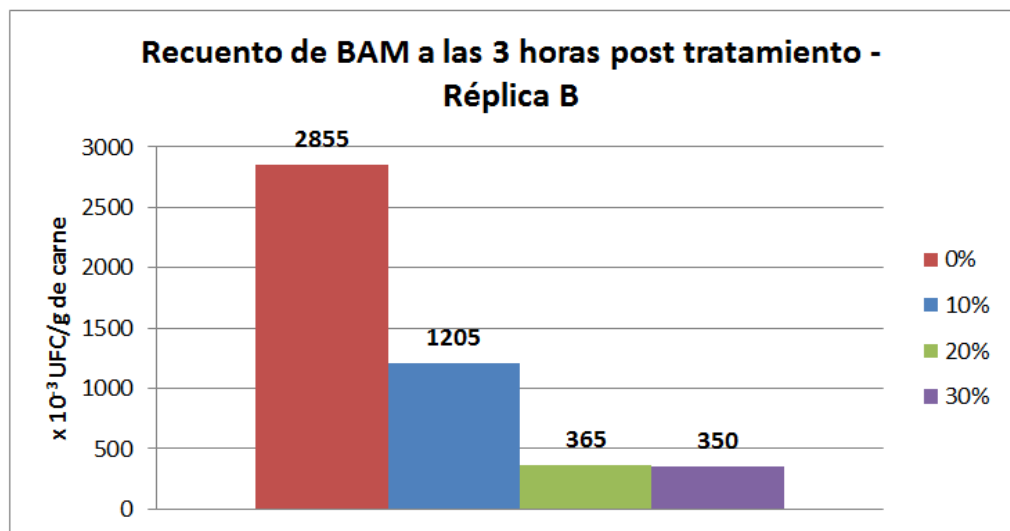


Figura 13. Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a las 3 horas post tratamiento – Réplica B.

Fuente: Elaboración propia, 2015

La figura 14, muestra que a las 5 horas, el efecto antimicrobiano se ha perdido casi por completo, que las muestras han sobrepasado los límites permitidos y que al igual que en la réplica A, la concentración de 30 % es la que más rápido ha perdido su efecto, inclusive

presenta una carga bacteriana mayor a las otras dos concentraciones.

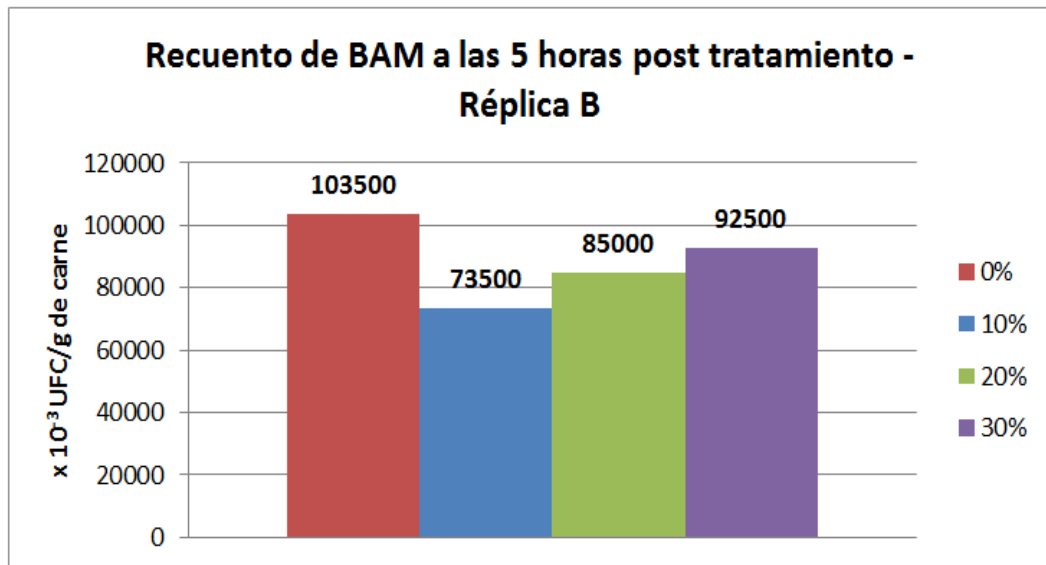


Figura 14. Efecto de las concentraciones de extracto sobre las BAM a las 5 horas post tratamiento – Réplica B.

Fuente: Elaboración propia, 2015

En la tabla 11 se presentan los resultados obtenidos para la réplica C respecto al recuento de BAM realizadas a las muestras de carne de res con las tres concentraciones. Según lo que se puede apreciar en la figura 15, se reitera que la concentración de 30 % es la que obtuvo mejores resultados, reduciendo en más de un 50 % la carga bacteriana.

Tabla 11

Recuento de BAM de la réplica C durante las 5 horas de tratamiento.

	RECuento				RECuento PROMEDIO			
	0 %	10 %	20 %	30 %	0 %	10 %	20 %	30 %
10 min	651	462	328	316	645	470	327	317
	639	478	326	318				
3 horas	5450	4580	4180	3580	5270	4680	4475	3975
	5090	4780	4770	4370				
5 horas	322000	300000	209000	314000	353500	303500	207500	320000
	385000	307000	206000	326000				

Nota: Los resultados se deberán leer adjuntando a los mismos el coeficiente $\times 10^3$ ufc/g.

Fuente: Elaboración propia, 2015

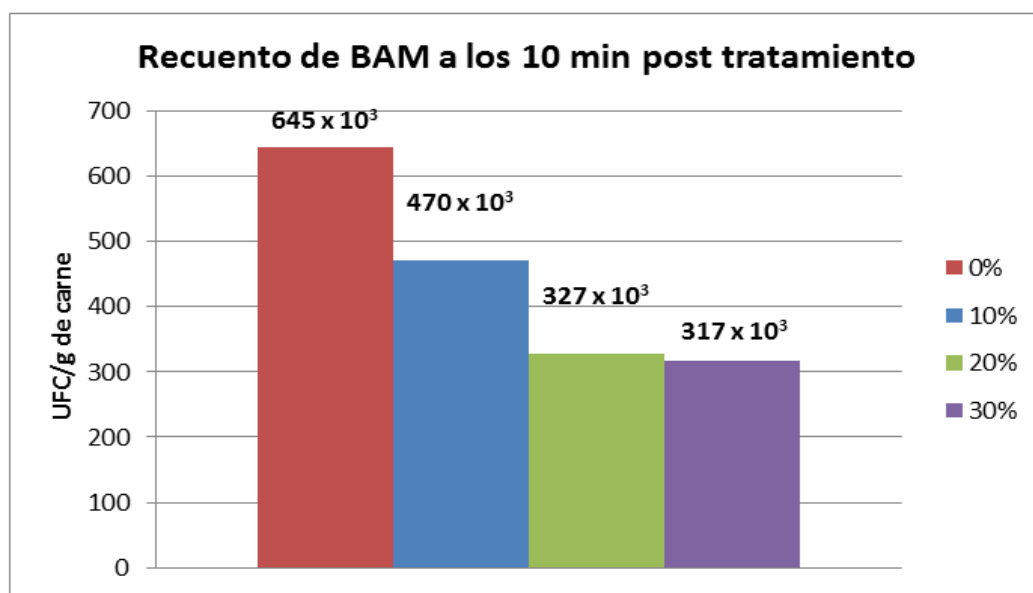


Figura 15. Efecto de las concentraciones de extracto sobre las bacterias aerobias mesófilas a los 10 min post tratamiento – Réplica C.

Fuente: Elaboración propia, 2015

En la figura 16, se aprecia nuevamente la pérdida de poder antibacteriano.

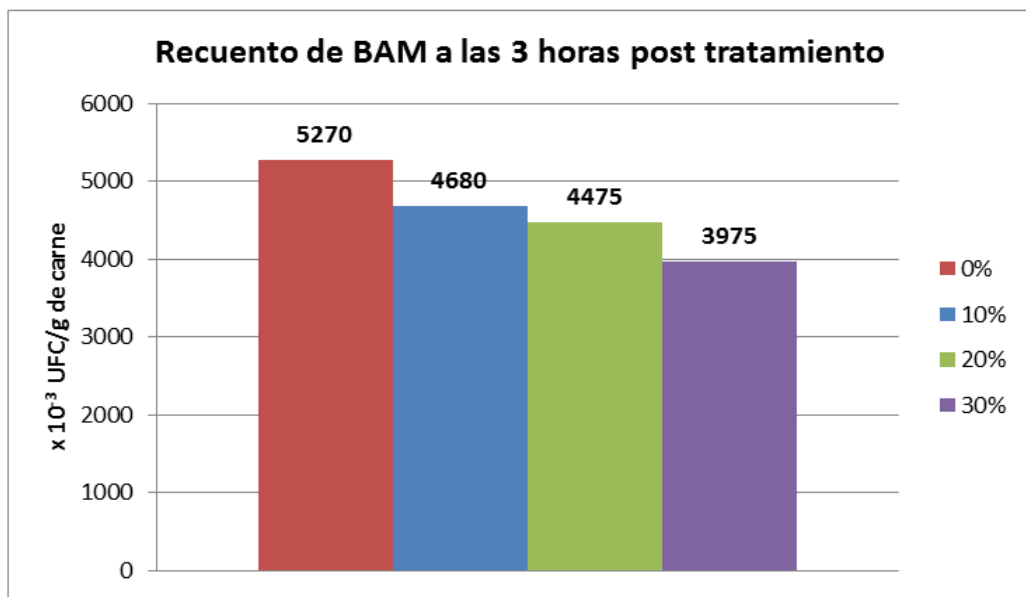


Figura 16. Efecto de las concentraciones de extracto sobre las bacterias aerobias mesófilas a las 3 horas post tratamiento – Réplica C.

Fuente: Elaboración propia, 2015

Finalmente la figura 17 muestra un resultado coincidente en las tres replicas donde el extracto con una concentración del 30 % pierde aceleradamente su poder antibacteriano, permitiendo que los microorganismos se reproduzcan a gran velocidad.

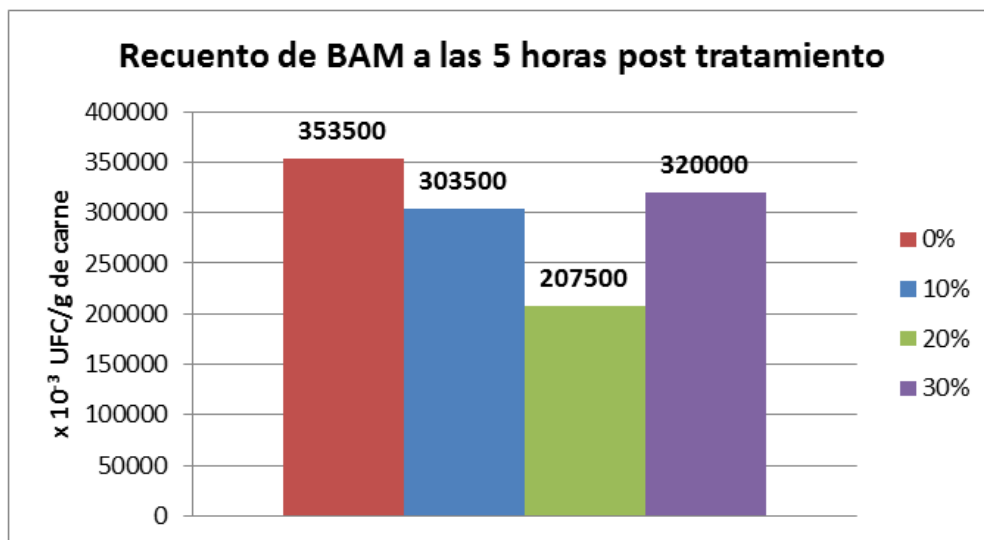


Figura 17. Efecto de las concentraciones de extracto sobre las bacterias aerobias mesófilas a las 5 horas post tratamiento – Réplica C.

Fuente: Elaboración propia, 2015

b. Respecto a la variable tiempo de tratamiento

En la figura 18, respecto al comportamiento de las bacterias aerobias mesófilas en relación al tiempo de tratamiento de la réplica A, se aprecia el efecto inmediato que tiene el extracto fenólico a los 10 minutos sobre todo con la concentración de 30 %, demostrando un alto poder bactericida. Pero también se puede observar que el efecto de esta concentración se va perdiendo conforme avanza el tiempo de tratamiento llegando a la tercera hora a equiparar en población

bacteriana a las otras dos concentraciones; manteniendo esta tendencia incluso hasta la quinta hora de tratamiento. Esto puede deberse a la disponibilidad de nutrientes y a las fases de crecimiento bacteriano; lo cual será motivo de discusión en el apartado correspondiente.

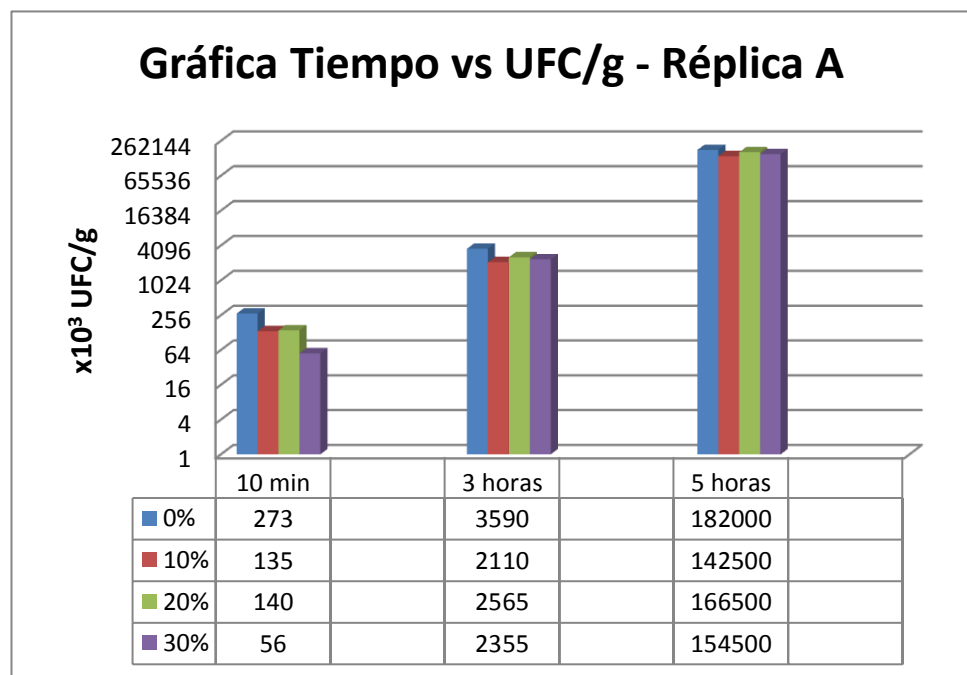


Figura 18. Recuento de BAM respecto al tiempo de tratamiento correspondiente a la réplica A.

Fuente: Elaboración propia, 2015

En la figura 19, respecto al comportamiento de las bacterias aerobias mesófilas en relación al tiempo de tratamiento de la réplica B, se observa un comportamiento similar al de la réplica A. Evidentemente se aprecia el poder bactericida del extracto a la concentración de 30 %.

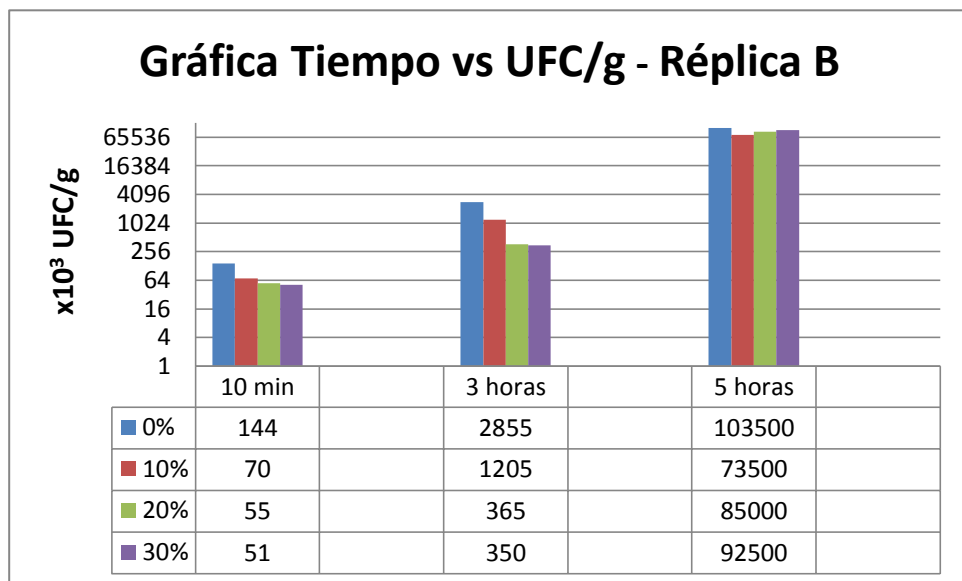


Figura 19. Recuento de BAM respecto al tiempo de tratamiento correspondiente a la réplica B.

Fuente: Elaboración propia, 2015

En la figura 20, respecto al comportamiento de las bacterias aerobias mesófilas en relación al tiempo

de tratamiento de la réplica C, presenta el mismo resultado que el de las réplicas anteriores.

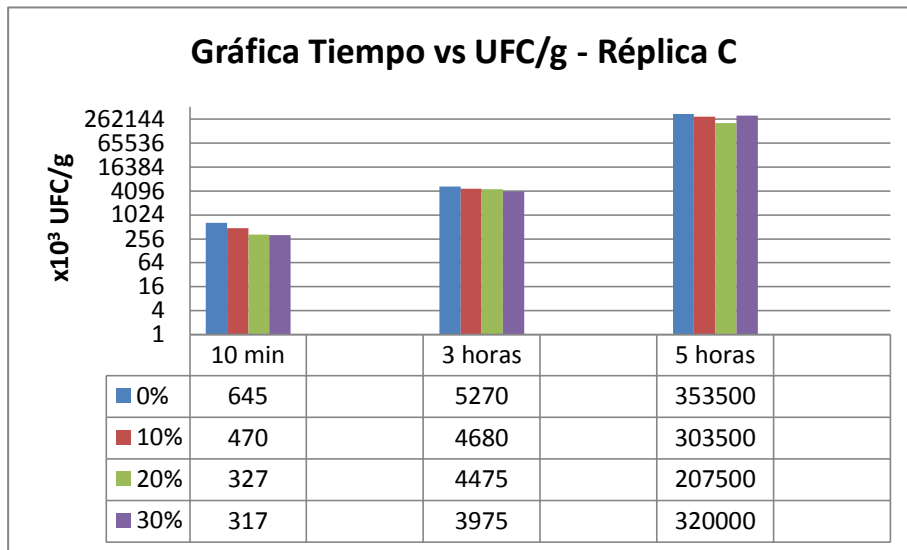


Figura 20. Recuento de BAM respecto al tiempo de tratamiento correspondiente a la réplica B.

Fuente: Elaboración propia, 2015

c. Del análisis estadístico de los resultados microbiológicos

Para el análisis estadístico, se utilizó el Software SPSS v. 20, con el cuál se aplica análisis de varianza (ANOVA) univariante, tomando como factores fijos a la concentración de extracto de hojas de olivo ([]) y al tipo de muestra; y como variable

dependiente al recuento de bacterias aerobias mesófilas (BAM). Las tablas y gráficas se encuentran detalladas en el apartado de anexos.

c.1. Análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento

- Hi: Las concentraciones producen efectos diferenciales sobre el recuento de BAM a los 10 minutos de tratamiento y por lo menos una es significativa al recuento de bacterias aerobias mesófilas de la muestra testigo (0 %).
- Ho: Las concentraciones no producen efectos diferenciales sobre el recuento de BAM a los 10 minutos de tratamiento y ninguna es significativa al recuento de bacterias aerobias mesófilas de la muestra testigo (0 %).

Se utilizaron los recuentos de bacterias aerobias mesófilas obtenidas en el laboratorio y se elaboró una base de datos (Anexo 5).

Se elaboró un análisis ANOVA (Anexo 6) utilizando los datos mostrados en el anexo 5. Se obtuvo que los niveles críticos (Sig.) indican que los grupos definidos por la variable concentración poseen recuentos medios significativamente diferentes (Sig. = 0,021 < 0,05).

Para determinar dónde se hallaban las diferencias significativas se realizó comparaciones a *posteriori*; para ello se realizó la prueba de homogeneidad de varianza (Anexo 7); esta tabla muestra un Sig. = 0,478 > 0,05; por lo tanto se afirma que las varianzas de los grupos son estadísticamente iguales.

Establecido el hecho de que existe igualdad en las varianzas a lo largo de los grupos se hallaron las diferencias significativas usando la Prueba de Tukey (Anexo 8). Como se puede observar al relacionar la concentración de 0 % con la concentración de 10 % no presenta diferencia

significativa ya que presenta un Sig.= 0,138 > 0,05; pero al relacionarlo con las concentraciones de 20 % y 30 % se puede observar que presentan diferencias significativas ya que presentan Sig= 0,041 y 0,020 ambos menores a 0,05.

En el tabla de subconjuntos homogéneos (Anexo 9) perteneciente al grupo definido por la variable concentración, podemos apreciar que se agrupan en el subconjunto 1 a las concentraciones de 10, 20 y 30 % indicando que entre ellas no hay diferencias significativas; pero coloca a la concentración 0 % en el subconjunto 2 junto con la concentración de 10 %, lo que indica que entre ellas no hay diferencias significativas, lo que no sucede con las otras dos concentraciones con las cuales si existe diferencia significativa.

Los datos arrojan un gráfico de perfil que muestra las medias marginales de la relación existente entre el recuento de bacterias aerobias

mesófilas vs. concentración de extracto de hojas de olivo.

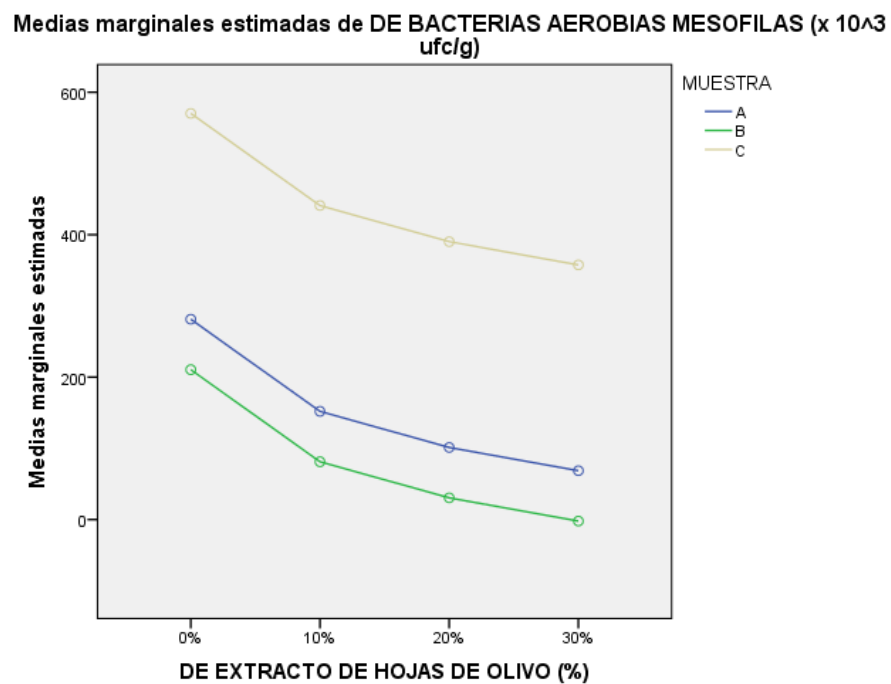


Figura 21. Medias marginales – Recuento de bacterias aerobias mesófilas vs. Concentración de extracto de hojas de olivo a los 10 minutos post tratamiento.

Fuente: Elaboración propia, 2015.

c.2. Análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento

- H_1 : Las concentraciones producen efectos diferenciales sobre el recuento de BAM en la

tercera hora de tratamiento y por lo menos una es significativa al recuento de BAM de la muestra testigo (0 %).

- Ho: Las concentraciones producen los mismos efectos o no producen efectos diferenciales sobre el recuento de BAM en la tercera hora de tratamiento y ninguna es significativa al recuento de BAM de la muestra testigo (0 %).

Se utilizaron los recuentos de bacterias aerobias mesófilas obtenidas en el laboratorio y se elaboró una base de datos (Anexo 10).

Se elaboró un análisis ANOVA (Anexo 11) con lo que se obtuvo que los niveles críticos (Sig.), indican que los grupos definidos por la variable concentración poseen recuentos medios significativamente diferentes (Sig. = 0,016 < 0,05).

Para determinar las diferencias significativas se realizaron comparaciones a *posteriori*. Para ello se realiza la prueba de homogeneidad de varianza (Anexo 12); la tabla muestra un Sig. = 0,900 > 0,05; por lo tanto se afirma que las varianzas de los grupos son estadísticamente iguales.

Establecido el hecho de que existe igualdad en las varianzas a lo largo de los grupos, se hallaron las diferencias significativas usando la Prueba de Tukey (Anexo 13). Se observa que al relacionar la concentración de 0 % con la concentración de 10 % no presenta diferencias significativa ya que presenta un Sig.= 0,059 > 0,05; pero al relacionarlo con las concentraciones de 20 y 30 % se puede observar que presentan diferencias significativas ya que respectivamente presentan Sig= 0,033 y 0,016 ambos menores a 0,05.

En la tabla de subconjuntos homogéneos (Anexo 14) perteneciente al grupo definido por la variable concentración, podemos apreciar que se agrupan en el subconjunto 1 a las concentraciones de 10, 20 y 30 % indicando que entre ellas no hay diferencias significativas; pero coloca a la concentración 0 % en el subconjunto 2 junto con la concentración de 10 %, lo que indica que entre ellas no hay diferencia significativa, lo que no sucede al relacionarla con las otras dos concentraciones con las cuales si existe diferencias significativas.

Los datos arrojan un gráfico de perfil que muestra las medias marginales de la relación existente entre el recuento de bacterias aerobias mesófilas vs. concentración de extracto de hojas de olivo.

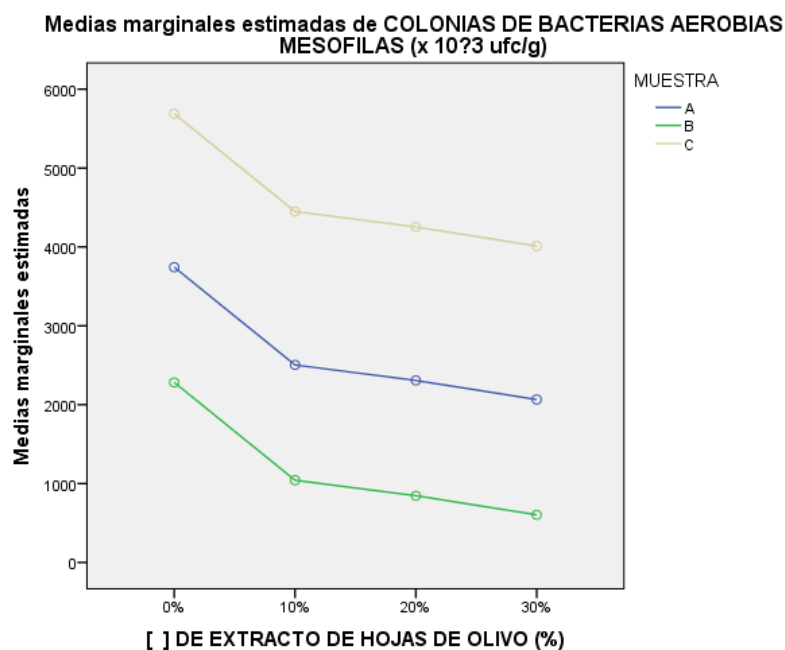


Figura 22. Medias marginales – Recuento de bacterias aerobias mesófilas vs. Concentración de extracto de hojas de olivo a las 3 horas post tratamiento.

Fuente: elaboración propia, 2015.

c.3. Análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 5 horas post tratamiento.

- Hi: Las concentraciones producen efectos diferenciales sobre el recuento de BAM en la tercera hora de tratamiento y por lo menos una es significativa al recuento de BAM de la muestra testigo (0 %).

- Ho: Las concentraciones producen los mismos efectos o no producen efectos diferenciales sobre el recuento de BAM en la tercera hora de tratamiento y ninguna es significativa al recuento de BAM de la muestra testigo (0 %).

Se utilizaron los recuentos de bacterias aerobias mesófilas obtenidas en el laboratorio y se elaboró una base de datos (Anexo 15), con la que se realizó un análisis ANOVA obteniendo que los niveles críticos (Sig.), indican que los grupos definidos por la variable concentración no poseen recuentos medios significativamente diferentes (Sig. = 0,289 > 0,05); por lo tanto no es necesario realizar pruebas post hoc de Tukey.

Los datos arrojan un gráfico de perfil que muestra las medias marginales de la relación existente entre el recuento de bacterias aerobias mesófilas vs. concentración de extracto de hojas de olivo

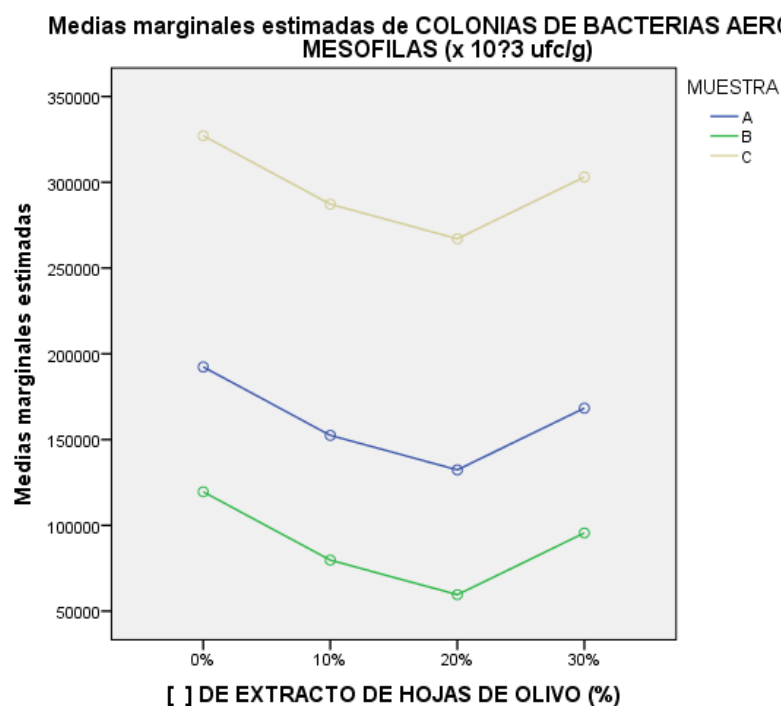


Figura 23. Medias marginales – Recuento de bacterias aerobias mesófilas vs. Concentración de extracto de hojas de olivo a las 5 horas post tratamiento.

Fuente: Elaboración propia, 2015.

5.4 Discusión de resultados

Se pudo comprobar el efecto antimicrobiano del extracto fenólico de hojas de olivo (EFHO) contra las bacterias aerobias mesófilas presentes en muestras cárnicas; reduciendo aproximadamente un 80 % de la carga microbiana inicial de la muestra (según análisis de la réplica “A” a los 10 minutos); siendo

la concentración de 30 % de extracto diluido la que mejor efecto antibacteriano presentó de acuerdo a los resultados estadísticos. Esto concuerda con los resultados obtenidos por los estudios realizados por Robles M.(2010), Lizcano A. y Vergara J. (2008) y Estrada S.(2010), estudios que se han tomado como referencia para llevar a cabo la investigación; todos ellos trabajan con extractos naturales y los aplican a muestras contaminadas con bacterias aerobias específicas como *S. aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, concluyendo que todos los extractos entre ellos los de romero y tomillo, presentan poder antimicrobiano. Se hace imprescindible indicar que todos los extractos utilizados por estos investigadores presentan en su composición componentes fenólicos similares a la oleuropeína y al hidroxitirosol, como es el caso del timol en el tomillo; por lo que se hace evidente que estos compuestos son los responsables en la mayor parte de la actividad antimicrobiana de los extractos naturales. Los resultados obtenidos son de gran importancia, ya que se comprueba el poder antibacteriano del extracto de hojas de olivo, a partir del cual se pueden iniciar estudios para evaluar su efecto de manera más específica; es decir, en determinadas bacterias, por supuesto sobre

aquellas que son de interés alimentario, aunque seguramente su aplicación podría ir más allá del campo de los alimentos y la medicina.

Con respecto a la determinación del contenido total de fenoles presentes en el EFHO, es difícil comparar los resultados obtenidos debido a los diferentes métodos para desarrollar las mezclas y la manera en la que se interpretan, ya que muchos investigadores difieren de los resultados obtenidos con los diferentes métodos. Tomando como ejemplo a Jiménez P. (2010) en su tesis sobre “Efecto de la adición de extractos de hojas de olivo o palto en la estabilidad termooxidativa de aceites de diferente Insaturación”; en ella el investigador obtiene una cantidad de fenoles totales igual a 7,3 mg EAC/ml de extracto (EAC: equivalente de ácido cafeico), que en comparación con el hallado en la presente investigación que es de 18,854 µg EAT/ml (EAT: Equivalentes de ácido tánico) de extracto, evidentemente podría suponer un mejor proceso de obtención; pero hay que tener en cuenta otros factores como, el periodo en el que se recolectaron las hojas, la variedad de olivo y la ubicación geográfica ya que como indica Ticona W. (2013): “La composición cuantitativa de

compuestos fenólicos en el olivo es el resultado de una compleja interacción entre diversos factores, incluyendo el clima, grado de maduración, cultivo, secado de la planta, etc.". También hay que tener en cuenta el método para preparar las diluciones las cuales serán leídas en el espectrofotómetro, Jiménez P. (2010) da mano del ácido cafeico como base fenólica para realizar la curva de calibración a diferencia del presente trabajo donde se utiliza el ácido tánico; es por eso que los resultados se indican como equivalentes del ácido usado para obtener la curva de calibración. Sería adecuado entonces determinar una equivalencia entre los ácidos utilizados en los diferentes métodos para determinar el contenido de fenoles totales, generalmente el ácido gálico, tánico y cafeico; de modo que se puedan relacionar entre sí, lo que permitiría calcular el contenido de fenoles independientemente de la base fenólica usada en el proceso.

Con respecto al tema de interés, el efecto antimicrobiano de la hoja de olivo es un tema poco estudiado en relación con los alimentos; por lo que el mecanismo de acción antimicrobiana de sus componentes fenólicos principales como son la oleuropeína y el hidroxitirosol, no están bien definidos; pero, aunque no se puede

asegurar a plenitud sin un estudio de respaldo, el mecanismo de acción antimicrobiana sería similar al determinado por García R. y Palou E. (2008) en su estudio sobre mecanismos de acción antimicrobiana de compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol; donde estos compuestos fenólicos actuaban dañando la membrana citoplasmática, degradando la pared celular, dañando a las proteínas, filtrando el contenido celular, coagulando el citoplasma y disminuyendo la fuerza motriz bacteriana.

Los resultados microbiológicos obtenidos confirman la actividad antimicrobiana del EFHO; pero, esta resulta algo inestable a la temperatura de tratamiento en la que se llevó a cabo la investigación que fue de 25 °C; Rodríguez E. (2011), en su publicación “Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas”, manifiesta que la actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos o aceites esenciales, y se ha observado que la grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos. Basándonos en lo anterior analizamos la concentración de 30 % de extracto diluido, que fue la

que mejor efecto antimicrobiano presentó tal como lo demuestra el recuento de BAM a los 10 minutos post tratamiento, reduciendo en casi un 80 % la carga microbiana, esta concentración no mantiene su efecto ya que con un periodo de 3 horas de tratamiento es evidente que se anula casi por completo su poder antibacteriano, incluso permite un crecimiento acelerado de las bacterias; pero esto también podría depender de la población bacteriana inicial. Así pues, centrándonos en la réplica B, réplica que por cierto se realizó sobre muestras con la menor carga bacteriana inicial en comparación con las muestras de las réplicas A y C, se puede observar en la figura 13, que el recuento de bacterias a la tercera hora no es tan alarmante como en las otras dos réplicas respecto al mismo periodo de tiempo. Hasta el momento se tienen dos posibles factores de pérdida del poder antimicrobiano; hablamos pues de la temperatura de conservación de la carne y de la carga bacteriana inicial que presenta. De modo que es posible suponer y proponer que para un mejor funcionamiento el EFHO, es preferible tratar este alimento lo más pronto posible antes de su contaminación excesiva e inmediatamente conservarlo a temperaturas bajas, ya que los resultados obtenidos comprueban que a la temperatura ambiente su poder antimicrobiano se pierde aceleradamente. Así

mismo, como lo estipula Rodríguez E. (2011), la grasa y las proteínas presentes también influyen negativamente en el efecto antimicrobiano.

Las concentraciones de 10 y 20 %, redujeron la población bacterias, pero, no fueron tan efectivas ya que sus recuentos fueron superiores a los registrados cuando se usó la concentración de 30 %; que si bien al término del tratamiento equiparaba los recuentos de las otras dos concentraciones, esto fue debido a los factores antes mencionados, y que como se propuso, al usar temperaturas bajas de conservación del alimento, es probable que su poder se mantenga estable por un periodo de tiempo mucho mayor. Además a las 5 horas de tratamiento la muestra ya había sobrepasado el límite máximo permitido por norma sanitaria que es de 10^7 ufc/g de muestra, motivo por el cual no se tomó en cuenta el hecho de que las muestras tratadas con concentraciones de 10 y 20 % tengan un recuento bacteriano similar al de las muestras tratadas al 30 % v/v de extracto diluido.

CONCLUSIONES

1. El extracto de hojas de olivo presentó una concentración de fenoles de 18,854 μg EAT/ml de extracto.
2. En términos generales, el extracto fenólico de hojas de olivo, presentó actividad biológica antimicrobiana inmediata contra bacterias aerobias mesófilas.
3. En términos estrictos, el extracto de hojas de olivo obtenido tiene un alto poder bactericida en las concentraciones de 20 % y 30 %; sobre todo en esta última, reduciendo la carga bacteriana en un 50 y 80 % respectivamente a los 10 minutos post tratamiento.
4. El extracto a la temperatura de conservación utilizada en la investigación que fue de 25 °C, pierde rápidamente su poder antibacteriano. Por lo observado la concentración y el efecto antibacteriano se relacionan inversamente por el efecto de la temperatura y el tiempo de conservación.

5. Se concluye que para un mejor y prolongado efecto antibacteriano, el extracto de hojas de olivo debe ser añadido a la carne lo más pronto posible al sacrificio del animal de modo que se reduzca la proliferación de bacterias durante el tiempo que la carne es trasladada a su punto de venta; una vez allí requerirá ser tratada nuevamente e inmediatamente conservada a temperatura de refrigeración; todo esto debido a que una elevada población bacteriana inicial disminuye el poder antibacteriano del extracto y reduce su efecto.

6. La concentración de 10 % es la que obtuvo resultados no satisfactorios, aunque mantuvo una carga bacteriana menor en comparación con la muestra testigo, pero no tan relevante como las otras dos concentraciones.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda obtener extractos fenólicos en otras épocas del año y/o ciclos del olivo, para poder determinar la variación que hay en el contenido de fenoles y para evaluar la variación del efecto antimicrobiano; de modo que respectivamente, los datos obtenidos sirvan para poder desarrollar un método de extracción con rendimientos altos de compuestos fenólicos y para poder determinar las mejores condiciones de la hoja con las cuales se pueda obtener un mejor efecto antimicrobiano; pues de ello dependerá si vale o no la pena su aprovechamiento en la industria alimentaria.
2. Para futuras investigaciones relacionadas al poder antimicrobiano del extracto de hojas de olivo, se recomienda trabajar a bajas temperaturas (refrigeración) de modo que se obtengan datos que busquen mejorar la acción antimicrobiana del EFHO.
3. Se recomienda trabajar sobre muestras de carne grasa; de modo que se pueda comprobar si el poder antimicrobiano del extracto de hojas de olivo se ve afectado por la presencia de grasa.

4. Se recomienda continuar con la investigación de las propiedades antimicrobianas del EFHO, para lo cual se propone ensayar sobre bacterias aisladas de importancia alimentaria, buscando obtener datos que permitan determinar el efecto exacto sobre cada uno de estos microorganismos.
5. Se recomienda realizar estudios que permitan determinar con certeza el o los mecanismos de acción antibacteriana de los componentes fenólicos del EFHO.
6. Se recomienda, analizar por cromatografía el extracto de hojas de olivo para poder determinar de manera específica los componentes fenólicos que se presentan, de modo que se pueda tener una visión más amplia y detallada del compuesto de trabajo.
7. Se recomienda atomizar el extracto con lo que se obtendrá un polvo, con el cual se traten muestras cárnicas de preferencia, obtener datos, resultados y realizar comparaciones con el extracto en estado líquido que nos permitan determinar posibles diferencias en relación a su efecto antimicrobiano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

➤ **Libros**

1. ARGUEDAS P. (1998). *Control de calidad para animales de granja*. Editorial EUNED. Costa Rica.
2. BARREIRO, J.; SANDOVAL A. (2006). *Operaciones de Conservación de Alimentos por Bajas Temperaturas*. Editorial Equinoccio. Venezuela.
3. JAY J. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. España.
4. NTP 201.018 2001 Carne y productos cárnicos. Prácticas de higiene para carne fresca. Requisitos.
5. ORTUÑO M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Editorial Aiyana. España.
6. NTS N° 071-. MINSA/DIGESA-V.01 Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad de alimentos y bebidas de consumo humano. 27 de agosto del 2008. Perú
7. VENEGAS et al. 1990. *Control Microbiológico de Alimentos, Técnicas Actualizadas y Métodos Acelerados*. Editorial Santiago. Universidad de Chile.

➤ **Tesis**

1. ARGÜELLO J. “*Evaluación del efecto antimicrobiano del lactato de sodio en la conservación de la carne molida de res*”. Tesis (Título). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 2010.
2. CRUZ A. “*Evaluación de la actividad antibacteriana de cepas híbridas de *Pleurotus spp.**”. Tesis (Maestría). Instituto Politécnico Nacional. 2011. México.
3. ESTRADA, S. “*Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*rosmarinus officinalis*) y tomillo (*thymus vulgaris*)*”. Tesis (Doctorado). Escuela Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 2010
4. GONZÁLES A. “*Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A*”. Tesis (Doctorado). Universidad Complutense de Madrid. España. 2010.
5. GONZÁLES C. “*Efecto antioxidante y antihipertensivo de diferentes compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen in vitro*”. Tesis (Doctorado). Universidad Rovira i Virgili. España. 2009.
6. GONZÁLES M. “*Estudio de los efectos cardiovasculares y la absorción oral del hidroxitirosol en modelos animales y*

- humanos*". Tesis (Doctorado). Universidad de Granada. España. 2005.
7. JIMÉNEZ P. "*Efecto de la Adición de Extractos de Hojas de Olivo o Palto en la Estabilidad Termooxidativa de Aceites de diferente Insaturación*". Tesis (Doctorado). Universidad de Chile. 2010.
 8. LIZCANO A. Y VERGARA J. "*Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Herperomeles ferruginea, Myrciantes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos*". Tesis (Título). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 2008.
 9. MATEAUDA J. "*Estudio de la microflora bacteriana y cambios fisicoquímicos en carne bovina envasada al vacío y almacenada en frío*". Tesis (Título). Universidad de la República de Uruguay. Uruguay. 2013.
 10. MORILLO J. "*Biorremediación del alperujo: estudio de la microbiota asociada y producción de exopolisacárido jamilano*". Tesis (Doctorado). Universidad de Granada. España. 2007.
 11. PEÑA E. "*Caracterización de una solución conservante (salmuera) para incrementar la vida útil de los huevos de*

- codorniz cocidos y pelados*". Tesis (Título). Universidad Cesar Vallejo. Perú. 2013.
12. QUIRANTES, R. "*Caracterización y Estudios Metabólicos de Compuestos Fenólicos Bioactivos mediante Técnicas Separativas Acopladas a Espectrofotometría de Masas*". Tesis (Doctorado). Universidad de Granada. 2012.
13. RAMÍREZ M. "*Variabilidad de la producción en olivo (Olea europea L.) relación entre la alternancia, floración, vigor y productividad*". Tesis (Doctorado). Universidad de Córdoba. España. 2001.
14. ROBLES M. "*Efecto de extractos de productos naturales para controlar la presencia de Campylobacter jejuni y Salmonella spp. en carne molida de pollo*". Tesis (Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 2010.
15. SERRA B. "*Desarrollo de electrodos compósitos enzimáticos para la detección y determinación de compuestos fenólicos*". Tesis (Doctorado). Universidad Complutense de Madrid. España. 2002.
16. TICONA W. "*Efecto de harina de hojas de olivo (Olea europea var. Sevillana) en el crecimiento y engorde de cuyes (Cavia*

- porcellus*) en la región Tacna”. Tesis (Título). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Perú. 2013.
17. TRUJILLO M. “Efecto de las infusiones de encino comestibles *Quercus sideroxyla* y *Quercus durifolia* sobre marcadores histopatológicos y moleculares en cáncer de colon”. Tesis (Maestría). Universidad Autónoma de Querétaro. México. 2010.
18. URZUA C. “Análisis y evaluación de la inclusión de extracto de hojas de olivo libre y encapsulado en matrices de almidón y gluten”. Tesis (Título). Universidad de Chile.
19. USAQUEN S. “Aprovechamiento y valorización del alperujo tratado térmicamente como: fertilizante biológico y fuente de hidroxitirosol”. Tesis (Título). Pontificia Universidad Javeriana. España. 2008.
20. VECIANA C. “Evaluación *in vitro* e *in vivo* del potencial bioactivo sobre neuroprotección obesidad de un extracto de olivo”. Tesis (Doctorado). Universidad Miguel Hernández. España. 2013.
21. VÉLEZ M. Y VILLA N. “Identificación y cuantificación de antraquinonas y cromonas en plantas de *Aloe vera* cultivadas en municipios de Risaralda por cromatografía líquida de alta eficiencia”. Tesis (Título). Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 2012.

➤ **Bibliografía Digital**

1. ALVIS, A. et al., (2012). “*Obtención de extractos hidroalcohólicos de limoncillo (Cymbopogon citratus) como antioxidante natural*”. Universidad de Córdoba. Colombia.

Recuperado de:

<http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v23n2/art02.pdf>

2. CASTILLO J., RUÍZ C. (2014). Revista Nature Science “Problemas Alimenticios”.

Recuperado de:

<http://es.calameo.com/read/004385151c07227740d9a>

3. DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE LOS EE.UU. (USDA). Servicio de Investigación Agrícola.

Recuperado de:

<http://www.cobeef.com/CMDocs/ColoradoBC/Spanish%20lean%20cuts.pdf>

4. ELIKA. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013). *Bacillus Cereus*. España.

Recuperado de:

http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento96/8.Bacillus.pdf

5. FERRANT Ma. (2015). *Hidroxitirosol, el mejor antioxidante natural y el más desconocido. Estudio comparativo con otros antioxidantes*. Recuperado de:
<http://openaccess.uoc.edu/webapps/o2/bitstream/10609/43501/6/mferranfTFM0715memoria.pdf>
6. GARCÍA R. Y PALOU E. (2008). *Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol*. México.
Recuperado de [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf)
7. GÓMEZ, A. et al. (2012). *Optimización de la Extracción de Compuestos Fenólicos Naturales a partir de Orujos de Uva*. Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada. Universidad de Castilla – La Mancha. España.
Recuperado de:
<http://www.uclm.es/area/cta/cesia2012/cd/PDFs/2-MOD/MOD-P10T.pdf>
8. HENNEN W. *Factor de transferencia mejorado*. Woodland Publishing. 2000. España.
Recuperado de:
<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/nomadas/transferfactor/s/hennen.html>

9. IBAÑEZ, F., TORRES P., IRIGOYEN A., (2003). *Aditivos Alimentarios*. Universidad Pública de Navarra.

Recuperado de:

http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_agosto_03/funcionales/aditivos.pdf

10. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO. *Anuario Producción agrícola 2013 - MINAGRI*. (2013). Perú.

Recuperado de

<http://siea.minag.gob.pe/siea/?q=publicaciones/anuarios-estadisticos>

11. MORALES A. (2007). *Evaluación de cambios microbiológicos, pH, actividad de agua y color de tallarines instantáneos con vegetales y sabor a pollo bajo temperatura de deterioro acelerado*. Honduras.

Recuperado de:

<http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/596/1/T2444.pdf>

12. NORMA MEXICANA – FF- 081 – 2003. *Productos Pecuarios. Carne de Porcino en Canal - Calidad de la Carne – Clasificación*.

Recuperado de:

<http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-081-2003.PDF>

13. ÓLEA. 2013. ¿Qué son los compuestos fenólicos del aceite de oliva?

Recuperado de:

<https://aceiteolea.wordpress.com/2013/03/17/que-son-los-compuestos-fenolicos-del-aceite-de-oliva/>

14. OLIVIR. EXTRACTO DE HOJA DE OLIVO - DIALNET.1999.

Natura Medicatrix.

Recuperado de:

<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4986106.pdf>

15. PINEDA M. (2003). *Proceso de elaboración de alimentos y bebidas.*

Recuperado de:

https://books.google.com.pe/books?id=PxrIhy9UbZkC&pg=PA413&dq=conservantes+alimentarios&hl=es&sa=X&ved=0CC0Q6AEwBDgKahUKEwi_3Lp8pPJAhVIQSYKHWFVCEw#v=onepage&q=conservantes%20alimentarios&f=false

16. QUEZADA, L. et al. (2005). *Frecuencia de reposición hídrica en olivos (Olea europaea L.) bajo riego por goteo en un suelo franco arcilloso.*

Recuperado de:

http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0304-88022005000200007&script=sci_arttext

17. RESTREPO, D. et al., (2001). *Industria de Carnes*. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellin.

Recuperado de:

<http://decarnes.wikispaces.com/file/view/Libro+de+carnes.pdf>

18. RODRÍGUEZ E. (2011). *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas*. Revista Ra Ximhai, Vol. 7, Número 1, Enero- Abril, 2011. México.

Recuperado de:

<http://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>

19. RONCALES, P. (2010). *Discurso de Recepción Académica “Optimización de los sistemas de envasado y de la conservación de alimentos”*. Academia de Farmacia Reino de Aragón – Zaragoza - España.

Recuperado de:

<http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento33.pdf>

20. RUBIO M., BRAÑA D. Y MÉNDEZ R. (2012). *Carne de res mexicana*.

Recuperado de:

[http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/MANUALES
%20INIFAP/Manual%20Carne%20de%20Res%20Mexicana.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/MANUALES%20INIFAP/Manual%20Carne%20de%20Res%20Mexicana.pdf)

21. SERRANO D. (2014). *Plan experimental número 1*. España.

Recuperado de:

[http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/134928/TRSE
.pdf?sequence=1](http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/134928/TRSE.pdf?sequence=1)

22. TABERA J. et al. (2005). "*Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo*", Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. Número de Publicación Internacional WO 2005/075614 A1. España.

Recuperado de:

[http://digital.csic.es/bitstream/10261/34077/1/WO2005075614A1.
pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/34077/1/WO2005075614A1.pdf)

23. UREÑA J. (2009). *Manual de buenas prácticas agrícolas en los cultivos de café en asocio con aguacate. Costa Rica*.

Recuperado de:

[http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual/bibliotecavirtual/a00190.
pdf](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual/bibliotecavirtual/a00190.pdf)

ANEXOS

ANEXO 1: Recomendaciones de uso de placas petrifilm

3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios

Recomendaciones de uso

Para información detallada sobre ADVERTENCIAS, PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

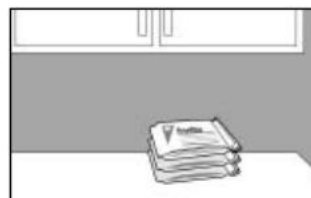
Almacenamiento



1 Almacene los paquetes cerrados a una temperatura ≤ 8 °C (≤ 46 °F). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.



2 Para cerrar un paquete abierto, doble el extremo y séllelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.



3 Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperatura ≤ 25 °C (≤ 77 °F) y una humedad relativa $\leq 50\%$. **No refrigere los paquetes que ya hayan sido abiertos.** Utilice las Placas Petrifilm máximo un mes después de abierto el paquete.

Preparación de la muestra



4 Prepare una dilución de 1:10 de la muestra. Pese o pipete la muestra en una funda o bolsa de Stomacher, botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril apropiado.



5 Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de KH_2PO_4 y con pH ajustado a 7.2); agua de peptonada al 0.1%; diluyente de sal peptonada (método ISO 6887); *buffer* de agua peptonada (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada.

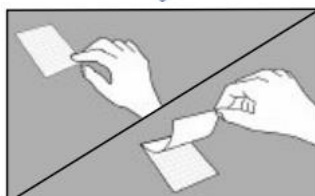


6 Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

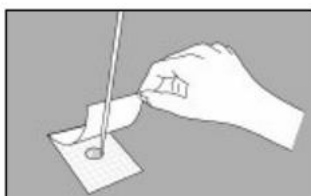
Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:
• Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH.
• Para productos básicos: use solución 1N de HCl.

No utilice *buffers* que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento.

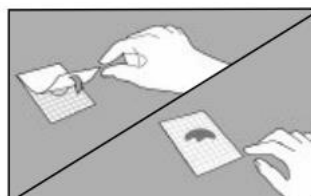
Inoculación



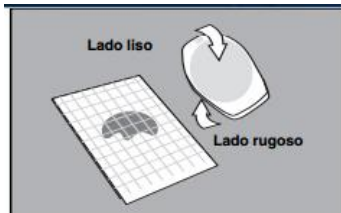
7 Coloque la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la película superior.



8 Con la Pipeta Electrónica 3M™, o una pipeta equivalente perpendicular a la Placa Petrifilm, coloque 1 mL de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.



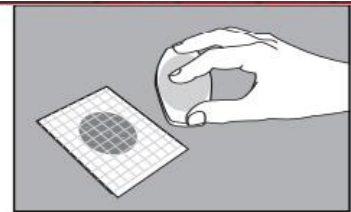
9 Libere la película superior dejando que caiga sobre la dilución. **No** la deslice hacia abajo.



10 Con el lado rugoso hacia abajo, coloque el dispersor o esparcidor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.

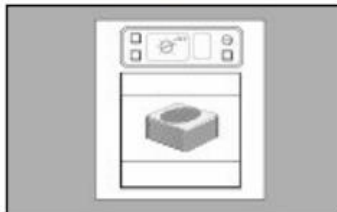


11 Presione suavemente el dispersor o esparcidor para distribuir la muestra sobre el área circular. No gire ni deslice el dispersor. Recuerde distribuir la muestra antes de inocular una siguiente placa.



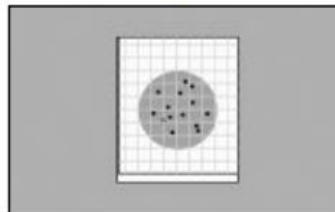
12 Levante el dispersor o esparcidor. Espere por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceda a la incubación.

Incubación

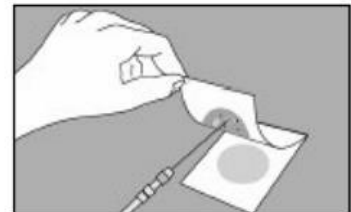


13 Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

Interpretación



14 Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la "Guía de interpretación" para leer los resultados.



15 Las colonias pueden ser aisladas para su identificación posterior. Levante la película superior y recoja la colonia del gel.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método. Los métodos aprobados más conocidos son:

- **AOAC método oficial 986.33 & 989.10**
(leche y productos lácteos)
Incubar 48 h \pm 3 h a 32 °C \pm 1 °C.
- **AOAC método oficial 990.12**
Incubar 48 h \pm 3 h a 35 °C \pm 1 °C.
- **AFNOR método validado 3M 01/1-09/89**
Incubar 72 h \pm 3 h a 30 °C \pm 1 °C.

Comentarios adicionales

• Para contactar localmente a 3M Microbiología en Latinoamérica, visítenos en nuestra página de internet: www.3m.com/microbiology

• Para servicio técnico en Latinoamérica, contacte la dirección serviciotecnico@mmm.com o llame al 5255-5270-2223.

3M

3M Microbiology
3M Center Bldg. 275-5W-05
St. Paul, MN 55144-1000
USA
1800-228-3957
microbiology@mmm.com

3M México
Av. Santa Fe 190
Col. Santa Fe, CP 01210
México, DF
Tel. (55-52) 5270-0454
01 800-712-2527
microbiologiamx@mmm.com

3M Argentina
Olga Cossetini 1031
Buenos Aires,
CP C1107CEA
Argentina
Tel. (54-11) 4339-2400
microbiologia-ar@mmm.com

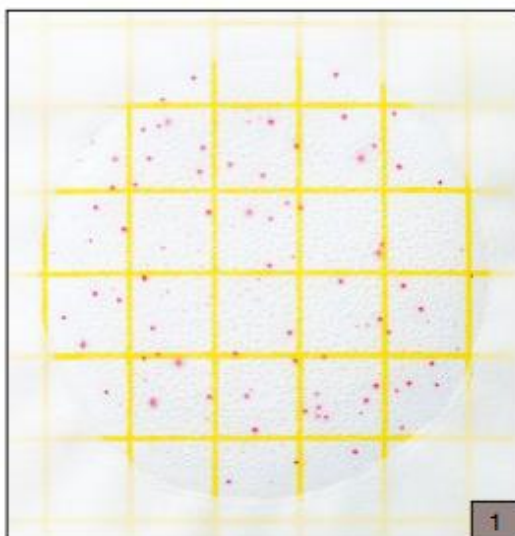
Petrifilm es una marca registrada de 3M.
Impreso en México.
Revisión: 2006-01.
Referencia: 70-2008-8102-0.

Fuente: 3M, 2015.

ANEXO 2: Guía de interpretación para el recuento de bacterias

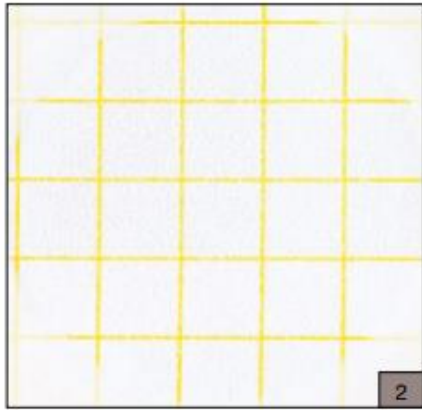


Las Placas Petrifilm para Recuento de Aerobios (Aerobic Count AC) son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría, y un tinte indicador de color rojo que facilita el recuento de las colonias. Las Placas Petrifilm AC se utilizan para el recuento de la población total existente de bacterias aerobias en productos, superficies, etc.

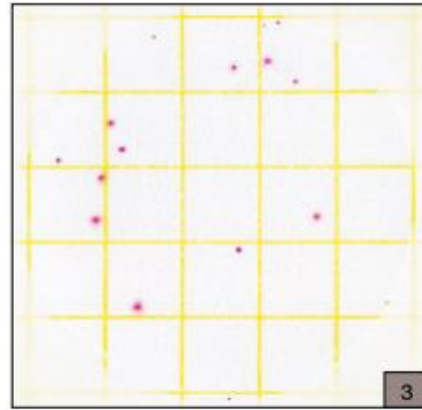


Recuento de bacterias aerobias =152

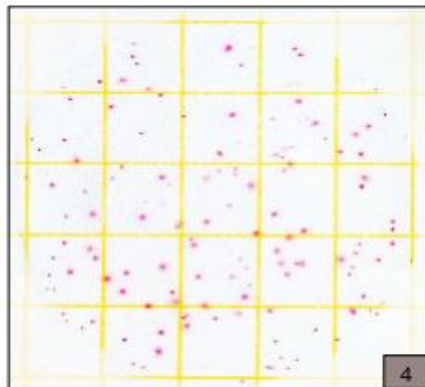
El tinte indicador rojo que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Cunte todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo.



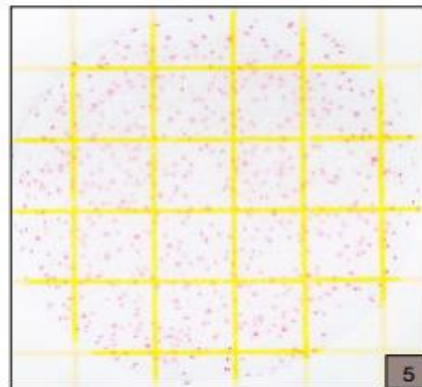
Recuento de bacterias aerobias = 0
 La Placa Petrifilm para Recuento de Aerobios es de fácil interpretación. La figura 2 muestra una placa sin crecimiento de colonias.



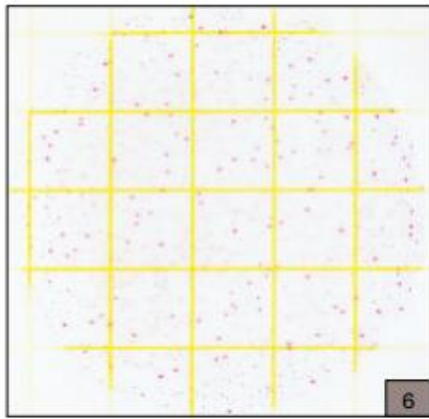
Recuento de bacterias aerobias = 16
 La figura 3 muestra una Placa PetrifilmAC con crecimiento bajo de colonias.



Recuento de bacterias aerobias = 143
 El rango recomendado de recuento en la Placa PetrifilmAC está entre 25-250 colonias. Obsérvese la figura 4.

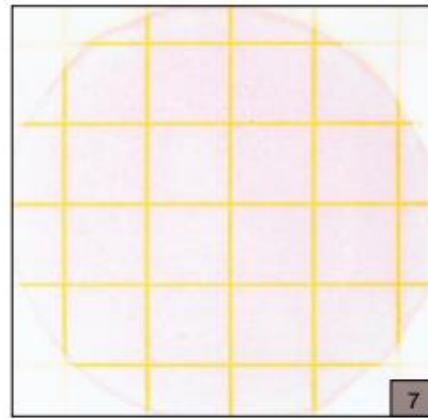


Recuento de bacterias aerobias = 560
 “estimado” Cuando el número de colonias es mayor a 250 (como se puede observar en la figura 5), por su excesivo crecimiento, los recuentos deben ser estimados. Determine el promedio de colonias en un cuadrado (1 cm²) y multiplíquelo por 20 para obtener el recuento total por placa. El área de inoculación de PetrifilmAC es de 20 cm²



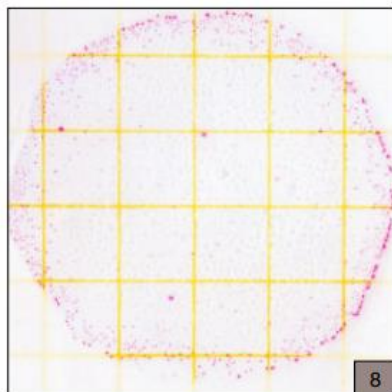
Recuento de bacterias aerobias = MNPC
Recuento estimado: 103

La figura 6 muestra una Placa PetrifilmAC con colonias muy numerosas para contar.



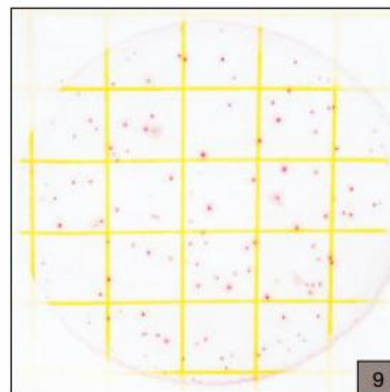
Recuento de bacterias aerobias = MNPC
Recuento estimado: 105

Con recuentos muy altos, el área total de crecimiento puede virar o colorearse rosa, como se muestra en la figura 7. Usted podría observar colonias individuales sólo en el filo o borde del área de crecimiento. Registre este conteo como muy numeroso para contar (MNPC).



Recuento de bacterias aerobias = MNPC
Recuento estimado: 103

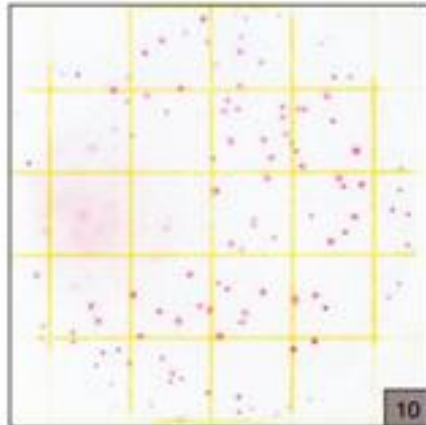
Ocasionalmente, la distribución de las colonias puede aparecer de forma desigual, no homogénea, como se muestra en la figura 8. Esto también es una indicación de un resultado MNPC.



Recuento de bacterias aerobias = MNPC
Recuento estimado: 107

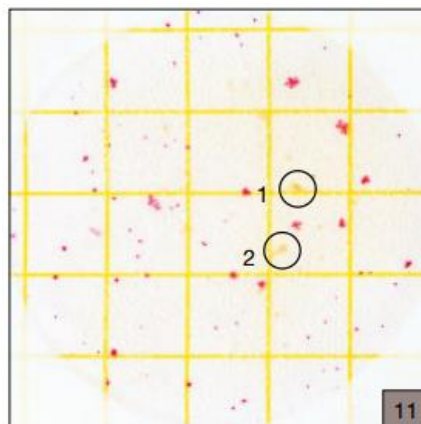
Las colonias de la figura 9 podrían confundirse como contables a primera vista. Sin embargo, si usted observa detalladamente el borde o filo del área de crecimiento, podrá visualizar una alta concentración de colonias. Registre este resultado como MNPC.

Licuefacción del gel y partículas de alimentos



Recuento de bacterias aerobias = 160

Como se aprecia en la figura 10, algunas especies de bacterias pueden llegar a licuar el gel de las Placas Petrifilm AC. Cuando esto ocurra, determine el promedio en los cuadros no afectados y estime los resultados



Recuento de bacterias aerobias = 83

Debido a que las Placas Petrifilm AC las colonias de aerobios se tiñen de rojo, se las puede diferenciar de partículas o residuos de producto, ya que éstos tienen una forma irregular y color opaco (Observe los círculos 1 y 2 de la figura 11)

Fuente: 3M Microbiology

ANEXO 3: Constancia de asesoramiento para el desarrollo de los análisis microbiológicos.



Universidad Nacional "Jorge Basadre Grohmann" - Tacna
FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Académico Profesional de: Biología-Microbiología y Física Aplicada



CONSTANCIA

Yo, Dr. César Julio Cáceda Quiróz, identificado con DNI 00791214 jefe del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, hago constar que:

El bachiller Kerly Alexis Campos Montenegro, identificado con DNI. 45836788, ha realizado la etapa de análisis microbiológico, específicamente recuento de bacterias aerobias mesófilas de acuerdo al desarrollo de su tesis titulada "Evaluación del efecto del extracto fenólico de hojas de olivo (*Olea europaea L.*) var. sevillana sobre bacterias aerobias mesófilas y características organolépticas de la carne de res fresca magra"; durante el periodo comprendido desde el 12 de setiembre hasta el 15 de octubre, tiempo durante el cual se le brindo el asesoramiento respectivo.

Se extiende la presente constancia a solicitud del interesado, para los fines que estime conveniente.

Tacna, 21 de Diciembre del 2015

.....
MGR. CÉSAR JULIO CÁCEDA QUIRÓZ
Jefe del Laboratorio de Microbiología

Dr. CÉSAR JULIO CÁCEDA QUIRÓZ

Jefe de Laboratorio de Microbiología
Ciudad Universitaria "Almudena" s/n

Apartado 316 Teléfono:052-583000 Anexo: 2102 - Fax: 2101

ANEXO 4: Lecturas de absorbancia y determinación de la concentración de BAM por interpolación de valores.

Tubo	µg de AT	Absorbancia 725 nm
Tubo 1 (T)	0	0.0009
Tubo 2	2	0.0280
Tubo 3	4	0.0458
Tubo 4	6	0.0770
Tubo 5	8	0.1008
Extracto	P	0.1399
Tubo 6	10	0.1556

T= Testigo; P= Cantidad de fenoles totales en el extracto a determinar según curva de calibración. Expresado en µg AT

Fuente: Elaboración propia, 2015

Fórmula de Interpolación:

$$(Y - Y1) = \frac{(X - X1)}{X2 - X1} (Y2 - Y1)$$

Datos:

Y1= 8	X1= 0.1008
Y= P	X= 0.1399
Y2= 10	X2= 0.1556

Reemplazando:

$$(P - 10) = \frac{(0.1399 - 0.1556)}{(0.1008 - 0.1556)} (8 - 10)$$

$$(P - 10) = \frac{-0.0157}{-0.0548} (-2)$$

$$(P - 10) = -0.286$$

$$P = 9.427 \mu\text{g equivalentes de AT}$$

Pero; como se usaron 500 μl o lo que e igual 0.5 ml de extracto de hojas de olivo para calcular la absorbancia, entonces tenemos que:

$$\begin{array}{l} 0.5 \text{ ml de extracto ----- } 9.427 \mu\text{g equivalentes de AT} \\ 1 \text{ ml de extracto ----- } X \\ X = 18.854 \mu\text{g equivalentes de AT (EAT)} \end{array}$$

Por lo cual se puede definir que el contenido de fenoles totales en el extracto de hojas de olivo obtenido en la investigación es de:

18.854 μg EAT/ml de extracto

ANEXO 5: Base de datos para análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento.

Recuento	Concentración	Muestra	Tiempo de tratamiento
273	0%	A(*)	10 MINUTOS
134	10%	A	10 MINUTOS
140	20%	A	10 MINUTOS
56	30%	A	10 MINUTOS
144	0%	B(*)	10 MINUTOS
70	10%	B	10 MINUTOS
55	20%	B	10 MINUTOS
51	30%	B	10 MINUTOS
645	0%	C(*)	10 MINUTOS
470	10%	C	10 MINUTOS
327	20%	C	10 MINUTOS
317	30%	C	10 MINUTOS

(*) Muestras testigo

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS v.20.

ANEXO 6: Tabla ANOVA del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: RECUENTO DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS ($\times 10^3$ ufc/g)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	369295,167 ^a	5	73859,033	20,049	,001
Intersección	599427,000	1	599427,000	162,712	,000
CONCENTRACION	78699,667	3	26233,222	7,121	,021
MUESTRA	290595,500	2	145297,750	39,441	,000
Error	22103,833	6	3683,972		
Total	990826,000	12			
Total corregida	391399,000	11			

a. R cuadrado = ,944 (R cuadrado corregida = ,896)

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS V.20.

ANEXO 7: Tabla de homogeneidad de varianzas del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento.

Prueba de homogeneidad de varianzas

RECuento DE BACTERIAS
AEROBIAS MESOFILAS (x 10³ ufc/g)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,910	3	8	,478

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS V.20.

ANEXO 8: Prueba de Tukey del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: RECUENTO DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS ($\times 10^3$ ufc/g)

DHS de Tukey		Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
(I)DE EXTRACTO DE HOJAS DE OLIVO (%)	(J)DE EXTRACTO DE HOJAS DE OLIVO (%)				Límite inferior	Límite superior
0%	10%	129,33	49,558	,138	-42,22	300,89
	20%	180,00	49,558	,041	8,44	351,56
	30%	212,67	49,558	,020	41,11	384,22
10%	0%	-129,33	49,558	,138	-300,89	42,22
	20%	50,67	49,558	,744	-120,89	222,22
	30%	83,33	49,558	,407	-88,22	254,89
20%	0%	-180,00	49,558	,041	-351,56	-8,44
	10%	-50,67	49,558	,744	-222,22	120,89
	30%	32,67	49,558	,909	-138,89	204,22
30%	0%	-212,67	49,558	,020	-384,22	-41,11
	10%	-83,33	49,558	,407	-254,89	88,22
	20%	-32,67	49,558	,909	-204,22	138,89

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 3683.972.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS V.20.

ANEXO 9: Subconjuntos homogéneos del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a los 10 minutos post tratamiento.

RECuento DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS (x 10³ ufc/g)

DHS de Tukey

DE EXTRACTO DE HOJAS DE OLIVO (%)	N	Subconjunto	
		1	2
30%	3	141,33	
20%	3	174,00	
10%	3	224,67	224,67
0%	3		354,00
Sig.		,407	,138

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 3683,972.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = .05.

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS V.20.

ANEXO 10: Base de datos para análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento.

Recuento	Concentración	Muestra	Tiempo de tratamiento
3590	0%	A (*)	3 HORAS
2110	10%	A	3 HORAS
2565	20%	A	3 HORAS
2355	30%	A	3 HORAS
2855	0%	B (*)	3 HORAS
1205	10%	B	3 HORAS
365	20%	B	3 HORAS
350	30%	B	3 HORAS
5270	0%	C (*)	3 HORAS
4680	10%	C	3 HORAS
4475	20%	C	3 HORAS
3975	30%	C	3 HORAS

(*) Muestras testigo

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS v.20.

ANEXO 11: Tabla ANOVA del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: RECUENTO DE COLONIAS DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS
(x 10³ ufc/g)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	28391810,417 ^a	5	5678362,083	27,066	,000
Intersección	95175168,750	1	95175168,750	453,649	,000
CONCENTRACION	5030722,917	3	1676907,639	7,993	,016
MUESTRA	23361087,500	2	11680543,750	55,675	,000
Error	1258795,833	6	209799,306		
Total	124825775,000	12			
Total corregida	29650606,250	11			

a. R cuadrado = ,958 (R cuadrado corregida = ,922)

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS V.20.

ANEXO 12: Tabla de homogeneidad de varianzas del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento.

Prueba de homogeneidad de varianzas

RECuento DE COLONIAS DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS (x 10³ ufc/g)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,190	3	8	,900

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS V.20.

ANEXO 13: Prueba de Tukey del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: RECUENTO DE COLONIAS DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS (x 10³ ufc/g)
DHS de Tukey

(I) [] DE EXTRACTO DE HOJAS DE OLIVO (%)	(J) [] DE EXTRACTO DE HOJAS DE OLIVO (%)	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0%	10%	1240,00	373,987	,059	-54,63	2534,63
	20%	1436,67	373,987	,033	142,03	2731,30
	30%	1678,33	373,987	,016	383,70	2972,97
10%	0%	-1240,00	373,987	,059	-2534,63	54,63
	20%	196,67	373,987	,950	-1097,97	1491,30
	30%	438,33	373,987	,664	-856,30	1732,97
20%	0%	-1436,67	373,987	,033	-2731,30	-142,03
	10%	-196,67	373,987	,950	-1491,30	1097,97
	30%	241,67	373,987	,913	-1052,97	1536,30
30%	0%	-1678,33	373,987	,016	-2972,97	-383,70
	10%	-438,33	373,987	,664	-1732,97	856,30
	20%	-241,67	373,987	,913	-1536,30	1052,97

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 209799,306.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS v.20.

ANEXO 14: Subconjuntos homogéneos del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 3 horas post tratamiento.

RECUENTO DE COLONIAS DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS (x 10³ ufc/g)

DHS de Tukey

[] DE EXTRACTO DE HOJAS DE OLIVO (%)	N	Subconjunto	
		1	2
30%	3	2226,67	
20%	3	2468,33	
10%	3	2665,00	2665,00
0%	3		3905,00
Sig.		,664	,059

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 209799,306.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = .05.

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS v.20.

ANEXO 15: Tabla ANOVA del análisis estadístico de las réplicas A, B y C a las 5 horas post tratamiento.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: COLONIAS DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS (x 10³ ufc/g)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	94462229166,667 ^a	5	18892445833,333	15,492	,002
Intersección	397670020833,333	1	397670020833,333	326,093	,000
CONCENTRACION	5787062500,000	3	1929020833,333	1,582	,289
MUESTRA	88675166666,667	2	44337583333,333	36,357	,000
Error	7317000000,000	6	1219500000,000		
Total	499449250000,000	12			
Total corregida	101779229166,667	11			

a. R cuadrado = ,928 (R cuadrado corregida = ,868)

Fuente: Elaboración propia, 2015. SPSS V.20.