

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA



**“USO DE TANINOS LIOFILIZADOS DE CAESALPINIA SPINOSA (TARA)
PARA LA INHIBICIÓN DE *Escherichia Coli* Y BACTERIAS AEROBIAS
MESÓFILAS EN COLOIDES EMULSIONADOS DE CARNE DE RES PARA LA
ELABORACION DE HAMBURGUESAS”**

SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO QUÍMICO

Presentado por :

MARÍA DEL PILAR HERNÁNDEZ GUZMÁN

Asesor :

Ing. Mg. LIDA CARMEN SANEZ FALCÓN

Two handwritten signatures are present on the right side of the page. The top signature is in black ink and appears to be 'Lida Carmen Sanez Falcón'. The bottom signature is in blue ink and appears to be 'María del Pilar Hernández Guzmán'.

CALLAO- PERÚ

2012

PRÓLOGO DEL JURADO

La presente Tesis fue sustentada ante el JURADO DE SUSTENTACION conformado por los siguientes Docentes Ordinarios:

Ing. Carlos Alejandro Ancieta Dextre : Presidente

Ing. Maria Estela Toledo Palomino : Secretaria

Ing. Albertina Díaz Gutiérrez : Vocal

Ing. Lida Carmen Sanz Falcón : Asesora

tal como está asentado en el Libro de Actas de Sustentación de Tesis N°02 , Folio N°48, Acta N°231, de fecha Trece de Diciembre del 2011, para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico en la modalidad de Titulación con Sustentación de Tesis , de acuerdo a lo normado por el Reglamento de Grados y títulos aprobado por Resolución N°082-2011 - CU de fecha 29 de Abril del 2011.

AGRADECIMIENTOS

Al Biólogo Edgar Zárate, por su especial dedicación de asesoría a la presente tesis, por su apoyo constante en pro de la investigación y por compartir sus conocimientos y experiencias. Gracias por estar pendiente de mi investigación de manera desinteresada y por brindarme siempre una respuesta.

Agradezco al Dr. José Ramón Cáceres, por facilitarme las instalaciones del Centro Experimental Tecnológico de la Universidad Nacional del Callao para realizar la presente tesis.

Al Decano de la Facultad de Ingeniería Química –UNAC, Magister Pablo Díaz Bravo y demás autoridades por su apoyo brindado.

Al Sr. Walter Paulino, encargado del Centro experimental de Investigación-UNAC, por su confianza brindada y por su compromiso brindado para concluir con mis experiencias en los Laboratorios.

A los bachilleres Taipe Fredy, Natividad Leynard y Alvarez Erick, y a todas las demás personas que me otorgaron su apoyo en etapas muy importantes de la tesis.

DEDICATORIA

Durante este año ha habido momentos inolvidables, para alegrarse, para entristecerse, pero sobre todo para sentirse orgullosa de haber terminado un camino bastante largo; cuando ya estoy a puertas de graduarme, me doy cuenta de tantos momentos que tal vez, pasaron desapercibidos, y ahora llegan como buenos recuerdos.

Con alma y corazón dedico mi tesis a Dios quien en momentos difíciles dió luz a mi camino y sabiduría para elegir la senda del triunfo. Con mucha gratitud, afecto, respeto y meritorio valor a mis padres Pablo y Rosa, por lograr una hija profesional haciendo lo posible de lo imposible, mi hermana Roxana, por sus constantes consejos y por su apoyo incondicional brindado para conseguir lograr terminar la presente Tesis, muchas gracias a todos ellos por ayudarme en momentos difíciles y alentarme a seguir adelante en mi vida.

Elevo una oración a la memoria de mi abuela Maria Pilar De La Cruz, quien me guió desde el cielo dándome fe y esperanza para seguir en el andar de mi vida, a mi abuela Mercedes Patrón, quien está muy delicada de salud y le hubiera gustado ver a su primera nieta graduada, y mi abuelo Oswaldo Guzmán, quien lucha el día a día a su lado para darle una mejor calidad de vida.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	
1.1 PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.1.1 Planteamiento del Problema	5
1.1.2 Problema Principal	6
1.1.3 Problemas Secundarios	6
1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	7
1.2.1 Objetivo General	7
1.2.2 Objetivos Específicos	7
1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	7
1.3.1 Justificación	7
1.3.2 Importancia	8
1.4 HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	9
1.4.1 Hipótesis General	9
1.4.2 Hipótesis Específicas	9
1.5 VARIABLES	10
1.5.1 Variables Dependientes	10
1.5.2 Variables Independientes	10
1.5.3 Relación de Variables	10
1.5.4 Operacionalización de variables	11

CAPÍTULO II. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 MARCO HISTÓRICO	13
2.2 MARCO TEÓRICO	18
2.2.1 Taninos	18
a. Definición	18
b. Clasificación	19
c. Propiedades	23
d. Características	28
e. Valoración	29
2.2.2 Emulsionado de Carne de Res	30
a. Definición	30
b. Clasificación	31
c. Composición	31
d. Microbiología del coloide emulsionado de carne de res	34
e. Contaminación microbiana en el coloide emulsionado de carne	36
2.3 MARCO CONCEPTUAL	37
2.3.1 Taninos de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> (Tara)	37
2.3.2 Coloide emulsionado de carne de res	38
2.3.3 Hamburguesa	39
2.3.4 Microorganismos aerobios mesófilos viables	39
2.3.5 Coliformes	40
2.3.6 Microorganismos patógenos	41
2.3.7 <i>Escherichia Coli</i>	43
2.3.8 Proceso de Liofilización	45

CAPÍTULO III. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 TIPO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN	46
3.1.1 Tipo de Investigación	46
3.1.2 Nivel de Investigación	46
3.2 MÉTODO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	46
3.2.1. Metodología de la Investigación	46
a. Obtención del extracto tánico de Tara	46
b. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	51
3.2.2 Diseño de la Investigación	54
3.3 UNIVERSO Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN	54
3.4 LOCALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	55
3.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	55
3.5.1 Obtención de las concentraciones experimentales del extracto tánico	55
3.5.2 Obtención de la concentración mínima inhibitoria (CIM) del Extracto Tánico de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> (Tara)	55
a. Insumos, Equipos y materiales de Laboratorio	55
b. Preparación de la cepa	58
c. Formación de Grupos Experimentales	58
3.5.3 Obtención del Coloide Emulsionado de carne de res para la elaboración de Hamburguesas	61
a. Insumos, materiales y equipos	61
b. Procedimiento	61
3.5.4 Determinación del Efecto Antibacteriano del Extracto Tánico en el Coloide emulsionado de carne	62
i. Efecto Antibacteriano del Extracto Tánico sobre <i>E.Coli</i> en el Coloide emulsionado de carne	62
ii. Efecto Antibacteriano del Extracto Tánico sobre Bacterias Aerobias Mesófilas en el Coloide emulsionado de carne	64

3.5.5	Determinación de la Actividad Antibacteriana de los Taninos Liofilizados a partir del Extracto Tánico de la Tara	66
	i. Tratamiento del Extracto Tánico de Tara	66
	ii. Obtención de los Taninos Liofilizados de la <i>Caesalpinia Spinosa</i>	66
	iii. Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Taninos Liofilizados de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> (Tara)	66
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS EXPERIMENTALES	67
3.6.1	Concentración Mínima Inhibitoria	67
3.6.2	Efecto de las Concentraciones del Extracto Tánico de Tara sobre el crecimiento bacteriano	68
	CAPÍTULO IV. RESULTADOS	69
	CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	117
	CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
6.1	CONCLUSIONES	124
6.2	RECOMENDACIONES	127
	REFERENCIALES	128
	APÉNDICES	133
	ANEXOS	144
	GLOSARIO	167

LISTA DE GRÁFICAS

- 3.1 Comparación de las Curvas de crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas del Grupo Control con los diferentes Grupos experimentales de Extracto Tánico de Tara (ETT).
- 3.2 Comparación de las Curvas de crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas de los diferentes Grupos experimentales de Extracto Tánico de Tara (ETT).
- 3.3 Comparación al detalle de las Curvas de crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas de los diferentes Grupos experimentales de Extracto Tánico de Tara (ETT).
- 3.4 Curva de crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas del Grupo Control en el Coloide Emulsionado de carne de res.
- 3.5 Curva de Crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas en el Grupo experimental (160 mg/mL) ETT.
- 3.6 Curva de Crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas en el Grupo experimental (320 mg/mL) ETT.
- 3.7 Comparación de las Curvas de crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* del Grupo Control con los diferentes Grupos experimentales de Extracto Tánico de Tara (ETT).
- 3.8 Comparación de las Curvas de crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* de los diferentes Grupos experimentales de Extracto Tánico de Tara (ETT).

- 3.9 Comparación al detalle de las Curvas de crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* de los diferentes Grupos experimentales de Extracto Tánico de Tara (ETT).
- 3.10 Comparación de las Curvas de crecimiento modificado de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* del Grupo Control con los diferentes grupos experimentales de ETT.
- 3.11 Curva de crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* del Grupo Control en el Coloide Emulsionado de carne de res.
- 3.12 Curva de Crecimiento de bacterias patógenas de *Escherichia Coli* en el Grupo experimental (160 mg/mL) ETT.
- 3.13 Curva de Crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* en el Grupo experimental (320 mg/mL) ETT.

LISTA DE FIGURAS

- 2.1 Estructura Química base de los Taninos.
- 2.2 Clasificación de los Taninos.
- 2.3 Taninos Hidrolizables.
- 2.4 Reacción del flavonoide con el Bisulfito.
- 2.5 Tanino de la Tara.
- 2.6 Características macro y microoscópicas de *E. Coli*.
- 2.7 Equipo de Liofilización de placas.
- 3.1 Siembra en placa petri de *Escherichia Coli* en Agar Mc.Conkey.
(Cepa aislada en placa).
- 3.2. Siembra en placa petri de Bacterias Aerobias Mesófilas en Agar Nutritivo
- 4.1. *Caesalpinia Spinosa* (Tara).
- 4.2 Vainas de la *Caesalpinia Spinosa* lavadas y secadas a temperatura ambiente.
- 4.3 Separación de las vainas de la *Caesalpinia Spinosa* oxidadas en la Selección de la materia prima.
- 4.4 Maceración de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) en el solvente Hidroalcohólico.
- 4.5. Ensayos Biológicos con diferentes concentraciones de extractos tánicos a partir de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) frente a los microorganismos seleccionados: Técnica de difusión en Agar sobre la *Escherichia Coli* y Aerobios Mesófilos.

- 4.6 Ensayos Biológicos con diferentes concentraciones de extractos tánicos a partir de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) frente a los microorganismos seleccionados: Técnica de difusión en Agar Nutritivo sobre la *Escherichia Coli*.
- 4.7 Comparación de los colores e intensidades del halo de inhibición luego de la adición del ETT.
- 4.8-4.9 Bomba del Equipo de Liofilización.
- 4.10-4.11. Equipo de Liofilización.
- 4.12-4.15 Partes del Equipo de Liofilización.
- 4.16-4.22 Muestras de Taninos Liofilizados dentro del Liofilizador.
- 4.23-4.27 Muestras de la obtención de Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara).
- 4.28-4.34 Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias para la Inhibición de Bacterias Aerobias Mesófilas a partir de las diferentes concentraciones de ETT.
- 4.35 Muestra de Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara).
- 4.36 Obtención de la Solución Activada de Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara).
- 4.37 Extractos Tánicos de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) (320 mg/mL y 160 mg/mL).
- 4.38-4.40 Las muestras de Coloide emulsionado de carne de res (Tres tratamientos) con un tiempo de experiencia de 30 días.

- 4.41-4.42 Cuarteo para la toma de muestra del coloide emulsionado de carne de res aplicado el tratamiento.
- 4.43-4.46 Filtrado de la muestra del Coloide emulsionado de carne luego de la homogenización.
- 4.47 Preparación de las diluciones respectivas para los tres tratamientos.
- 4.48-4.55 Inhibición Antibacteriana del ETT comprobada sobre las Bacterias Aerobias Mesófilas.
- 4.56-4.67 Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias para la Inhibición de Bacterias patógenas de *Escherichia Coli* a partir de las diferentes concentraciones de ETT.
- 4.68-4.72 Determinación de los Coliformes Totales y Fecales a partir de las diferentes concentraciones de ETT.
- 4.73-4.78 Método de Cuenta en Placa de las bacterias de *Escherichia Coli*.
- 4.79 Muestra de Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) .
- 4.80-4.81 Obtención de la Solución Activada de Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara)
- 4.82 Muestra del Coloide emulsionado de carne de res con un tiempo de experiencia de 30 días.
- 4.83-4.90 Inhibición Antibacteriana del ETT comprobada sobre las Bacterias patógenas de *Escherichia Coli*.

5. 1 Formación de los halos de inhibición en un ensayo biológico de la Técnica de difusión en Agar nutritivo y aparición de la oxidación de éstas con el paso del tiempo.
- 5.2. Contaminación por levaduras del medio en un ensayo biológico de la Técnica de difusión en Agar.

LISTA DE TABLAS

- 3.1 Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Extracto Tánico de Tara (ETT) para inhibir el crecimiento de *Escherichia Coli*.
- 3.2 Efecto de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Extracto Tánico de Tara (ETT) para inhibir el crecimiento de *Escherichia Coli*.
- 4.1 Control de los pesos de las muestras de taninos liofilizados con respecto al tiempo.
- 4.2 Prueba ANOVA para la determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Extracto Tánico de Tara (ETT) para la inhibición de las Bacterias Aerobias Mesófilas.
- 4.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana del Extracto Tánico de Tara sobre las Bacterias Aerobias Mesófilas durante 30 días.
- 4.4 Prueba ANOVA para la determinación Antibacteriana del Extracto Tánico de Tara (ETT) para la inhibición de las Bacterias Aerobias Mesófilas durante 30 días.
- 4.5 Prueba ANOVA para la determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Extracto Tánico de Tara (ETT) para la inhibición de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli*.
- 4.6 Determinación de la Actividad Antibacteriana del Extracto Tánico de Tara sobre las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* durante 30 días.
- 4.7 Prueba ANOVA para la determinación Antibacteriana del Extracto Tánico de Tara (ETT) para la inhibición de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* durante 30 días.

LISTA DE CUADROS

- 1.1 Operacionalización de variables.
- 2.1 Ensayo de detección de Taninos.
- 2.2 Composición Química de la carne expresado por diferentes autores.
- 3.1 Relación de solventes utilizados en la experiencia.
- 4.1 Mayores tamaños de diámetros de los halos de inhibición presentados en las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.
- 4.2 Ensayos cualitativos realizados al Extracto Tánico óptimo.
- 4.3 Determinación de los mayores porcentajes de taninos de los Extractos Tánicos de Tara empleando el Método del Tungsto- molibdico-fosfórico.
- 4.4 Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Extracto Tánico de Tara (ETT) para la inhibición de las Bacterias Aerobias Mesófilas.
- 4.5 Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Extracto Tánico de Tara (ETT) para la inhibición de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli*.

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice A. Cronograma de Actividades.

Apéndice B. Recursos, Costos y Presupuesto.

Apéndice C. Pruebas Preliminares con los diferentes Extractos Tánicos de Tara (ETT).

Apéndice D. Matriz de Consistencia.

LISTA DE ANEXOS

A1. Estudio General de la Planta de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara).

A2. Determinación Cualitativa de los Taninos Hidrolizables.

A3. Métodos experimentales para diferenciar los taninos condensados.

A4. Método del Tungsto-Molibdico- Fosfórico (Cuantificación de Taninos).

A5. Emulsión Cárnica.

A6. Carne Picada de la Hamburguesa.

A7. Escala de Mc. Farland.

A8. Numeración de microorganismos Aerobios Mesófilos viables.

A9. Recuento de Coliformes Totales y de Coliformes fecales- Determinación del NMP y recuento de *E.Coli*.

RESUMEN

La presente Tesis se realizó en los Laboratorios de las instalaciones del Centro Experimental Tecnológico de la Universidad del Callao, con el fin de analizar, evaluar, comparar y determinar el efecto antibacteriano del extracto tánico a partir de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) frente a las bacterias aerobias mesófilas y frente al patógeno de la *Escherichia Coli* aplicado a los coloides emulsionados de carne de res destinados a la elaboración de hamburguesas.

El mecanismo de obtención de los diferentes extractos tánicos fue la maceración en frío de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (tara), en el solvente conformado por alcohol etílico 96° y agua estéril en una proporción de 1:6 durante 24 horas, el posterior filtrado y concentrado en el rotovapor a 50°C durante 20 minutos resultó la obtención del extracto tánico de tara.

Para la evaluación antibacteriana se determinó de dos maneras; la primera, cualitativamente utilizando la técnica de difusión de disco en el agar óptimo para el crecimiento de cada uno de los microorganismos analizados, prueba que nos permitió medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos; y la segunda, cuantitativamente haciendo uso de análisis microbiológicos para cada microorganismo en estudio.

El Extracto Tánico de Tara (ETT) resultó con una CMI de 320 mg/ml de taninos óptima para la inhibición tanto de la *Escherichia Coli* como de las bacterias aerobias mesófilas evaluándose su actividad antibacteriana durante treinta días.

Dicho extracto fue liofilizado y evaluado de la misma manera que el ETT , lográndose una dilución requerida para tales pruebas, resultando una CMI de 160 mg/ml de taninos óptima para la inhibición tanto de la *Escherichia Coli* como de las bacterias aerobias mesófilas confirmándose de manera similar al ETT su actividad antibacteriana durante treinta días de evaluación.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos suponen una importante carga para la salud, donde millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres.

Desde hace por lo menos dos siglos, se conoce la responsabilidad de algunos microorganismos en el desarrollo de enfermedades transmitidas por los alimentos; la *Escherichia Coli*, es la responsable de la existencia de gastroenteritis en las personas, con alguna mortalidad entre la población infantil. Se han ido implantando diversas medidas de control para reducir al mínimo la incidencia de tales enfermedades transmitidas por los alimentos. Aunque hoy en día la higiene alimentaria es objeto de una gran atención por parte de las administraciones públicas; no debe resultar extraño que en los tiempos actuales, se tenga que hacer frente a un número más elevado de tales enfermedades que en tiempos pasados. (Bello, J.2005).

En nuestro país, es difícil conseguir carne de calidad en las condiciones adecuadas para la elaboración de hamburguesas. La bacteria *Escherichia Coli*, es un microorganismo infeccioso, que vive en la parte externa de la carne por lo cuál es fácil eliminarlo con el calor cuando cocinamos un filete o una chuleta, pero resulta difícil en el caso de las hamburguesas, ya que se preparan con carne molida, lo que hace que la parte externa e interna estén mezcladas y confundidas, y por tanto la bacteria puede aparecer en el interior de la pieza.

La población desde tiempos remotos ha recurrido a las plantas con el fin de curarse alguna dolencia. Las plantas medicinales eran veneradas por las virtudes que se les había reconocido, transmitiéndose sus virtudes de generación en generación; nadie buscaba saber porqué o cómo actuaban, pero era un hecho sin respuesta y aparentemente mágico (Lock de Ugaz,O. 1988). En nuestro país también existe esa costumbre, conocida como Medicina Folklórica o Tradicional.

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores, como fuente de agentes anti- infectivos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica. (Ramírez, 2007).

La *Caesalpinia Spinosa* (tara) es una planta, que se cultiva en terrenos situados entre los 1,000 y 2,900 m.s.n.m., posee un inmenso potencial médico, alimenticio e industrial. El Perú es el mayor productor de tara, con un 80% de la producción mundial. En la vaina de la Tara se encuentra la mayor concentración de taninos, que oscila entre 40 y 60%, los que son utilizados en la industria para la fabricación de diversos productos o en forma directa en el curtido de cueros, fabricación de plásticos y adhesivos, etc. Las innumerables aplicaciones de esta planta nativa han dado origen a la investigación científica ya que poco o nada se ha hecho para demostrar su actividad antibacteriana. Los taninos, son compuestos polifenólicos, que se encuentran en su mayoría en las vainas, con propiedades astringentes, antioxidantes y antiinflamatorias, además de su propiedad antibacteriana poco conocida.

Actualmente, la *Caesalpinia spinosa* "tara" se emplea para tratar diversas afecciones respiratorias (sometida a una operación de cocción para aliviar dolores de garganta), además de contar con una gran presencia en la Industria de Curtiembre; pero es reducido el número de personas que se han encargado en investigar su poder antibacteriano y el gran potencial farmacéutico-alimentario que se encuentra en ella.

En la presente tesis, se pretende demostrar, que los taninos obtenidos luego de la liofilización que experimenta el extracto tánico extraído de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (tara), tienen propiedades antibacterianas, que inhiben el crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas y de la bacteria patógena *Escherichia Coli* que se adquieren en la elaboración de los coloides emulsionados de carne de res para la preparación de hamburguesas, mejorando de esta manera la calidad en dichos productos cárnicos; siendo, actualmente en nuestro país, los de mayor demanda por los consumidores.

Existen pocos trabajos de referencia sobre la actividad antibacteriana de la *Caesalpinia Spinosa*, por lo que este estudio aporta uno de los primeros antecedentes y sobre su posible uso como principio activo en la Industria alimentaria o farmacéutica; asimismo, los resultados permitirán continuar con los estudios tendientes a purificar la muestra e intentar aislar el o los principio/s activo/s.

Por último, tiene una trascendencia industrial, debido a que con los resultados del presente trabajo de Tesis, se propone encontrar la concentración óptima de taninos liofilizados para la obtención de un aditivo natural, con proyección a emplearlo en la Industria Alimentaria, cuya finalidad sea de inhibir el crecimiento bacteriano para que el producto cárnico llegue con mayor tiempo de vida útil y, conseguir garantizar la higiene y sanidad de tal producto para el consumidor.

CAPÍTULO I

1. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

1.1 PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.

1.1.1 Planteamiento del Problema.

La carga bacteriana que se adquiere durante la manipulación de la carne de res para la obtención de coloides emulsionados para la fabricación de hamburguesas, puede deberse a varios factores como son: la contaminación de la carne, adquirida por un inadecuado monitoreo en cualquiera de las etapas de su producción; la contaminación adquirida en el proceso de matanza del animal; el hecho de que éste, se encuentre enfermo o propenso de algún virus; la contaminación adquirida por parte del manipulador durante el procesamiento del producto cárnico llegando a producir una infección alimentaria al consumidor, pudiéndose complicar, si es que la persona transmite un virus o una bacteria al producto cárnico, con el simple hecho de no lavarse las manos; las superficies, equipos y utensilios usados en el proceso de producción no cuenten con una adecuada higienización. Además, cabe destacar que para causar enfermedades al consumidor, la bacteria necesita multiplicarse, y esto se consigue debido a la ausencia de un control microbiológico durante su producción, pudiéndose evitar y controlando a tiempo una contaminación prolongada en la carne destinada para consumo humano.

En la presente tesis, se propone que los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara), tengan una aplicación en el campo de la conservación de una emulsión cárnica como las Hamburguesas; generándose un aditivo natural, utilizando la propiedad bactericida, propia de los taninos, sobre microorganismos gram negativos como *Escherichia coli*, agente

responsable del deterioro de los productos cárnicos, y sobre *Bacterias Mesófilas*, que crecen en un medio de temperaturas menores de 30°C.

1.1.2 Problema Principal.

¿Los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) tendrán un efecto inhibitorio sobre la bacteria patógena *Escherichia Coli* y las bacterias aerobias mesófilas presentes en los coloides emulsionados de carne de res para la elaboración de hamburguesas?

1.1.3 Problemas Secundarios.

- ¿Existe una diferencia en su posible efecto inhibitorio frente a los microorganismos en estudio de las diferentes concentraciones del extracto tánico a obtener ?.

- ¿Cuál es la carga bacteriana presente en el coloide emulsionado de carne de res para la elaboración de hamburguesas antes de iniciar la experiencia?.

- ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria del extracto tánico de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) para *Escherichia coli* y las bacterias aerobias mesófilas en el coloide emulsionado de carne de res?.

- ¿Presentará actividad antibacteriana los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) sobre la *Escherichia coli* y las bacterias aerobias mesófilas en el coloide emulsionado de carne, destinado a la elaboración de hamburguesas?.

1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

1.2.1 Objetivo General :

Determinar el efecto inhibitorio de los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) en *Escherichia Coli* y en las bacterias aerobias mesófilas presentes en los coloides emulsionados de carne de res para la elaboración de hamburguesas.

1.2.2 Objetivos Específicos :

- Obtener distintas concentraciones experimentales del extracto tánico (p/v) de la *Caesalpinia Spinosa* (tara).
- Determinar la carga bacteriana presente en el coloide emulsionado de carne de res para la elaboración de hamburguesas antes de inocular el extracto tánico.
- Obtener la concentración mínima inhibitoria del extracto tánico de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) para *Escherichia coli* y las bacterias aerobias mesófilas para el coloide emulsionado de carne de res.
- Determinar la actividad antibacteriana de la concentración mínima inhibitoria de los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) para *Escherichia coli* y las bacterias aerobias mesófilas en el coloide emulsionado de carne, destinado a la elaboración de hamburguesas.

1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.

1.3.1 Justificación.

La carne de res cuenta con una carga bacteriana inicial debido a su manipuleo, pudiendo aumentar desde su producción hasta su comercialización (anteriormente tratada en el planteamiento del problema); además, cuando se

retira de la cadena de frío y se expone a temperaturas de más de 8 grados centígrados y menores a 70 grados centígrados; la carga bacteriana, se multiplica x 2 cada 20 minutos, continuando en aumento, y a veces por desconocimiento del tema, el continuo congelamiento y descongelamiento de la carne genera una proliferación de bacterias, convirtiéndola en un alto riesgo para la salud; esto es un problema cuando se desea obtener coloides emulsionados de carne de res destinado a la elaboración de hamburguesas que llegan a ser consumidas sin importar cuál ha sido la calidad sanitaria durante su producción .

La presente tesis nos permitirá encontrar una concentración del extracto de los taninos liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) en la cual, se logre inhibir el crecimiento bacteriano de la *Escherichia Coli* y de las bacterias aerobias mesófilas presentes en coloides emulsionados de carne para la preparación de los hamburguesas. Además, generar un gran aporte a la Industria Nacional, desarrollándose la producción de aditivos naturales, evitando el uso de los artificiales produciendo contraindicaciones perjudiciales para la salud.

1.3.2 Importancia.

El Perú produce el 80% de la tara (*Caesalpinia Spinosa*) a nivel mundial, es considerado el producto más rentable dentro de la agro-exportación peruana, debido a su gran acogida y altos precios mundiales. En la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) se encuentra un gran porcentaje de taninos en comparación con el resto de la planta. Los taninos, importantes compuestos químicos de la tara y principio activo de su poder antibacteriano, tienen gran aplicación en la medicina y en diferentes sectores industriales (industria de curtidos y peletería, industria textil, industria farmacéutica, industria alimentaria, etc).

El mercado mundial presenta grandes perspectivas sobre el procesamiento e industrialización de productos elaborados a partir de la tara. Las características

de la vaina, la convierte en materia prima de excelente calidad para la elaboración de otros insumos industriales.

Los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa*, podrían proyectarse como un aditivo natural en un futuro, llegando a ser relevante para la sociedad mejorando la calidad en los productos cárnicos mediante su uso; otorgándole un valor agregado al uso de nuestras plantas nativas que crecen en terrenos entre 1000 y 2900 m.s.n.m, beneficiando no solo al agricultor de la *Caesalpinia Spinosa* sino también a la Agricultura Nacional, promoviendo el uso de aditivos naturales en el mercado nacional e internacional; además, de favorecer la inversión en la Industria Química-Alimentaria debido al desarrollo de nuevos aditivos naturales.

1.4 HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN.

1.4.1 Hipótesis General.

En la producción de hamburguesas se elabora el coloide emulsionado de carne de res, en esta etapa se incrementa la carga bacteriana; la adición del extracto de los taninos liofilizados de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) permite inhibir la *Escherichia Coli* y las bacterias aerobias mesófilas presentes en los emulsionados para asegurar la calidad higiénica del producto final.

1.4.2 Hipótesis Específicas.

- El efecto inhibitorio aumenta conforme aumenta la concentración de taninos presentes en las diferentes concentraciones experimentales de del Extracto Tánico (p/v) de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara).
- La carga bacteriana presente en el coloide emulsionado de carne de res para la elaboración de hamburguesas se encuentra por encima de los valores permitidos por NTS N°071- MINSA/DIGESA.

- La Concentración Mínima inhibitoria del extracto tánico de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) para *Escherichia coli* y las Bacterias Aerobias Mesófilas es la concentración del Extracto que presenta la mayor concentración de taninos.
- Los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) presentan una actividad antibacteriana sobre la *Escherichia coli* y las Bacterias Aerobias Mesófilas en el coloide emulsionado de carne destinado a la elaboración de hamburguesas.

1.5 VARIABLES.

Para la demostración de la hipótesis se trabajará primero con el Extracto Tánico, y posteriormente con los taninos liofilizados.

1.5.1 Variables Dependientes.

H (z) : Acción antibacteriana sobre *Escherichia coli* y bacterias aerobias mesófilas en el coloide emulsionado de carne.

1.5.2 Variables Independientes.

F (x) : Carga bacteriana presente en el coloide emulsionado de carne.

G (y) : Concentración del extracto de la *Caesalpinia Spinosa* (TARA).

1.5.3 Relación de Variables.

Las variables se relacionan de la siguiente manera:

$$H = f(F, G)$$

Las variables cuentan con diferentes indicadores como se muestran a continuación:

Indicadores Independientes:

- x_1 = Crecimiento celular inicial de *Escherichia Coli* y bacterias aerobias mesófilas en el coloide emulsionado de carne.
- x_2 = Crecimiento celular adquirida de *Escherichia Coli* y bacterias aerobias mesófilas en el coloide emulsionado de carne.
- y_1 = Inhibición del crecimiento celular de *Escherichia Coli* y bacterias aerobias mesófilas.

Indicadores Dependientes:

- z_1 = Concentración del extracto tánico.
- z_2 = Muerte celular de *Escherichia Coli* y bacterias aerobias mesófilas en el coloide emulsionado de carne.

1.5.4 Operacionalización de variables.

Causas: Carga bacteriana presente en el coloide emulsionado de carne.

Acción del extracto tánico de la *Caesalpinia Spinosa* (TARA).

Efecto: Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y bacterias aerobias mesófilas.

Cuadro 1.1. Operacionalización de Variables.

VARIABLE	TIPO	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
INDEPENDIENTES				
Carga bacteriana presente en el coloide emulsionado de carne.	Cuantitativo.	Recuento microbiológico de <i>Escherichia coli</i> y bacterias mesófilas (Log UFC/mL) en el coloide emulsionado de carne.	Crecimiento celular (Log 10UFC/mL)	Log ^{UFC} ₁₀ .
Concentración del Extracto de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> (TARA).	Cuantitativo.	Concentración Mínima inhibitoria del extracto Tánico de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> (TARA) (mL/g).	Inhibición del crecimiento (Log ₁₀ UFC/mL).	20 mg/mL, 40 mg/mL, 80 mg/mL, 160 mg/mL y 320 mg/mL. de extracto Tánico de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> .
DEPENDIENTE				
Acción antibacteriana sobre <i>Escherichia coli</i> y bacterias aerobias mesófilas.	Cuantitativo.	Inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y bacterias mesófilas (Log UFC/mL) .	Muerte celular (Log ₁₀ UFC/mL).	Log ^{UFC} ₁₀ .

(Fuente : Elaboración Propia)

CAPÍTULO II

2. FUNDAMENTO TEÓRICO.

2.1 MARCO HISTÓRICO.

López C., y Col. Revista de Ciencia e Investigación. Vol.1 (1998). Demostraron la actividad antimicrobiana in vitro de la *Caesalpinia tinctoria* (Molina) Ktmitze, bajo la forma de uso popular (cocimiento), contra microorganismos grampositivos y gramnegativos, *Candida albicans*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y determinaron qué especie procedente de diferentes regiones contiene mayor cantidad de antimicrobianos. Se trabajó con cepas grampositivas: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25928; bacterias gramnegativas: *E. coli* ATCC 22422 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Candida albicans* ATCC 10235; *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp. Los medios empleados fueron Triptona Soya Agar, Muller Hinton y Sabouraud Agar. Los resultados obtenidos en los ensayos de acción antimicrobiana muestran que las vainas procedentes de Ayacucho, Cajamarca y Churín tienen una fuerte actividad antimicrobiana (+++) frente a las bacterias grampositivas y gramnegativas. Las muestras procedentes de Ayacucho y Likahuasi presentan una mayor actividad antimicrobiana (+++) frente a *Candida albicans*, que la muestra de Cajamarca y Churín (+). Todas las muestras presentaron una fuerte acción antifúngica frente a *Penicillium* sp y no así para *Aspergillus* sp.

Lastra, H. y Col. Revista Cubana Plantas Medicinales Vol. 5 (2000). Desarrolló un método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo (EAR) utilizando la espectrofotometría ultravioleta-visible donde las muestras son leídas a 700 nm y su absorbancia referida a ácido tánico. La curva de calibración para el rango de concentraciones comprendidas entre 4 y 16 ppm fue lineal tanto para la sustancia química de referencia, ácido tánico,

como para el EAR con coeficientes de correlación superiores a 0,9900 en ambos casos; además las pruebas estadísticas del intercepto y la pendiente resultaron ser no significativas. La precisión dada como repetibilidad fue satisfactoria con un coeficiente de variación (CV) igual a 2,30 % para 12 réplicas de ensayo, mientras la reproducibilidad cumplió con los criterios establecidos internacionalmente ya que el coeficiente de variación fue de 2,94 %. El recobrado resultó ser superior al 99 % en los rangos de concentración estudiados y cumple además las pruebas .G. de Cochran y T. de Student. El método resultó ser selectivo, lineal, preciso y exacto.

Liu H., y Col. Revista Horizonte Médico. Vol 2.(2002). Evaluaron in vitro la actividad antibacteriana de extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus* sp. "eucalipto" utilizando cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. y *Shigella flexneri*). Se utilizó como solvente de extracción una mezcla de alcohol-acetona (1:1) y la actividad biológica de los extractos obtenidos se evaluó mediante la técnica de difusión en disco. La cáscara del fruto de *Caesalpinia spinosa* y las hojas del *Eucalyptus* sp. mostraron una actividad selectiva sobre las bacterias Gram positivas evaluadas. En la evaluación del extracto de tara, se observó actividad inhibitoria sobre cepas Gram positivas. Los componentes del fruto relacionados con dicha actividad corresponden exclusivamente a la cáscara de la vaina, donde la pepa no muestra actividad inhibitoria. También se demostró una inhibición efectiva por extracto *Eucalyptus* sp. para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, pero no para *Klebsiella*, *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*. Comparando los promedios de halos de inhibición, se llegó a observar un efecto inhibitorio mayor de la *Caesalpinia spinosa* sobre el *Eucalyptus* sp., no se obtuvo halo de inhibición en el control en ninguno de los ensayos realizados. Los extractos no mostraron actividad frente a las bacterias Gram negativas (*E. Coli*, *Shigella flexneri* y *Klebsiella* sp.). La combinación de los extractos de *Caesalpinia spinosa* y *Eucalyptus* sp. no

mostraron efecto antagónico frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, los halos de inhibición en *S. aureus* de la cáscara de *Caesalpinia spinosa* fueron mayores que los de *Eucalyptus* sp. Además, se evidencia una relación entre los diámetros de los halos de inhibición y el contenido de tara de las mezclas evaluadas. Todos los extractos de solventes orgánicos obtenidos fueron traslúcidos, poco viscosos y de un pH promedio de 5,5.

Ramírez L., y Col. Universidad Tecnológica de Pereira-Colombia (2007). Demostraron la actividad inhibitoria de los extractos y fracciones etanólicos de las raíces, hojas y espigas del *Rumex conglomeratus* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* ATCC25922.

Las pruebas de actividad antibacteriana realizadas por bioautografía mostraron que en el extracto etanólico de raíces se encontró un halo de inhibición en el punto de aplicación y otro con R_f 0.68. El halo de inhibición observado fue constante en las 3 placas, pero su actividad se incrementó en la placa con diclorometano presentando un halo de mayor diámetro. El compuesto de baja polaridad presente en la fracción etérea de espigas fue el único que presentó actividad contra *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus*, y las de raíces y hojas solo presentó actividad contra *Staphylococcus aureus*. En la fracción etérea de espigas el compuesto responsable de la actividad inhibitoria frente a *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus* es el mismo y aparece con un valor de R_f de 0.51 en un sistema de CCD-silicagel- CH_2-Cl_2 . En espigas, los compuestos responsables de la inhibición se concentraron en la fracción en diclorometano y mediante una comparación de raíces, hojas y espigas, estas últimas presentaron mayor actividad antibacteriana. Sin embargo la CMI mas baja frente a *S. aureus* se presenta en el extracto etéreo de raíces 100(ug/ml). Además, se encontró actividades inhibitorias hasta el 68% en el extracto de diclorometano de espigas frente a *Staphylococcus aureus* lo cual sugiere una buena fuente de productos potenciales como antibacterianos frente a microorganismos Gram positivos,

mientras que el porcentaje de inhibición frente a microorganismos Gram negativos no superó el 50% en ninguna de las partes evaluadas, demostrándose que los microorganismos Gram positivos son más sensibles que los Gram negativos.

Flores W., y Col. Revista Horizonte Médico. Vol.8 (2008). Evaluaron el efecto antibacteriano, antifúngico y antioxidante de diferentes extractos del *Calophyllum brasiliense Cambess.* El efecto antioxidante fue determinado por captación de radicales libres, midiendo la decoloración de una solución de 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH); La actividad antibacteriana y antifúngica, in Vitro, se determinó mediante la prueba de dilución. El efecto antibacteriano se evaluó en cepas de *E. coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923, utilizando medios de cultivo: Caldo y Agar Mueller Hinton. Para evaluar el efecto antifúngico, se utilizó cepas de *Cándida albicans* en medio de Agar Sabouraud. La actividad antioxidante de los extractos acuoso, metabólico y etanólico fue muy satisfactoria, siendo de 110.56%, 99.17% y 99.57%, respectivamente, a una concentración de 100µg/mL, en comparación con la Vitamina C que presentó 86,5%. Asimismo, observamos un buen efecto antifúngico para los extractos acuoso y etanólico al 20% p/v a los volúmenes de 3, 3.5 y 4mL. y en el caso del extracto etanólico también presentó un buen efecto a una concentración del 10% a un volumen de 1.6mL.

Inocente C. Tesis: Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de la *Triplaris americana* L. (Tangarana colorada) (2009). Desarrolló y validó la cuantificación de taninos presentes en el extracto hidroalcohólico de la corteza de la *Triplaris americana* L., mediante espectrofotometría Ultravioleta-visible, donde el método resultó ser selectivo, lineal, preciso (repetible y reproducible) y exacto; obteniéndose como resultado para compuestos fenólicos totales: 13.5158 ± 0.1825 g de ácido tánico/ 100 g de corteza, para taninos: 11.8590 ± 0.5453 g de ácido tánico/ 100 g de corteza; y para taninos condensados: 1.62368 ± 0.0784 g

de ácido tánico/ 100 g de corteza. Se evaluó la toxicidad a dosis única del extracto hidroalcohólico (2000 mg/ kg de masa corporal) y no se produjo mortalidad ni se manifestaron síntomas indicativos de toxicidad en los animales, además también se evaluó la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico, aplicando el método del DPPH obteniendo como concentración inhibitoria IC50 19.53 µg/mL, con resultado levemente superior comparado con el estándar Trolox; y 0.241 mg/mL equivalentes Trolox. En el ensayo de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico en concentraciones de 3 mg/ disco, 4 mg/ disco y 6 mg/ disco, se obtuvo una respuesta antibacteriana selectiva sobre las bacterias Gram positivas evaluadas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; y ausencia de actividad sobre las bacterias Gram negativas y actividad antifúngica.

Campos Gutierrez, D. y Col. Investigación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria de la Molina. (2010). Estudiaron la extracción de taninos a partir de vainas de tara en polvo. Se concluyó que los extractos de Tara protegen la carne de cerdo de la oxidación lipídica comprobándose su propiedad antioxidante. Mediante ensayos preliminares demostraron que el pH no tiene influencia significativa ($p < 0.05$) y que el mejor solvente de extracción fue acetona al 80%, seguido de agua, etanol 80% y metanol 80%. Para la etapa de optimización de la extracción se usó el Método Superficie Respuesta (MSR) mediante el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), con 13 tratamientos realizados por triplicado y con cinco replicas en el punto central; obteniéndose el modelo matemático: *Taninos hidrolizables (%) = 306,85 + 7,51*Temperatura - 32,46*Tiempo - 0,075*Temperatura^2 + 0,036*Temperatura*Tiempo + 5,97*Tiempo^2*. El estudio de la hidrólisis de taninos de la tara se realizó con en medio ácido (H2SO4, 2N) a 100 °C, obteniéndose la máxima hidrólisis en 20 horas. La capacidad antioxidante se incrementó rápidamente con el grado de hidrólisis (GH), obteniéndose el máximo valor a las 4 horas (GH = 38,8 %); luego del cual

se mantiene constante en un valor de 26 mmol trolox equi./ mg á. gálico equi. Con la hidrólisis se logró incrementar en 47 % la capacidad antioxidante con respecto al extracto no hidrolizado.

2.2 MARCO TEÓRICO.

2.2.1 Taninos.

a. Definición.

Los taninos son polímeros polifenólicos producidos en las plantas y frutos, como compuestos secundarios y que tienen la habilidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas desempeñando una acción defensiva frente a los insectos. Su composición química es variable, pero poseen una característica común, la de ser astringentes y coagular los alcaloides, las albúminas y metales pesados. Son polvos amorfos de color amarillento, aspecto grasiento, poco denso, solubles en agua y alcohol, e insolubles en éter, benceno y cloroforma; cuando se calientan a 210°C se descomponen produciendo dióxido de carbono y pirogalol.

Los taninos son una mezcla variable y completa de compuestos químicos de sabor amargo y astringente, pero en general son ésteres de un azúcar con un número variable de ácidos fenólicos.

El tanino es un compuesto que se oxida al contacto con el aire, es inodoro y de sabor agrio, soluble en agua, alcohol y acetona, reacción con el cloruro férrico y otras sales; es combustible con un punto de inflamación de 199°C, una temperatura de auto ignición de 528.5°C, poco tóxico por ingestión o inhalación. Tienen la habilidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas, desempeñando en las plantas una acción defensiva frente a los insectos.

Para que una estructura polifenólica se pueda considerar tanino, es decir, para que pueda presentar las características que se han indicado, debe tener un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 aproximadamente. Por debajo o por encima de estos valores, la estructura no se intercala entre las macromoléculas o, si lo hace, no forma estructuras estables. Los taninos tienen pesos moleculares que van desde 500 a más de 3000 (ésteres del ácido gálico) y hasta 20000 (proantocianidinas). Los taninos son incompatibles con álcalis, gelatina, metales pesados, hierro, agua de cal, sales metálicas, agentes oxidantes fuertes y sulfato de zinc, ya que forman complejos con el precipitado en solución acuosa.

Químicamente son metabolitos secundarios de las plantas, fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol ni solventes orgánicos. La fórmula $C_{14}H_{14}O_{11}$, indicada en su estructura química en la figura 2.1 es considerada en algunos libros como la del *tanino común*, es solo aproximada ya que son polímeros complejos.

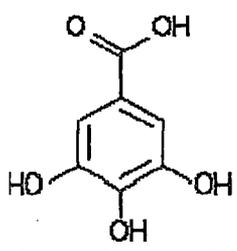


Fig. 2.1: Estructura química base de los taninos.
(Fuente : Contreras, L.1988).

b. Clasificación.

Dado que estos compuestos se han investigado durante más de 100 años, se diseñaron diferentes clasificaciones de acuerdo con el nivel del conocimiento que de estos se tenía en los diferentes periodos de tiempo.

La clasificación de Freudenberg, que actualmente es empleada, tiene su fundamento en el tipo de estructura base del tanino. Es así que los agrupa en dos grandes clases: taninos hidrolizables y taninos condensados, como se puede observar de la figura 2.2.

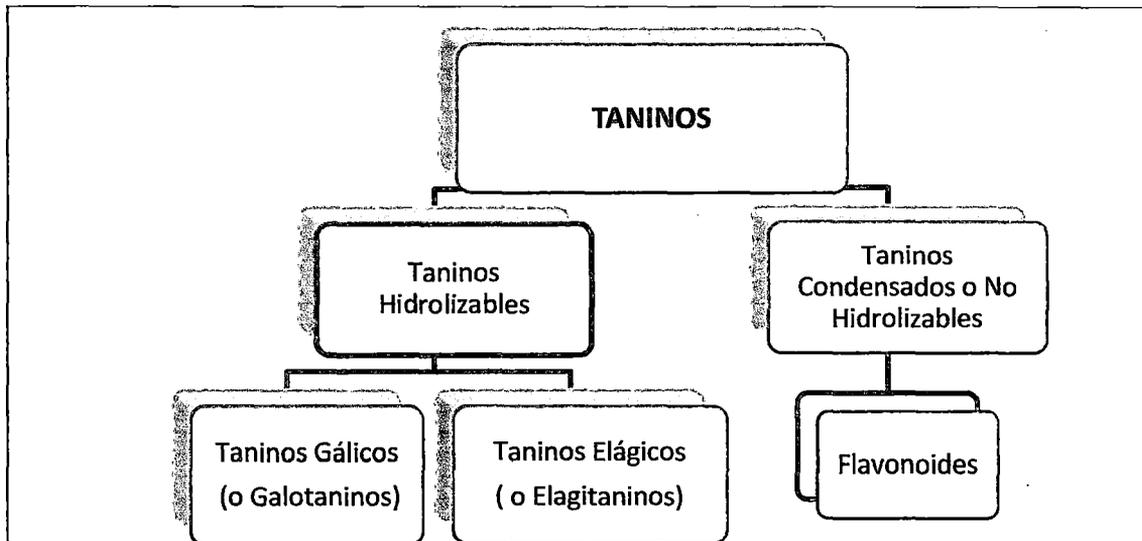


Fig. 2.2: Clasificación de los Taninos.

(Fuente: Elaboración Propia).

Como resultado de las investigaciones de Fischer, Frevidemberg, Mierestein y Rusell los extractos curtientes vegetales se clasificaron en dos grupos:

❖ **Taninos Hidrolizables o Pirogálicos.**

Son ésteres formados por una molécula de azúcar (generalmente la glucosa) unida a un número variable de moléculas de ácidos fenólicos (ácido gálico o su dímero el ácido elágico). Son más pequeños que los taninos condensados y son hidrolizados con más facilidad, solo basta ácido diluido para lograrlo. La mayoría tiene una masa molecular entre 600 y 3,000. Son los taninos que mayor interés toxicológico encierran entre los ácidos fenólicos más frecuentes en su composición destacan el ácido gálico, elágico, tánico, cafeico y hexahidrofénico. Los taninos hidrolizables son característicos de Dicotiledóneas. Se hidrolizan

tanto por hidrólisis ácida o básica como por hidrólisis enzimática. Por destilación seca producen pirogalol (1,2,3- trihidroxibenceno). Al tratar los taninos hidrolizables con cloruro férrico (FeCl_3) aparece una coloración azul. Cuando se destilan en seco producen pirogalol. Se hidrolizan con facilidad por la acción de los ácidos, bases o enzimas, en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Los núcleos bencénicos están unidos por medio de átomos de oxígeno. No precipitan con soluciones de bromo.

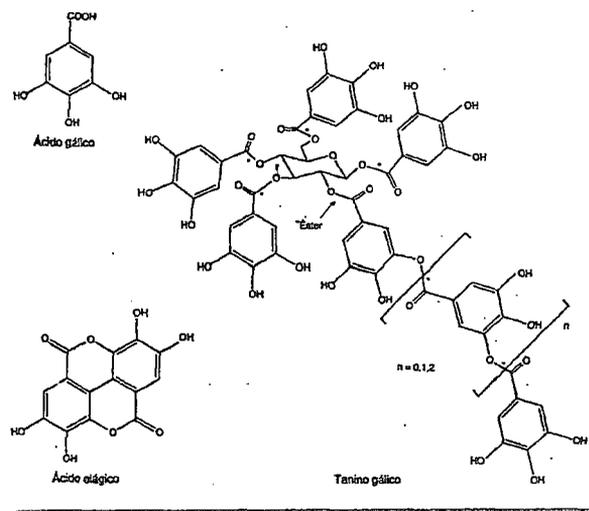


Fig.2.3 : Taninos Hidrolizables.
(Fuente: Farmacognosia.Kuklinski).

En esta clase de taninos los núcleos bencénicos están unidos en largos complejos, por-medio de átomos de oxígeno. Tal como se aprecia en la figura 2.3, posee estructura de poliésteres que se hidrolizan con facilidad, por la acción de los ácidos, alcális o de enzimas en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. De la naturaleza de este último ácido, depende su subdivisión en galotaninos y elagitaninos, es decir si el ácido producido es respectivamente ácido gálico o ácido elágico.

- Taninos Gálicos (Galotaninos).

Los estudios de investigaciones realizadas sobre los galotaninos son muy numerosos, llegando a la conclusión que el extracto galotánico contiene varios componentes, el ácido gálico se encuentra en gran cantidad en los productos de descomposición, la glucosa puede o no ser parte integral de la molécula o del tanino. Las nuevas técnicas de purificación y análisis han ayudado a descifrar últimamente la estructura de los diversos galotaninos.

- Taninos Elágicos (Elagitaninos).

Es la clase de extractos curtientes que producen ácido elágico por hidrólisis, se hallan los mirabolanos, el divi-divi, la algarrobilla y la valonia.

Schimit, demostró que el ácido elágico no forma parte de la estructura de los taninos, sino que se forma por lactonización del ácido exahidroxidifenol formado por hidrólisis o grupos exahidroxidifenol.

- ❖ Taninos Condensados.

También llamados catéquicos o proantocianidinas; son polímeros de un flavonoide llamado antocianidina, es común encontrarlos en la madera de las plantas leñosas. Son dímeros o polímeros flavánicos con uniones carbono-carbono entre las diferentes unidades de flavan-3-ol. Se forman por polimerización de las catequinas y leucoantocianos. Además de encontrarse en Dicotiledóneas se producen también en helechos y Gimnospermas. Son muy resistentes a la hidrólisis. Solo resultan afectados por la hidrólisis ácida o enzimática (que rompe ciertos enlaces) y se convierten en antocianidinas, los cuales pueden polimerizar para formar los flobáfenos insolubles (color rojo intenso). Por destilación seca producen catecol (1,2- dihidroxibenceno). Por este motivo, recibe también el nombre de taninos catéquicos. Al tratar los taninos condensados con cloruro férrico (FeCl_3) aparece una coloración verde. Los

taninos condensados presentes en leguminosas tropicales se encuentran en tres formas principales:

- Extractables: reactivos con protein.
- Ligados a la protein.
- Ligados a la fibra.

Existen leguminosas donde todos los taninos son extractables (Acacia boliviana) y en otras donde todos son ligados (Gliricidia sepium).

Por otra parte se ha demostrado que el secado de una muestra puede afectar la distribución de taninos en el tejido de una planta. Por ejemplo, se ha observado que en varias leguminosas secadas al horno (60°C) hubo una reducción de taninos extractables y un aumento de taninos ligados en comparación con muestras liofilizadas. Son derivados de unidades de flavan-3,4- dioles (leucoantocianidinas o proantocianidinas monómeras), conocidos actualmente también como proantocianidias condensadas.

Según Adela Marroquín, los taninos también se les puede clasificar por su origen en:

- **Taninos fisiológicos**

Son el resultado de las funciones metabólicas de la planta.

- **Taninos patológicos**

Son una respuesta al ataque de insectos, ya sea por ovoposición o por picadura.

c. Propiedades.

Los taninos están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas

macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina). Esta capacidad para precipitarlas es la base de sus dos propiedades principales: su capacidad de curtir la piel y su poder astringente, tales propiedades condicionan su uso. Además, son sustancias con propiedades astringentes y antiinflamatorias, al ser capaces de secar y desinflamar la mucosa del tracto intestinal, resultan muy eficaces en el tratamiento de la diarrea. Además gracias a la actividad astringente ayudan también a que la sangre coagule, por lo que los taninos presentan una acción antihemorrágica local, debido a la vasoconstricción que producen y asimismo resulta beneficioso en el tratamiento de las hemorroides. A estos compuestos se les atribuye también una acción antioxidante, ya que son capaces de atrapar los radicales libres. Un exceso de radicales libres, puede provocar la aparición de enfermedades degenerativas, así como producir el envejecimiento prematuro de la piel como consecuencia de una excesiva exposición al sol.

Entre sus propiedades más representativas tenemos:

✓ Químicas.

Oxidación.

Los taninos experimentan fácilmente una reacción de oxidación, con el consecuente cambio de color. La oxidación comienza a un pH de 2.5, aumentando rápidamente entre 3.5 y 4 y es sumamente rápida en condiciones alcalinas o en presencia de agentes oxidantes. La oxidación es inhibida completamente con la presencia de bajas concentraciones de compuestos de más alto potencial de oxidación que el catecol y el pirogalol; por ejemplo el bisulfito de sodio o el anhídrido sulfuroso, los ácidos orgánicos, etc.

Sulfitación.

La reacción de sulfitación de taninos es análoga a la sulfitación de lignina para la obtención de pulpa de papel. Con esta reacción se solubilizan los taninos

relativamente insolubles, reduciendo la viscosidad de los extractos de taninos. Basándonos en trabajos de Richtzenhoin el curso de la reacción puede ser predicha; las siguientes estructuras presentan la reacción del flavonoide con bisulfito:

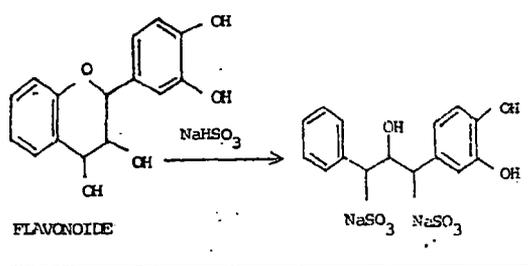


Fig.2.4 : Reacción del Flavonoide con el Bisulfito.
(Fuente : Contreras, L.1988).

Halogenación.

El Cloro ataca al tanino y colorea sus soluciones en marrón, el Iodo finamente pulverizada es disuelto por el agua cargada de tanino, y el Bromo reacciona vivamente y da un residuo marrón.

Acidificación.

El ácido Sulfúrico concentrado disuelve al tanino con una matriz amarillo limón, pasando por un marrón púrpura al calentarse liberando al ácido sulfuroso; si el ácido sulfúrico se aplica diluido y a temperatura de ebullición se formaría ácido gálico acompañado de glucosa.

El ácido Nítrico ataca al tanino en solución acuosa, coloreando primero el licor en amarillo rojizo y finalmente produciendo ácido oxálico.

El ácido Crómico en solución acuosa y en caliente descompone completamente al tanino, con desprendimiento de ácido carbónico.

La disolución acuosa del tanino tiene una reacción ácida, puesta en contacto con las membranas de los animales pierde su tanino que se fija sobre las membranas para formar un compuesto insoluble e imputrescible (curtido).

✓ Fisicoquímicas.

- Forman *sólidos amorfos*.
- *Solubilidad*: Son solubles en agua (forman soluciones coloidales) y en disolventes orgánicos polares (acetona, alcohol, glicerina), pero son insolubles en disolventes orgánicos apolares (éter etílico, cloroformo).
- *Capacidad de precipitar*:
 - a) Con agua de cal (solución de hidróxido cálcico).
 - b) Con agua de barita (solución de hidróxido bórico).
 - c) Con wolframato o molibdato amónico.
 - d) Con alcaloides, proteínas, celulosa y otras macromoléculas.
- *Capacidad de formar complejos* (son agentes quelantes) con metales pesados (cobre, mercurio, plomo, estaño, zinc, etc) por esta razón, en ocasiones se utilizan como antídoto en intoxicaciones causadas por estos metales pesados.
- *Propiedades Redox*: Se oxidan con facilidad, sobre todo en medio ácido, y pueden actuar como reductores de ciertos compuestos (ácido fosfowolfrámico, ácido fosfomolibdénico, ferricianuro férrico).
- *Estabilidad*: Son moderadamente estables. Los taninos hidrolizables se hidrolizan fácilmente en medio ácido mientras que los taninos condensados son más resistentes a la hidrólisis. No obstante, algunos de sus enlaces pueden romperse y polimerizan dando productos de intenso color rojo.

✓ Farmacológicas.

Las propiedades farmacológicas de los taninos están relacionadas con sus acciones.

- *Antídotos en intoxicaciones por metales pesados y alcaloides:* debido a su capacidad para formar estructuras complejas con estas sustancias. El ácido tánico se utiliza como contraveneno para precipitar las sustancias venenosas de los alcaloides y ciertas sales metálicas, aunque la utilización de este componente por vía interna pueda producir síntomas gastrointestinales desagradables, su acción positiva en la neutralización de los venenos justifica su uso.
- *Astringentes:* debido a su capacidad para precipitar proteínas de la piel (curtido de la piel), proteínas salivares, etc. Por sus propiedades astringentes se usan por vía externa como cicatrizantes y por vía interna como antidiarreicos. El efecto antidiarreico lo ejercen en el intestino y para evitar los ardores de estómago que producirían, se administran combinados con albúmina o gelatina; de esta forma, el tanino no se libera hasta llegar al intestino, donde hay medio básico. Entre las plantas con esta acción tenemos el algarrobo, la gayuba y el lentisco.
- *Antiséptico:* Tiene una acción bactericida y bacteriostática. También ejercen un efecto antifúngico. La función antibacteriana de los taninos se produce fundamentalmente al privar a los microorganismos del medio apropiado para que puedan desarrollarse. Entre las plantas con esta acción tenemos el aloe y la salvia, que son utilizadas para que las heridas no se infecten.
- *Protectores:* los taninos aplicados en pomada de uso externo impermeabilizan la piel y la protegen de los agentes externos. Si hay una cicatriz favorecen la regeneración (reepitelizantes) y tienen poder analgésico. Aplicados sobre heridas sangrantes pueden tener una acción hemostática y se usan en supositorios antihemorroidales. Los taninos cumplen una función cicatrizante al acelerar la curación de las heridas y hemostática, al detener el sangrado. La cicatrización se produce por la formación de las costras al unirse las proteínas con los taninos y

crear un medio “seco” que impide el desarrollo de las bacterias. al constreñir los vasos sanguíneos ayudan a la coagulación de la sangre, y por tanto, contribuyen a la curación de las heridas.

- *Antioxidantes*: Los taninos se consideran antioxidantes por su capacidad para eliminar los radicales libres, previniendo la aparición de numerosas enfermedades degenerativas, entre ellas el cáncer; además son capaces de inhibir la peroxidación lipídica y la autooxidación del ácido ascórbico (vitamina C). Entre las plantas con esta acción tenemos el té verde y el orégano.
- *Efecto hipocolesterolémico*: Disminuyen los niveles de colesterol en sangre al inhibir su absorción y expulsarlo a través de las heces, aumentando de esta manera su metabolismo. Se ha comprobado como la ingestión de plantas ricas en este componente como la uva o el aceite de oliva ha supuesto una reducción de los niveles de LDL y triglicéridos y un aumento de HDL.
- *Antídoto contra los venenos*: La capacidad de inhibir la absorción de los alimentos en el tubo digestivo es aprovechada, en caso de ingestión de productos venenosos, para impedir que los venenos entren en la corriente sanguínea.
- Son factores *antinutrientes*: Ciertos taninos disminuyen la eficacia de los alimentos porque inhiben las enzimas endógenas (interaccionan con dichas enzimas, que suelen ser proteínas) o porque se absorben y ejercen un efecto sistémico de precipitación de las proteínas de la dieta; es decir, una concentración elevada de los mismos, puede provocar que la absorción de algunos nutrientes como las proteínas o el hierro, se vea disminuida.

d. Características.

Los taninos tiene un olor característico, sabor amargo y astringente, y su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro. Expuestos al aire se tornan oscuros y pierden su efectividad para el curtido.

- Compuestos químicos no cristalizables cuyas soluciones acuosas son coloidales, de reacción ácida y sabor astringente.
- Precipitan con gelatina, albumina y alcaloides en solución.
- Con sales férricas dan coloraciones negro azuladas o verdosas.
- Producen un color rojo intenso con ferricianuro de potasio y amoníaco.
- Precipitan a las proteínas en solución y se combinan con ellas, haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas.

e. Valoración.

- Cuantitativa.

Los taninos son difíciles de valorar cuantitativamente, entre ellos tenemos:

- Método Físicoquímico

Se basa en la capacidad de los taninos para interactuar con las proteínas de la piel. Se denomina también valoración con polvo de piel. Se deseca una alícuota y se pesa el residuo (P_1g). Otra alícuota se trata con polvo de piel y precipitan los taninos, se filtra y el filtrado se deseca y se pesa el residuo (P_2g). La diferencia ($P_1 - P_2g$) corresponde a la cantidad de taninos.

- Método Químico

Basado en la determinación de los grupos fenólicos libres debido a su poder reductor. Su aplicación es compleja y además resulta poco específico (los flavonoides también se determinan conjuntamente).

- Método Biológico

Es el más adecuado y consiste en poner en contacto una solución de hemáties con una solución de taninos. Se produce una aglutinación de los

hematíes. El complejo aglutinado se filtra y se valora la hemoglobina residual por colorimetría.

- Cualitativa.

Se pueden hacer varios tipos de ensayos para detectar los taninos e incluso para diferenciar entre taninos hidrolizables y taninos condensados. Algunos de los principales ensayos de detección de taninos se esquematizan en el cuadro siguiente:

Cuadro 2.1. Ensayos de detección de los taninos.

ENSAYO	APLICACIÓN	FENÓMENO OBSERVADO
Cloruro férrico , FeCl ₃	Taninos hidrolizables	Precipitado azul
Cloruro férrico , FeCl ₃	Taninos condensados	Precipitado verde
Yodato potásico, KIO ₃	Taninos gálicos	Coloración rosada
Ácido Nitroso, HNO ₂	Taninos elágicos	Coloración
Formol y HCl (Stiasny)	Taninos condensados	Precipitado
Metales pesados	Taninos	Precipitado
Gelatina o alcaloides	Taninos	Precipitado

(Fuente : Elaboración propia).

2.2.2 Emulsionado de carne de res.

a. Definición.

Es un sistema de dos fases constantes, formado por la dispersión de un sólido grueso (grasa) en un líquido (agua), donde éste no es miscible en el líquido; además existe un agente emulsificante que son las proteínas, que son solubles, especialmente en sales concentradas.

En las emulsiones cárnicas la fase continua es el agua, la fase dispersa es la grasa y el emulsificante son las proteínas, especialmente las miofibrilares que son solubles en soluciones salinas diluidas.

Una emulsión cárnica es un complejo sistema bifásico que consta de las siguientes partes:

- Dispersión coloidal: proteínas de la carne.
- Suspensión: trozos de carne.
- Emulsión: grasa.
- Espuma: aire atrapado.

b. Clasificación.

Existen dos tipos de emulsiones cárnicas:

- Hidrofilicas (Emulsiones aceite, en fase continua de agua); en estas emulsiones la fase continua es el agua y la fase dispersa es la grasa. La mayoría de las emulsiones son de este tipo.
- Lipofílico (Emulsiones agua, en fase continua en aceite). La fase continua (de mayor proporción) es la grasa y la dispersa (de menor proporción) es el agua.

c. Composición.

La calidad de los productos elaborados depende del uso adecuado así, como de la calidad de las materias primas. Las principales materias primas, que intervienen en distintas formas en la preparación de los coloides emulsionados de carne son las siguientes:

i. Carne de Res.

El término carne se define como el tejido muscular de los animales utilizado como alimento (Lawrie,1967) ; este tejido puede proceder de la vaca, la ternera y del buey. La carne de res constituye una de la más apreciada y consumida en la alimentación humana debido a que es rica en proteínas y sustancias esenciales para la formación de todos los tejidos del organismo, utilizada en forma directa o procesada.

La carne está constituida por agua, proteínas, grasa, sales y carbohidratos. También constituye una fuente de lípidos que proporcionan una parte de las calorías que se necesita para el funcionamiento de nuestro organismo y que contribuyen a la formación de sustancias que constituyen las células de nuestros tejidos; también es fuente de lípidos que proporcionan una parte de las calorías que necesitamos para el funcionamiento de nuestro organismo y que contribuyen a la formación de sustancias que constituyen las células de nuestros tejidos, entre los valores calóricos (energéticos) directamente relacionados con el contenido de lípidos se reportan 131,1 kcal/100 g (USDA, 1996) y 9 kcal/g (Ferreira de Castro, 1999).

Además el consumo de carne proporciona minerales, tales como el calcio y el fósforo, necesarios para la formación de los huesos y los dientes. También es fuente de hierro que forma parte de la hemoglobina de los glóbulos rojos de la sangre. El hierro de la carne es disponible y es bien absorbido además de que ayuda a la absorción de hierro de otros alimentos. Contiene también vitaminas, principalmente tiamina, riboflavina y niacina entre otras (Niivivaara, 1973).

El sabor y la textura de la carne dependen de las condiciones ambientales en las cuales el animal se haya desarrollado y de su alimentación, salud y sexo. También el manejo de la canal, el despiece y los cortes influyen en la calidad de la carne.

Es importante diferenciar entre las carnes blancas y las carnes rojas que dependen de la edad del animal. La carne roja procede de animales adultos, como la vaca; su sabor es mucho más fuerte y tiene mayor cantidad de grasa y proteínas. La carne más tierna es la de las reses menores de un año de edad y que solamente se alimentan de leche materna, la carne es mucho más suave. La de novillo es roja y pertenece a las reses de hasta cinco años. Los bueyes, vacas y toros mayores de cinco años son los que tienen la carne más roja, su sabor y valor nutritivo es mayor. En el siguiente cuadro se resume la composición química de la carne reportada por diferentes investigaciones.

Cuadro 2.2. Composición Química de la carne expresado por diferentes autores.

AUTOR	%HUMEDAD	% PROTEÍNA	%GRASA TOTAL	COLESTEROL mg/100 g.
Dikeman y Crouse,1975.	-	-	5.58	-
Cole y Lawrie,1975.	75	19	2.5	-
Keith et al.,1985	71,5	-	6.1	-
Huerta et al.,1993	75,4	21.15	2.28	66.18
Esquivel,1994.	71.54	22.08	4.75	-
Van Koeving et al.,1995.	73.30	22.35	-	48
USDA,1996.		24.07	20.69	90
Ferreira de Castro,1999.	58-64	24-31	6-14	70-90

(Fuente: Carvajal, 2000).

ii. Grasa.

Constituye la fase discontinua de una emulsión y puede provenir de la carne o ser también adicionada en la emulsión. Las grasas son una fuente importante de energía en la dieta humana pues aportan 2.25 veces más energía por unidad de masa que los carbohidratos y proteínas (Niivivaara, 1973). Las grasas animales son totalmente digeribles, proveen el aminoácido esencial ácido linoleico y son vehículos para las vitaminas solubles en grasa (A,D,E,K). En la grasa de los animales se distinguen la grasa orgánica y la grasa de los tejidos.

La primera, como la de riñón, vísceras y corazón, es una grasa blanda que normalmente se funde para obtener la manteca. La grasa de los tejidos, como la dorsal, la de la pierna y de la papada, es una grasa resistente al corte y, por tanto, se destina a la elaboración de productos cárnicos y a la obtención de manteca.

La grasa dorsal del tocino y la fracción grasa de la carne se destinan a la preparación de tipos de embutidos crudos, cocidos o escaldados. La del cuello, en particular, es utilizada en embutidos crudos de larga conservación, como el salami. El tocino descortezado se emplea para preparar embutidos escaldados y embutidos de sangre, como la morcilla. Por otro lado, la grasa del tocino y de la papada se utiliza también para la preparación de productos crudos, curados y de larga conservación.

d. Microbiología del coloide emulsionado de carne de res.

La microbiología de la carne se ocupa de la presencia, origen y significación de los microorganismos (bacterias, bacilos, virus, etc) existentes en la carne. La tasa microbiana presente constituye un fidedigno parámetro para calificar la calidad de la carne.

La detección de determinados gérmenes es indicio de impurificaciones muy peculiares (“contaminaciones”). Por ello, tales microorganismos reciben el nombre de “gérmenes indicadores” y también el de “indicadores higiénicos”. Los gérmenes que se encuentran habitualmente en el contenido intestinal, como por ejemplo, la *Escherichia Coli*, indican la producción de una contaminación con partículas de heces, con todos los riesgos añadidos que esto lleva alguna deficiencia en la higiene de la manipulación u otro tratamiento descuidado, como por ejemplo, un almacenamiento a temperatura demasiado elevada. A este respecto se utiliza también ocasionalmente la expresión “organismos índices”. Al enjuiciar la función índice o indicadora de la tasa de gérmenes en la carne, surge la pregunta ¿de dónde proceden?. Esta cuestión requiere particular atención,

porque precisamente la microflora de la carne puede tener fuentes diversas, lo que correspondientemente, obliga a emitir a una calificación higiénica distinta en absoluto.

Tomando en consideración la tasa de gérmenes extraordinariamente elevada que existe en el contenido intestinal, se comprende que mínimas contaminaciones con heces fecales constituye ya un activísimo potencial de alteraciones en los productos. Las suciedades fecales se concentran también en determinados puntos de la superficie corporal de los animales de abasto, constituyendo una causa principal de la contaminación de la carne. Tales regiones corporales son áreas de la piel ensuciadas por heces, como por ejemplo a nivel de las extremidades posteriores y sobre todo cascos y pezuñas. La tasa de gérmenes registrada en la suciedad retenida en cascos y pezuñas es de una magnitud parecida a la del contenido intestinal.

En contraposición a las superficies corporales internas y externas, los órganos y tejidos internos del animal vivo (“intra vitam”) se mantienen prácticamente limpios de gérmenes. Los mecanismos defensivos del organismo animal actúan siempre con mucha rapidez en las tareas de captar y anular tales gérmenes. La situación cambia, no obstante, durante el proceso de sacrificio, que puede provocar una intensa contaminación microbiana también en los tejidos profundos de la canal. Cuando determinados gérmenes patógenos superan las defensas corporales y se asientan en territorios concretos del organismo, para comenzar allí a multiplicarse y provocar con ello manifestaciones de enfermedad en el animal infectado. Este proceso recibe el nombre de infección, y cuando se trata de una afección general transmisible, se habla de una enfermedad infecciosa.

Naturalmente también la carne, órganos o residuos de matadero y las excreciones de un animal de abasto enfermo pueden contener microorganismos patógenos para el hombre. Estos gérmenes no solo constituyen un riesgo para el

consumidor que ingiere la carne con posterioridad sino que amenazan asimismo a cuantos manipulan el animal vivo o su canal: ganaderos, personal del matadero, inspectores de carnes y veterinarios; también corren peligro todos aquellos operarios encargados de la posterior elaboración de esas materias primas y con las que están en estrecho contacto.

e. Contaminación Microbiana en el Coloide emulsionado de carne.

La carne es uno de los alimentos más perecederos, debido a que contiene una cantidad abundante de todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias, levaduras y mohos. El crecimiento de microorganismos en la carne tiene lugar debido al aprovechamiento como fuente de energía de compuestos de bajo peso molecular presentes en la carne, como energía de compuestos de bajo peso molecular presentes en la carne, como glucosa, glucosa-6-fosfato, ribosa, glicerol, aminoácidos y lactato, siendo la alteración el resultado de cambios en el olor, sabor y aspecto. Al principio, los microorganismos que se desarrollan en la superficie de la carne utilizan preferentemente la glucosa. Cuando la velocidad de utilización de la glucosa supera a la de su difusión desde los tejidos internos, se degradan los aminoácidos. El contenido de la glucosa de la carne, es por lo tanto, un factor crítico que determina la aparición de olores extraños.

Como regla general, un alimento que contenga una población numerosa de microorganismos de descomposición tendrá una vida útil o de anaquel más corta que el mismo alimento que contenga menor número de los mismos microorganismos de alteración.

Los microorganismos pueden causar las siguientes características de alteración en la carne:

- Mucosidad en la superficie: la temperatura y la humedad disponible influyen en el tipo de microorganismo que la produce.

- Cambios en el color de los pigmentos de la carne: el color puede cambiar a manchas verdes, marrón o gris como resultado de los compuestos oxidados.
- Cambios en las grasas: oxidación de grasas no saturadas en la carne toma lugar químicamente en el aire, y las bacterias pueden también causar rompimiento o acelerar la oxidación de las grasas.
- Fosforescencia: es poco común y es causada por bacterias fosforescentes o luminosas.
- Sabores y olores desagradables: es el resultado del crecimiento de microorganismos sobre la superficie y a la producción de compuestos volátiles, causando olores y sabores desagradables, una superficie viscosa y pegajosa, y la decoloración de la carne.

2.3 MARCO CONCEPTUAL.

2.3.1 Taninos de la *Caesalpinia Spinosa* (TARA).

La tara es una planta originaria del Perú. Fue utilizada desde la época prehispánica como medicina popular. En los últimos años, ha sido utilizada como materia prima para diferentes industrias en el mercado internacional. El Perú es el más importante productor de tara a nivel mundial. La industrialización de la vaina de la tara ofrece ventajas ecológicas y económicas, especialmente en la elaboración de productos con alto valor agregado como la goma de tara y el ácido gálico. En el árbol de la tara la máxima concentración de tanino se encuentra en el fruto (vainas).

Los taninos de la tara están clasificados dentro de los taninos hidrolizables y pertenecen a la sub- división de galotaninos. El galotanino de la tara se puede extraer con diferentes solventes como agua, alcohol, éter, etc ; éste se purifica en extracción en contracorriente con el metil - etil - acetona y precipitación de la solución en acetato de etilo, con benzol. Este tanino se hidroliza por la acción de la

tanasa o de ácidos diluidos, comprobándose la estructura de un éster poligaloil del ácido químico como se puede apreciar en la figura.

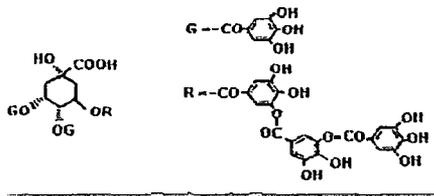


Fig. 2.5 : Tanino de la Tara.
(Fuente : Contreras, L.1988)

Como ejemplo de tanino hidrolizable, se menciona al que se obtiene de los frutos de *Caesalpinia Spinosa*, este tanino es fácilmente hidrolizable por la acción de la enzima tanasa. Esto permitió asignar la estructura de un éster poligaloil del ácido químico a dicho tanino, con un peso molecular aproximado de 800.

2.3.2 Coloide emulsionado de carne de res.

La elaboración de un coloide emulsionado de carne puede dividirse en dos partes: la trituración mecánica y el tratamiento térmico. Durante la primera etapa, los tejidos muscular y adiposo quedan reducidos a micropartículas con liberación de las proteínas miofibrilares, lo que permite la fijación del agua y un grado más elevado de hinchamiento. La grasa se dispersa en forma de gotitas en el seno de una fase acuosa heterogénea y alrededor de esas gotitas se forma una película estabilizadora por absorción de moléculas proteicas en la interfase grasa-agua.

Posteriormente, durante el tratamiento térmico, las proteínas se desnaturalizan lo que provoca su agregación para formar un gel. Es precisamente, esta matriz proteica gelificada la que estabiliza la grasa pues constituye una

barrera estérica contra su coalescencia. El agua queda retenida en los intersticios por diversas interacciones agua-proteína a las que se suman, tras la gelificación, las fuerzas de capilaridad que retienen físicamente a las moléculas de agua.

El resultado es una red proteica tridimensional que estabiliza física y químicamente tanto a la grasa como al agua y cuya estabilidad depende del contenido de proteína miofibrilar relacionado al contenido de carne en la fórmula y de su grado de hidratación.

La producción de los productos cárnicos de conveniencia tales como las emulsiones y carne reestructurada, dependen de la formación de una matriz funcional dentro del producto. En general, cuanto mayor es el contenido de carne mayor es la calidad de dicha matriz.

2.3.3 Hamburguesa.

Elaborado en base de carne, grasa, vísceras u otros subproductos comestibles de animales de abasto y sometido a procesos tecnológicos adecuados.

El principal objetivo de su fabricación es aumentar la vida útil de carne. Es un alimento procesado en forma de sándwich o bocadillo de carne picada aglutinada en forma de filete, cocinado a la parrilla o frito.

La invención del bocadillo de hamburguesa en el siglo XIX es polémica, ya que diversos autores se atribuyen haber sido los primeros en haber puesto un filete de carne picada ("*Hamburger steak*") entre dos panecillos. La hamburguesa es en la actualidad un alimento tan popular que aparece con sus diversas variantes en casi todas las culturas de la tierra.

2.3.4 Microorganismos aerobios mesófilos viables.

Son microorganismos que crecen entre 20 °C y 30 °C, con una temperatura óptima de crecimiento que está entre 30-40°C. En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30°C en las condiciones establecidas.

Las cuentas de microorganismos viables se basan comúnmente en el número de colonias que se desarrollan en placas de agar, las cuales han sido inoculadas con cantidades conocidas de una dilución de un alimento y luego incubadas bajo ciertas condiciones ambientales. Estas cuentas algunas veces son llamadas erróneamente cuenta total en placa, cuando de hecho sólo se calculan aquellas bacterias que pueden crecer bajo las condiciones ambientales establecidas (ICMSF, 1978).

Una cuenta en placa de mesófilos aerobios alta frecuentemente indica: 1) contaminación de la materia prima, 2) que el proceso no se llevó a cabo con las medidas de higiene adecuadas ó 3) que las condiciones tiempo/temperatura durante el proceso no fueron las adecuadas. Además, una cuenta elevada favorece la multiplicación de microorganismos patógenos. En este caso cabe mencionar que la exclusión de oxígeno en productos cárnicos empacados con películas impermeables no garantiza la inhibición de microorganismos aerobios, ya que con el uso de máquinas de empacado al vacío, por lo general queda un remanente de presión parcial de oxígeno (Ingram, 1962).

2.3.5 Coliformes.

Son un grupo de bacterias aerobias y facultativamente anaerobias, gram-negativas, compuesto de 4 -10 ó más subgrupos, no esporulantes, fermentadoras de lactosa (35 °C) y habitantes típicos del intestino grueso humano y animal. Muchas de ellas son capaces de reproducirse fuera del intestino, por lo que sirven

de indicadores de higiene y contaminación durante el manejo y procesamiento de algún alimento (FDA, 1998). El grupo de los coliformes están ampliamente difundidos en el medio ambiente, son sensibles al calor y por lo tanto su presencia, en alimentos cocinados es evidencia de contaminación después de ser procesados (Frazier, 1978).

Debido a que los coliformes se encuentran naturalmente en el ambiente, es necesario determinar los coliformes fecales como un indicador de contaminación fecal, estos son definidos en la base de que fermentan la lactosa a mayores temperaturas (45.5 °C), por lo que también se les conoce como coliformes termotolerantes. Los coliformes fecales son los más utilizados como indicador de contaminación en productos de la pesca, estos organismos son principalmente *E. coli* y *Klebsiella* (FDA, 1998).

2.3.6 Microorganismos Patógenos.

Son microorganismos implicados en las enfermedades transmitidas por los alimentos, conforman un grupo muy diversificado y sus mecanismos de patogenicidad son muy variados. La dosis mínima infectante no es un valor único universal, varía incluso entre individuos aparentemente sanos según el estado nutricional, estado físico, defensas humorales y orgánicas, acidez del jugo gástrico, carácter de la flora intestinal, tipo de vehículo del agente patógeno y otros (Fernández –Escarín,1998).

Los productos alimenticios percederos contaminados con ellos, generalmente, no muestran signos de alteración aún cuando algunas bacterias patógenas que contengan hayan proliferado. La excepción se presenta en las cepas proteolíticas de *Clostridium botulinum*, bacteria que rápidamente induce el mal olor al alimento poco después de haber entrado en actividad. (Doods y Austin,1997).

Los virus y protozoarios no se multiplican en los alimentos, de ahí que la ausencia de deterioro o alteración en un alimento en el que ha habido desarrollo mínimo de bacterias patógenas es una regla general que debe ser tomada en cuenta en el control sanitario de los alimentos. Aunque la característica más comúnmente relacionada con las enfermedades transmitidas por los alimentos de origen microbiano es el síndrome diarreico, este puede ser ocasional o estar del todo ausente. Las enfermedades de naturaleza microbiana transmitidas por los alimentos varían, a veces acentuadamente, en su forma de expresión clínica. Actualmente se reconoce que diversos agentes patógenos que tienen efectos a nivel intestinal transmitidos por los alimentos causan daño más allá del aparato digestivo y pueden afectar también los sistemas nervioso, esquelético, circulatorio y urinario (Fernández-Escarín, 1998).

Algunos de los microorganismos causantes de toxoinfecciones alimentarias más importantes en la actualidad y que pueden ser transmitidos por la carne a sus consumidores son: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* enterohemorrágico (por ejemplo, serotipo O157), algunos serovares de *Yersinia enterocolítica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *C.botulinum* y *Bacillus cereus*. Algunos parásitos de animales y del hombre que son transmitidos por productos cárnicos son: *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis hominis* y *Sarcocystis suihominis*, *Trichinella spirales*, *Taenia saginata* y *Taenia solium*.

2.3.7 Escherichia Coli.

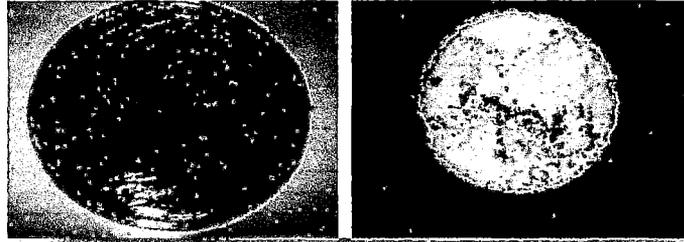


Fig. 2.6 : Características Macro y Microscópicas de Escherichia Coli.
(Fuente : Tesis: "Evaluación de la actividad antimicrobiana de los Extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos)

Es un bacilo de 1-3 μm , que se presenta solo, en pares, en cortas cadenas o formando grupos. En general es móvil (por flagelos peritricos), aunque existen variantes inmóviles no flageladas. No forma esporas y por lo general es no capsulado y gran negativo. En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente y en los viejos se presentan formas de una dimensión mayor (Peñaranda, O., 2003).

En agar forma colonias circulares de 3 a 5mm convexas, de borde continuo o un tanto ondulado, brillantes y de coloración blanca un poco amarillenta. Con producción de ácido y gas, fermenta la lactosa y un gran número de carbohidratos ; algunas cepas son lactosa negativas. Es indol positiva, rojo de metilo positiva, Voges Proskauer (VP) negativa y no utiliza el citrato. Produce H_2S en determinados medios, acidifica y coagula la leche. Pueden necesitarse pruebas adicionales en casos de *E.coli* aislada de colitis hemorrágicas, las cuales son típicamente negativas a sorbitol. Este bacilo es aerobio y anaerobio facultativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C , pero posee propiedades de desarrollo en una gama bastante amplia de temperaturas; el pH favorable es de 7 algunas cepas producen hemolisina (Peñaranda O., 2003). Se ha considerado inicialmente solo como un habitante del

intestino, desde hace cerca de tres décadas se empezó a estudiar su poder enteropatógeno.

Las cepas de *Escherichia Coli* forman parte de la microflora normal anaeróbica facultativa de los tractos intestinales de humanos y animales de sangre caliente. Las cepas se identifican con base en tres antígenos de superficie que permiten su serotipificación : O (somático), H (flagelo) y K (cápsula). Las cepas de *E.Coli* que causan diarrea se categorizan en grupos específicos basados en sus propiedades virulentas, los mecanismos de patogenicidad, los síndromes clínicos y los distintos serogrupos O:H. Algunas de estas categorías son: las cepas enteropatógenas de *E. Coli* (EPEC), las cepas enterotoxigénicas (ETEC), las enteroinvasivas (EIEC), las de adherencia difusa (DAEC), las enteroagregativas (EAggEC) y las enterohemorrágicas (EHEC).

A diferencia de la mayoría de los patógenos transmitidos por alimentos, *E.coli* O157:H7 es tolerante a medios ambientales ácidos y a la desecación, como las condiciones que se tiene durante el procesamiento de muchos productos cárnicos.

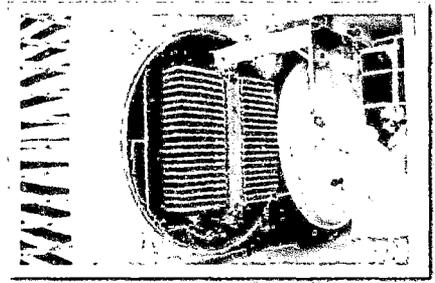
E.coli O157:H7 crece cuando el almacenamiento en refrigeración o las condiciones de transporte de las canales son inadecuadas (temperaturas mayores de 7°C). La carne picada mal cocinada, contaminado con *E.coli* O157:H7, ha causado diversos brotes de diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica) y del síndrome urémico hemolítico. En 20 países al menos se ha puesto de manifiesto *E.coli* O157:H7 en la carne molida (Griffin y Tauxe,1991). Las incidencias señaladas de *E.coli* verotoxigénico también varían de unos estudios a otros, llegando algunos hasta 63 % de incidencia en la carne de mamíferos de abasto, al menos, parte de esta variación se debe al empleo de diferentes métodos de aislamiento.

2.3.8 Proceso de Liofilización.

Proceso utilizado para la eliminación del agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas. La liofilización es un proceso en el que se congela el alimento y una vez congelado se introduce en una cámara de vacío para que se separe el agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido del alimento al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. El proceso en sí se divide en 2 etapas: Primero congelar el alimento y el segundo el secado o liofilización propiamente dicha.

Se realiza el congelamiento del producto, ya sea entero o trozado, dependiendo del tamaño del producto, se distribuye en bandeja que ingresan al liofilizador, equipo llamado intercambiador de placas donde cada placa se intercala con las bandejas del producto, como se puede apreciar en la figura 2.7. El calor es transferido desde las placas al producto tanto por radiación como por conducción, produciendo la sublimación del hielo presente en el producto. El vapor de agua es luego captado por un sistema de refrigeración que lo elimina del sistema. El proceso se realiza a una presión de 0.4 a 0.6 mBar y temperatura de sublimación de -20.5°C . a -25.5°C . El sistema de refrigeración produce una solidificación del vapor sobre el intercambiador de calor. En una etapa posterior, se fusiona el hielo para eliminar finalmente el agua.

La liofilización, no altera la estructura fisico-química del material original crudo, pero permite su conservación indefinida sin cadena de frío. A diferencia de lo que pasa en el secado por calor, con la liofilización el aspecto, la textura, el sabor y el aroma del alimento crudo no se pierden. Por el contrario, se intensifican.



*Fig 2.7. Equipo de Liofilización de placas.
(Fuente: <http://nelsoncobba.blogspot.com>)*

CAPÍTULO III

3. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.

3.1 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN.

3.1.1 Tipo de Investigación.

La tesis por el propósito o finalidad perseguida es aplicada, ya que los taninos liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) se plantea aplicar sobre el coloide emulsionado de carne de res; por la clase de medios utilizados para obtener los datos es experimental , porque se desarrollarán diversas experiencias microbiológicas, fisicoquímicas y organolépticas; y por el nivel de conocimiento que se adquiere es exploratoria, porque permite explorar la propiedad antibacteriana que tiene la *Caesalpinia Spinosa* y demostrar su efecto inhibitorio frente a la bacteria patógena *Escherichia Coli* y a las bacterias aerobias mesófilas presentes en el coloide emulsionado de carne de res.

3.1.2 Nivel de Investigación.

La presente tesis tendrá un nivel de una investigación racional o crítica, ya que será reflexiva, sistemática y metódica, a partir de los resultados se obtendrán conocimientos poco conocidos del poder antibacteriano de los taninos, principio activo de la *Caesalpinia Spinosa* (tara), desarrollando una metodología experimental.

3.2 MÉTODO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

3.2.1 Metodología de la Investigación.

- a) Obtención del Extracto Tánico de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara).

✓ *Recolección del material vegetal.*

Proveedor: Miguel Salazar Arce (Comerciante).

Especie vegetal: *Caesalpinia Spinosa* (TARA).

Procedencia: Ayacucho

Parte de la Planta en estudio: Vainas.

Peso (g) de material vegetal: variable.

Volumen (ml) de extracto total: variable.

Volumen (ml) del inóculo utilizado: variable.

Los valores concernientes al peso del material vegetal, volumen del extracto total y el volumen del inóculo del extracto utilizado se fueron modificando conforme se daban los resultados en las diversas experiencias microbiológicas.

✓ *Tratamiento del material vegetal.*

Las vainas de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) fueron limpiadas superficialmente teniendo cuidado de no romperlas ya que son frágiles. Se procedió a lavarlas con una ligera corriente de agua fría y secarlas a temperatura ambiente, se le retiró con cuidado las semillas de color marrón oscuro en su interior, ya que éstas podrían restarle eficiencia en la operación de maceración.

✓ *Análisis Preliminares.*

Durante el presente trabajo, se experimentó con diferentes solventes para extraer los taninos contenidos en las vainas de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara), algunos de ellos se presentaron puros, y otros en una proporción establecida

combinado con otro solvente, a continuación se presentan todos los solventes utilizados en el siguiente cuadro.

Cuadro 3.1. Relación de Solventes utilizados en la experiencia.

SOLVENTE UTILIZADO	PROPORCION
Agua	PURO
Alcohol Etílico 96°	PURO
Alcohol etílico 96°-Agua	1:1
Alcohol etílico 96°-Agua	1:2
Alcohol etílico 96°-Agua	1:3
Alcohol etílico 96°-Agua	1:4
Alcohol etílico 96°-Agua	1:5
Alcohol etílico 96°-Agua	1:6

(Fuente: *Elaboración Propia*).

Los valores resultantes de las pruebas experimentales con los solventes anteriormente mencionados son mostrados en el *Apéndice C*.

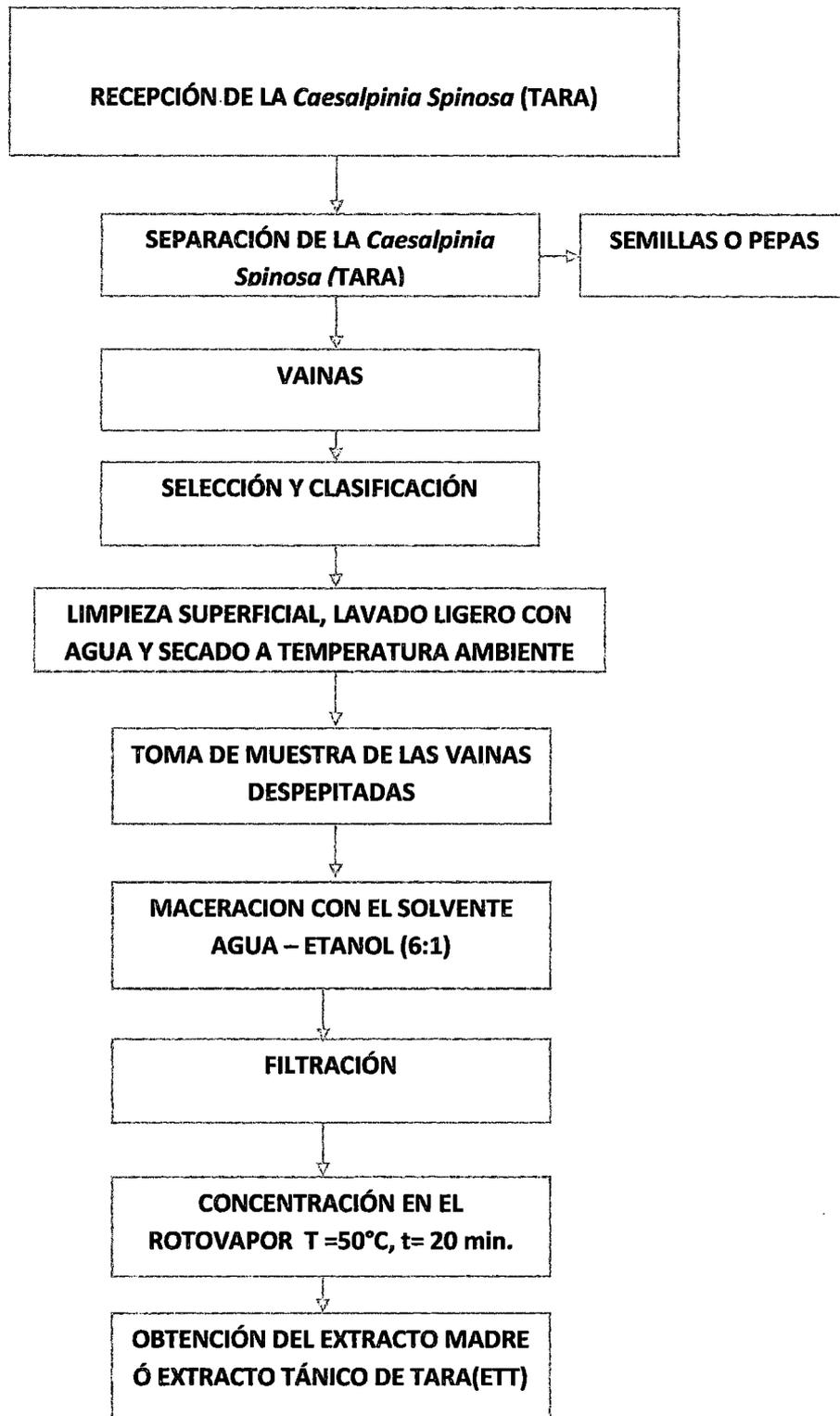
✓ *Elaboración del Extracto Tánico.*

Las vainas de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) limpias, lavadas y secadas fueron sometidas a la operación de maceración en frío en un determinado volumen de solvente para extraer los taninos contenidos en mayor porcentaje en ellas. Los tiempos de maceración, volúmenes de solventes, los pesos de las vainas de la Tara fueron variables como se puede apreciar en el *Apéndice C*.

Luego de un determinado período de maceración, se procedió a filtrar el extracto, siendo separadas las vainas; lo filtrado se concentró en el rotovapor a 50°C durante 20 minutos, para luego ser retirado una vez que se enfríe y depositado en un recipiente estéril convirtiéndose en el extracto madre de la presente tesis guardado en refrigeración a 4°C. A partir éste se fueron sacando

diversos volúmenes y de ésta diversas alícuotas para las experiencias fisicoquímicas y microbiológicas del trabajo de Tesis.

A continuación, se muestra un diagrama de flujo en bloques, el cual resume la obtención del extracto madre o extracto tánico de tara (ETT).



*Diagrama de Bloques para la Obtención de Extracto Tánico de Tara (ETT).
(Fuente : Elaboración personal).*

b) Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana.

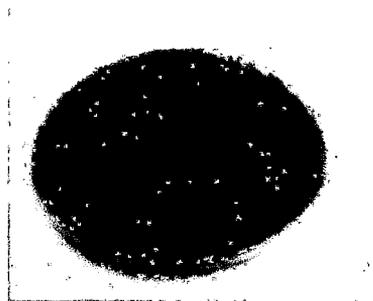
✓ *Aislamiento de los microorganismos.*

Los microorganismos en estudio fueron la bacteria patógena *Escherichia Coli* y las bacterias aerobias mesófilas, ellos fueron seleccionados teniendo en cuenta los siguientes criterios:

• *Escherichia Coli* :

Escherichia Coli es una bacteria unicelular. Se puede considerar el organismo procarionte más estudiado por el ser humano. Se encuentra generalmente en los intestinos animales, incluido el humano, y por ende, en las aguas negras. Esta bacteria produce vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo) , no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba IMVIC es ++--. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular. Es un agente patógeno característico, presente en las hamburguesas de carne, causante de muchas enfermedades. En la figura siguiente, se aprecia el aislamiento de la *Escherichia Coli* realizada para desarrollar las pruebas microbiológicas en la presente tesis.

**Fig 3.1. Siembra en placa petri de *Escherichia Coli* en Agar Mc. Conkey.
(Cepa aislada en placa).**

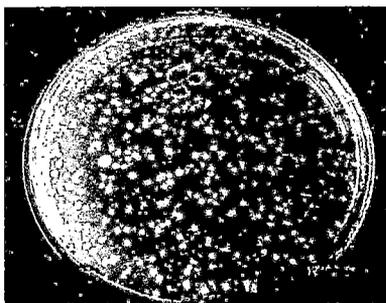


(Fuente: Elaboración propia)

- **Bacterias Aerobias Mesófilas :**

Son microorganismos que crecen entre 20 °C y 30 °C, con una temperatura óptima de crecimiento que está entre 30-40°C. En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30°C en las condiciones establecidas. Cuando se realiza un recuento de aerobios mesófilos se estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Son microorganismos que pueden estar en condiciones ambientales, se encuentran a nuestro alrededor, y son más proclives a encontrarse en cualquier alimento. En la figura siguiente, se aprecia el aislamiento de las bacterias aerobias mesófilas realizada para desarrollar las pruebas microbiológicas en la presente tesis.

Fig. 3.2. Siembra en placa petri de Bacterias aerobias mesófilas en Agar Nutritivo.



(Fuente: Elaboración propia)

La mayoría de los métodos de obtención de cultivos puros se basa en algún método de dilución. El método más útil y práctico es el aislamiento en placa, en el que el cultivo mezclado se extiende sobre la superficie de un medio de cultivo de modo que las células individuales quedan separadas una de otra. Cada célula aislada crece para formar una colonia y, por lo tanto, un cultivo (o clon) puro,

puesto que las células que componen la colonia son la progenie de una única célula original.

El aislamiento de los cultivos microbianos fue realizado por dos métodos de dilución, en medios de cultivo sólidos por estría en placa petri o en tubos con medios sólidos en forma inclinada; para luego ser almacenada en refrigeración a 4 °C, debidamente protegida para evitar una contaminación del medio de cultivo.

✓ *Activación de las cepas de los microorganismos.*

Cuando se desea emplear la cepa que fue aislada y almacenada en refrigeración, ésta debe ser activada a partir de un cepario de colección, para lo cual se tomará una muestra o inóculo para ser cultivado en un tubo de prueba con caldo BHI estéril a 37 °C por 24 horas. Habiendo obtenido colonias aisladas, se elige una cantidad de colonias suficientes como para producir una densidad comparativa a la mostrada por el nivel 0,5 de la escala de Mac Farland.

✓ *Técnica de difusión de disco en Agar .*

Forma parte de los Ensayos Biológicos a los que son sometidos algunos microorganismos; es una prueba de susceptibilidad antimicrobiana, que nos permitirá medir la susceptibilidad “in vitro” de microorganismos frente a una sustancia o a la mezcla de varias sustancias desconocidas de origen vegetal con potencial antimicrobiano (Torres,2007).

Una vez aislada la cepa del microorganismo en estudio en su respectivo medio, en condiciones estériles, se tomó una colonia de éste con ayuda de un Asa de Khole y se adicionó en 5 mL de solución salina al 1%, ajustándose con el tubo No 0.5 Mc Farland (10^5 UFC/mL). (*Mayor información en el Apéndice C*).

La suspensión ajustada en 10^5 UFC/mL fue sembrada masivamente con un asa triangular estéril en el Agar solidificado óptimo para el crecimiento de

cada microorganismo, siendo utilizado el Agar Mc. Conkey para la *Escherichia Coli* y el Agar Nutritivo para las bacterias aerobias mesófilas. Pasado un tiempo, se realizaron orificios en forma de discos en el Agar, a los cuales se les adicionó 1 mL de los diversos extractos tánicos obtenidos. El control positivo fue el Alcohol Etílico 70° y los controles negativos usados fueron el Agua y el Suero Fisiológico.

Se incubó a $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante 24 horas, para luego ser realizado el análisis, evaluación y medición de los halos de inhibición (mm) obtenidos, realizándose por triplicado.

3.2.2 Diseño de la Investigación.

El estudio está diseñado bajo las características de ser tipo prospectivo en razón de que el registro de la información se producirá según vayan ocurriendo las experiencias. Además el estudio se caracteriza por ser longitudinal estudiando la variable a lo largo del tiempo establecido por ser éste el determinante en la relación causa-efecto. Según el análisis y alcance de los resultados es de tipo experimental porque permitirá introducir los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) para conseguir inhibir el crecimiento de *E. Coli* y las bacterias aerobias mesófilas en el coloide emulsionado de carne para la elaboración de hamburguesas.

En la experimentación se determinaron tres tratamientos diferentes con tres (3) repeticiones cada uno.

3.3 UNIVERSO Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN.

La población y la muestra son de la misma magnitud en razón de que el efecto inhibidor del extracto tánico se medirá en todas las células de *Escherichia coli* y de bacterias mesófilas, que se encuentren presentes en el coloide emulsionado de carne para la elaboración de hamburguesas.

3.4 LOCALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

La presente Tesis se realizó en los Laboratorios del Centro Experimental de Investigación y en los Laboratorios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao (UNAC).

3.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

3.5.1 Obtención de las concentraciones experimentales del extracto tánico (W/V).

Se preparó una solución madre utilizando 3,2 g del liofilizado del extracto tánico de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) el cual fue disuelto en 10 mL de suero fisiológico (Solución E).

A partir de la solución E, se realizó diluciones sucesivas utilizando 5 mL de ésta y agregándole 5 mL de suero fisiológico, hasta lograr una concentración final de 20 mg/ mL.

De ésta forma se obtuvieron 5 soluciones:

Solución A: 20 mg/ mL.

Solución B: 40 mg/ mL.

Solución C: 80 mg/ mL.

Solución D: 160 mg/ mL.

Solución E: 320 mg/ mL.

3.5.2 Obtención de la concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto tánico de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara).

a) Insumos, Equipos y Materiales de Laboratorio.

Equipos:

- Estufa incubadora marca Memmert 20°C a 50°C.
- Estufa esterilizadora marca Memmert 20°C a 50°C.
- Equipo de Baño María de 25°C a 120°C.
- Centrifugadora hasta 1500 Rpm.
- Cámara de Refrigeración.
- Cutter a 1500 a 2000 Rpm (usando carne fresca).
- Balanza digital (precisión 0.01).
- Cuenta colonias.

Instrumentos:

- Placas Petri de vidrio con diámetro de 9.0 cm.
- Pipetas de vidrio (1, 5, 10 mL).
- Micropipetas (0.1 mL).
- Tubos de prueba de 10 mL con tapa.
- Probeta graduada (10, 100, 500 mL).
- Asa de Khole.
- Varilla perforadora.
- Triángulo de tubo vidrio.
- Tubos de vidrio sin tapa.
- Tubos de vidrio con tapa rosca de 20 mL.
- Tubos de vidrio especiales para centrifugación.
- Recipientes de Vidrio de 500 mL con tapa.
- Cuchillos.
- Termómetros.
- Cucharilla de acero inoxidable.
- Embudos pequeños.
- Baguetas.

- Pizetas.
- Algodón.
- Papel Kraft.
- Papel de Aluminio.
- Papel Filtro.
- Pavilo.
- Mechero de ron.
- Escobillas para probeta y matraz.
- Escobillas para tubos de ensayo.
- Gradillas.

Reactivos Químicos:

- Agar Mac Conckey.
- Agar Nutritivo.
- Caldo Maltosa.
- Caldo BHI.
- Suero Fisiológico.
- Caldo Triptona Soya estéril (TS).
- Agua Peptonada.

Implementos de Protección:

- Toca.
- Guantes.
- Protector nasobucal.
- Mandil para Laboratorio color blanco.

Material biológico:

- Coloide emulsionado de carne de res.

Material experimental:

- Extracto tánico extraído de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (tara).

b) Preparación de la cepa.

La mínima concentración de extracto tánico de la corteza de la *Caesalpinia Spinosa* (tara), capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y mesófilos aerobios se determinó mediante la técnica de macrodilución en caldo TS, utilizando un inóculo de 0,1 mL cuya concentración celular igual a 10^5 .

c) Formación de Grupos Experimentales.

- Grupos experimentales (A, B, C, D, y E).

Se dispuso de 18 tubos con tapa rosca, con capacidad de 20 mL, estériles. Cada grupo experimental estuvo formado de 3 tubos.

- Grupo Control C (0 mL. del extracto tánico de la Tara).

Compuesto por 3 tubos con tapa rosca, capacidad de 20 mL, estériles, en los cuales se depositaron 9.9 mL de caldo triptona soya estéril. Este grupo no contiene Extracto Tánico de la Tara (ETT).

De forma inmediata y en condiciones de esterilidad se inoculó 0.1 mL de la cepa activada con una población de 10^5 UFC/ mL de *Escherichia coli* (siendo realizado de la misma manera con las bacterias aerobias mesófilas).

Se homogenizó el tubo con movimientos de rotación a fin de lograr una distribución adecuada de las células bacterianas.

Inmediatamente se extrajo 0.1 mL y se determinó sus Unidades Formadoras de Colonia existentes (UFC/ mL).

Luego los tubos fueron almacenados en refrigeración a temperatura < 5 °C.

- Grupo experimentales para E. coli.

Cabe indicar que también se formaron grupos con las bacterias aerobias mesófilas.

- Grupo experimental A

A 3 tubos estériles con 9.8 mL caldo triptona de soya estéril se incorporaron 0.1 mL de la solución de Extracto Tánico de Tara (ETT) de concentración 20 mg/mL.

De forma inmediata y en condiciones de esterilidad se inoculó 0.1 ml de la cepa activada con una población de 10^5 UFC/ mL de *Escherichia coli*.

Se homogenizó el tubo con movimientos de rotación a fin de lograr una distribución adecuada de las células bacterianas y del extracto.

Inmediatamente se extrajo 0.1 mL y se determinó sus Unidades Formadoras de Colonia existentes (UFC/ mL a Tiempo 0).

Todos los tubos fueron incubados a 37 °C por 24 horas. Al término de este periodo se observó la turbidez a simple vista. De inmediato se obtuvo de cada tubo experimental 0.1 mL. a fin de estimar la UFC/mL.

- Grupo experimental B, C, D y E

Estos grupos experimentales se organizaron de la misma forma que el grupo experimental A, con la diferencia que al grupo B, C, D y E se incorporó 0,1

mL de la solución de Extracto Tánico de Tara (ETT) de concentración 40, 80, 160 y 320 mg/mL en forma correspondiente.

Para efecto de la obtención de las Concentraciones Mínimas inhibitorias para Escherichia coli se medirán las Unidades formadoras de Colonias (UFC/mL) por triplicado. De la misma manera se desarrollará para las bacterias aerobias mesófilas.

Tabla 3.1. Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Extracto Tánico de Tara (ETT) para inhibir el crecimiento de E. Coli.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO TÁNICO DE TARA (ETT) PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE E. coli																		
Repeticiones	Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml)																	
	0 mg/ mL ETT			20 mg/ mL ETT			40 mg/ mL ETT			80 mg/ mL ETT			160 mg/ mL ETT			320 mg/ mL ETT		
1																		
2																		
3																		
Promedio																		
Desv. Estand.																		
ANOVA																		
P < 0,05																		

(Fuente : Elaboración Propia)

3.5.3 Obtención del coloide emulsionado de carne de res para la elaboración de hamburguesas.

a) Insumos, Materiales y Equipos.

- Carne de res (1.5 Kg.).
- Grasa (10 gr)
- Hielo (variable).
- Sal (pizca).
- Homogenizador de cuatro velocidades, con vaso esterilizable.
- Balanza con sensibilidad de 0.01 gr.
- Guantes quirúrgicos.
- Mandil, toca y protector nasobucal.
- Tabla de picar estéril.
- Utensilios estériles para la preparación de las muestras: cuchillos, cucharas, espátulas.
- Recipiente previamente limpio y estéril.
- 6 Tapers herméticos de tamaños pequeños previamente limpios y estériles.
- Papel de aluminio.
- Rótulos de identificación de muestras.

b) Procedimiento.

El coloide emulsionado obtenido de la carne de res, necesario para nuestra investigación, fue preparado en condiciones higiénicas, en un ambiente estéril y haciendo uso de materiales completamente sanitizados, la carne previo a su uso, fue lavada en forma sucesiva con porciones de agua potable. La obtención del coloide emulsionado de carne de res se realizó de la siguiente manera:

- PASO 1 : EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS
A la carne de res se le adicionó una pizca de sal, hielo (constituyendo el 34 % de la mezcla), y se premezcló antes de pasar al homogenizador.

- PASO 2 : FORMACIÓN DE LA EMULSIÓN
Se adicionó grasa y 33% de hielo, se amasa hasta obtener una pasta homogénea.

- PASO 3 : ADICIÓN DE LIGANTES
Se empleó una pizca de sal.

El coloide proteico obtenido se conserva en refrigeración a 5– 8°C, hasta su uso.

3.5.4 Determinación del efecto antibacteriano del extracto tánico en el coloide emulsionado de carne.

Se utilizó 1.2 Kg. del coloide emulsionado obtenido a partir de la carne de res, el cual se dividió en 6 porciones de 200 g. c/u.

i) Efecto Antibacteriano del Extracto Tánico sobre *Escherichia Coli* en el Coloide Emulsionado.

- Grupo Control.

El coloide emulsionado, exento de conservantes, se utilizó en una cantidad de 200g. el cual se depositó en un recipiente de vidrio de 500 mL con tapa y estéril.

Se procedió a inocular en condiciones de esterilidad con 0.1 mL de la cepa activada de *Escherichia coli* con una densidad de población de 10^5 UFC/ mL. La densidad del inóculo se obtuvo de acuerdo a la técnica de Mac Farland. El inóculo se homogenizó de manera apropiada.

Inmediatamente se obtuvo una muestra de 10 g. a la cual se le cuantificó UFC/g. de *Escherichia.coli* a tiempo 0.

Luego de haber obtenido la muestra para el análisis, el resto del coloide se almacenó en refrigeración a una temperatura regulada entre 5 °C – 8 °C.

Cada 3 días se obtenía una muestra de 10 g. a fin de calcular las UFC/g, de cada grupo bacteriano. Esta iteración se repitió por un periodo de 30 días. Por cada iteración se realizaron mediciones de la UFC/g por triplicado.

Con los valores obtenidos se obtuvo la tasa de crecimiento microbiano (Tiempo lag) y la velocidad de crecimiento (μ) del grupo bacteriano experimentado.

- Grupos experimental 1: Extracto Tánico de Tara (ETT) 20 mg/mL.

Para este grupo experimental se dispuso de un recipiente de vidrio cuya capacidad fue de 500 ml. con tapa y estéril. En este recipiente se distribuyó una cantidad de 200 g. del coloide emulsionado.

Inmediatamente las muestras de coloide emulsionado fueron inoculados en condiciones de esterilidad con 0.1 mL de la cepa activada de *Escherichia coli* con una densidad de población de 10^5 UFC/ mL. La densidad del inóculo se obtuvo de acuerdo a la técnica de Mac Farland. El inóculo se homogenizó de manera apropiada.

Enseguida se agregó μ g CMI de ETT para *Escherichia coli*, tratando de homogenizarlo convenientemente por toda la masa.

Luego se obtuvo una muestra de 10 g. a la cual se le cuantificó UFC/g. de *Escherichia coli* a tiempo 0.

Luego de haber obtenido la muestra para el análisis, el resto del coloide se almacenó en refrigeración a una temperatura regulada entre 5 °C – 8 °C.

Cada 3 días se obtuvo una muestra de 10 g. a fin de calcular las UFC/g, repitiéndose esta iteración por un período de 30 días. Por cada iteración se realizaron mediciones de la UFC/g por triplicado.

Con los valores obtenidos se obtuvo la tasa de crecimiento microbiano (Tiempo lag) y la velocidad de crecimiento (μ) de *Escherichia coli*.

- Grupos experimentales 2, 3, 4, 5.

Se procederá de la misma forma que el Grupo experimental 1 con la diferencia que las concentraciones utilizadas del extracto tánico de tara serán las correspondientes con las concentraciones contenidas en las soluciones con concentraciones 40,80,160 y 320 mg/mL, respectivamente.

- ii) Efecto Antibacteriano del Extracto Tánico sobre Bacterias Aerobias Mesófilas en el Coloide Emulsionado.

Se utilizará el mismo diseño experimental para cuantificar el efecto del extracto tánico sobre las bacterias aerobias mesófilas. Con los valores obtenidos se obtendrá la tasa de crecimiento microbiano (Tiempo lag) y la velocidad de crecimiento (μ) de las *bacterias aerobias mesófilas*.

La existencia del efecto de las concentraciones de extracto tánico de tara (ETT) sobre el crecimiento de Escherichia coli se medirá mediante la expresión de Unidades Formadoras de Colonia /mL (UFC/mL), obtenidas a través de 11 iteraciones, durante un período de 30 días. De la misma manera se determinará para las bacterias aerobias mesófilas.

Tabla 3.2. Efecto de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del Extracto Tánico de Tara (ETT) sobre el crecimiento de *E.Coli*.

EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DEL EXTRACTO TÁNICO DE TARA (ETT) SOBRE EL CRECIMIENTO DE E. coli																		
Días	Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml)																	
	0 mg/ mL			20 mg/mL			40 mg/mL			80 mg/mL			160 mg/mL			320 mg/ mL		
	ETT			ETT			ETT			ETT			ETT			ETT		
0																		
3																		
6																		
9																		
12																		
15																		
18																		
21																		
24																		
27																		
30																		
N																		
μ.																		
T lag																		
ANOVA																		
P < 0,05																		

(Fuente : Elaboración Propia)

3.5.5 Determinación de la actividad antibacteriana de los taninos liofilizados a partir del extracto tánico de la *Caesalpinia Spinosa* (tara).

i) Tratamiento del extracto tánico de tara (ETT).

Un volumen del Extracto Tánico de Tara (ETT) obtenido se adicionó en el plato del equipo de liofilización, para luego ser almacenado en congelación a -5°C, debidamente protegido hasta su posterior uso en la investigación.

ii) Obtención de los taninos liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa*.

El ETT congelado fue colocado en el equipo de liofilización, controlando los indicadores del proceso como son la temperatura y presión se procedió a iniciar la liofilización durante un lapso de tiempo óptimo de proceso.

iii) Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de los taninos liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (tara).

✓ Activación de los taninos liofilizados.

Los taninos de las vainas de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) liofilizados, fueron activados adicionando una cantidad variable (gr) en un volumen de 5 mL de suero fisiológico como solución diluyente, para luego ser homogenizada y almacenada en un recipiente estéril a fin de ser emplearse en las diversas experiencias microbiológicas.

El peso de los taninos liofilizados fue variando, conforme se daban los resultados de las experiencias, con el fin de conseguir la concentración mínima inhibitoria necesaria para lograr la inhibición de las bacterias aerobias mesófilas y la *Escherichia Coli*.

- ✓ Preparación de las cepas.

La mínima concentración de la solución activada de liofilizado de la *Caesalpinia Spinosa* (tara), capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y mesófilos aerobios se determinó mediante la técnica de macrodilución en caldo TS, utilizando un inóculo de 0,1 mL cuya concentración celular igual a 10^5 .

- ✓ Formación de los Grupos Experimentales.

La formación de los grupos experimentales será la misma utilizada para la determinación de la concentración mínima inhibitoria del Extracto Tánico de Tara (ETT), con la diferencia que esta vez el ETT será reemplazado por la Solución Activada de Taninos Liofilizados.

- ✓ Pruebas confirmativas

Para comprobar la actividad antibacteriana de la Solución Activada de Taninos Liofilizados, las pruebas serán las mismas que experimentó el extracto tánico de tara, siendo evaluado y analizado en el coloide emulsionado de carne de res.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS EXPERIMENTALES.

La presente investigación se basó en un estudio experimental cuantitativo, el análisis estadístico se determinó por medio de la prueba ANOVA (Análisis de varianza). Cada ensayo se realizó tres (3) veces.

3.6.1 Concentración Mínima Inhibitoria.

Los valores promedios en Log. UFC/ mL de sobrevivientes de *Escherichia coli* y de bacterias aerobias mesófilas correspondientes a cada concentración del Extracto Tánico de Tara (ETT) fueron procesados mediante el diseño estadístico del análisis de varianza. La existencia de efecto de cada una las

concentraciones de ETT se midió entre cada unidad experimental de cada grupo y entre grupos experimentales. Se consideró un nivel de significancia $\alpha=0.05$, con 3 repeticiones.

3.6.2 Efecto de las Concentraciones del Extracto Tánico de Tara (ETT) sobre el crecimiento bacteriano.

La existencia del efecto de las concentraciones del extracto tánico de tara (ETT) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y de bacterias aerobias mesófilas para cada concentración experimental se midió a través de la velocidad de crecimiento y tiempo de latencia o tiempo Lag que obtenga cada concentración durante un periodo de 30 días. La semejanza o diferencia de cada curva de crecimiento se estableció mediante el análisis de varianza ANOVA, con un nivel de significancia $p=0,05$, utilizando 11 iteraciones. La estimación del mejor efecto significativo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y de bacterias aerobias mesófilas, se obtuvo por las comparaciones múltiples que son posibles con 3 unidades repetitivas para 3 tratamientos.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

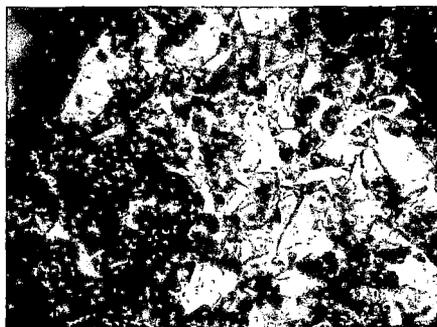
A partir de diferentes pesos de vainas de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) se obtuvieron sus respectivos Extractos Tánicos, según metodología de trabajo (Apéndice C).

Fig. 4.1. *Caesalpinia Spinosa* (Tara).



(Fuente: Elaboración propia).

Fig 4.2 . Vainas de la *Caesalpinia Spinosa* lavadas y secadas a temperatura ambiente.



(Fuente: Elaboración propia).

En la operación de Selección y Clasificación de la materia prima, se tuvo que separar una considerable cantidad de vainas de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) debido a que por el tiempo y la mala conservación personal de éste se oxidaba y se volvía inservible para su empleo en las pruebas experimentales.

Fig 4.3 . Separación de las vainas de la *Caesalpinia Spinosa* oxidadas en la Selección de la materia prima.



(Fuente: Elaboración propia).

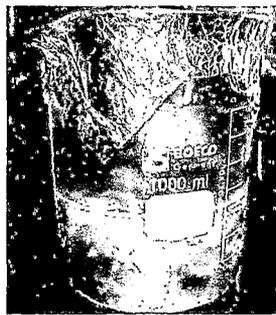
La mezcla utilizada como solvente para la operación de maceración en frío estuvo formada por Alcohol Etílico 96° y Agua estéril en una proporción de 1 : 6, esta proporción fue determinada teniendo en consideración factores como la inhibición de la bacteria patógena *Escherichia Coli* y de los aerobios mesófilos, y el hecho de que debía de ser factible la congelación del ETT con alcohol, donde se presentaba el problema de que el alcohol solo se congela a temperaturas criogénicas, lo cual era difícil conseguir ya que no contábamos con el equipo necesario para tal actividad.

La determinación de la correcta proporción de los componentes de la mezcla utilizada como solvente para la operación de la maceración fue debidamente reportada en un cuadro de datos experimentales, que se puede apreciar en el *Apéndice C*, en el cual se detalla cómo se manifestaba la inhibición de los diferentes microorganismos.

Para poder evaluar la actividad antimicrobiana de extractos tánicos provenientes de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) frente a bacterias y microorganismos patógenos

como la *Escherichia Coli*, se diseñó un experimento en el cual se demuestre el poder bactericida de los Taninos. En este experimento, la capacidad antimicrobiana es medida a través el diámetro del halo de inhibición, el cual es afectado por dos factores: el microorganismo y el extracto vegetal, en donde la actividad antimicrobiana de varios extractos tánicos es evaluada sobre los diferentes microorganismos seleccionados.

Fig 4.4 . Maceración de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) en el solvente Hidroalcohólico.



(Fuente: Elaboración propia).

Los resultados de las pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana a la que fueron sometidos los diferentes Extractos Tánicos de Tara en las pruebas experimentales son apreciados en el *Apéndice C* indicándose que para diferentes pesos de vainas de tara, volúmenes de solvente y tiempos de maceración, la existencia, coloración, tamaño e intensidad de los halos de inhibición presentes; donde el control positivo fue el Alcohol Etilico 70° y los controles negativos el Agua y el Suero Fisiológico.

A partir de dichas pruebas, se pudo apreciar las mejores inhibiciones a los microorganismos, empleando diferentes concentraciones de ETT, esto se expresaba en el tamaño del halo que presentaron; los más grandes diámetros de los halos de inhibición que se presentaron en las diversas pruebas se indican en el siguiente cuadro:

Cuadro 4.1. Mayores tamaños de diámetros de los Halos de inhibición presentados en las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.

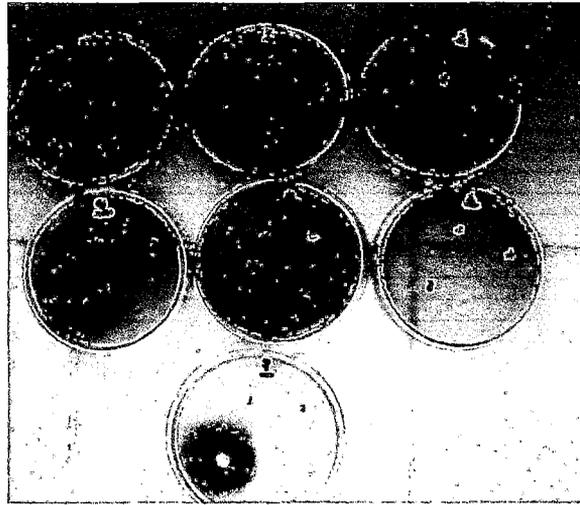
SOLUTO	SOLVENTE	TIEMPO DE MACERACIÓN	PROMEDIO DEL DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)
Tara	Alcohol Etilico 96°	21 días	19.50
Tara	Alcohol Etilico 96°-Agua estéril (1 :1)	12 horas	23.00
Tara	Alcohol Etilico 96°-Agua estéril (1 :1)	24 horas	29.10
Tara	Alcohol Etilico 96°-Agua estéril (1 :2)	12 horas	20.23
Tara	Alcohol Etilico 96°-Agua estéril (1 :2)	24 horas	24.83
Tara	Alcohol Etilico 96°-Agua estéril (1 :2)	12 horas	20.23

(Fuente : *Elaboración Propia*).

Conforme se iban dando los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los diferentes extractos tánicos, se mejoraba la concentración del ETT para poder realizar la mayor extracción de taninos de las vainas de la Tara.

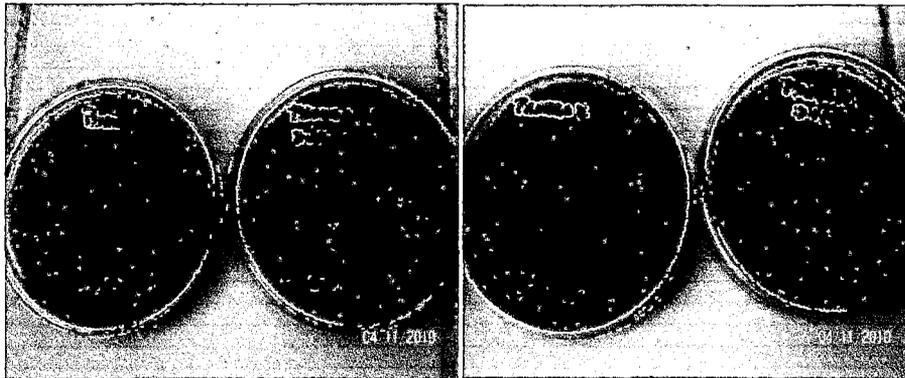
El Extracto Tánico de Tara (ETT) con la mayor inhibición a los microorganismos por el tamaño del halo que presentó fue empleando un peso de 30 gramos de vainas de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) en un volumen de solvente (Alcohol Etilico 96° - Agua estéril, en una proporción de 1:1) por un tiempo de maceración de 24 horas, con un promedio de tamaño de diámetro del halo de inhibición de 29.10 mm, estableciéndose una comparación con el control positivo de Alcohol Etilico a 70° que presentó tamaños de diámetro de halos de inhibición desde 17.53 mm hasta 22.23 mm , siendo éste último el de mayor tamaño de halo de inhibición, por lo cual se puede determinar que el ETT seleccionado supera en el poder de inhibición al mismo Control positivo empleado.

Fig 4.5. Ensayos Biológicos con diferentes concentraciones de extractos tánicos a partir de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) frente a los microorganismos seleccionados: Técnica de difusión en Agar sobre la *Escherichia Coli* y Aerobios Mesófilos.



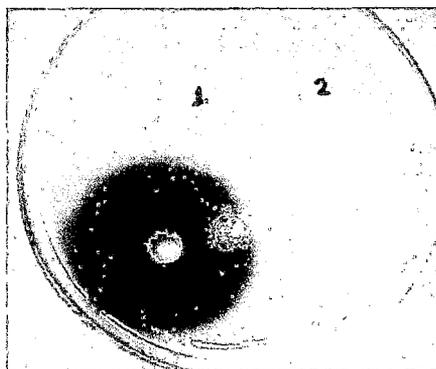
(Fuente: Elaboración propia).

Fig 4.6 . Ensayos Biológicos con diferentes concentraciones de extractos tánicos a partir de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) frente a los microorganismos seleccionados: Técnica de difusión en Agar Nutritivo sobre la *Escherichia Coli*.



(Fuente: Elaboración propia).

Fig 4.7 . Comparación de los colores e intensidades del halo de inhibición luego de la adición del ETT.



(Fuente: Elaboración propia).

Al Extracto Tánico de Tara (ETT) óptimo se le realizó ensayos cualitativos para su análisis, éstos fueron determinados en forma numérica, con valores que oscilan entre el 0 y el 3 indicando su ausencia o presencia de tanino, expresado en el siguiente cuadro:

Cuadro 4.2 Ensayos cualitativos realizados al E.T.T. óptimo.

Especie Vegetal	PRESENCIA DE TANINOS		
	Sabor astringente	Solución de FeCl ₃	Solución de Formaldehído
<i>Caesalpinia Spinosa</i> (Tara)	2	3	2

(Fuente : Elaboración Propia).

Donde:

- 0 = indica ausencia total de taninos.
- 1 = indica ligera presencia de taninos.
- 2 = indica presencia media de taninos.
- 3 = indica una notable presencia de taninos.

Se puede apreciar que el ETT indica *cualitativamente* una presencia media de taninos.

A los diferentes extractos tánicos de tara presentados en el Apéndice C, se le realizaron diversos ensayos como la de cuantificación de taninos que presentan empleando el Método del Tungsto-molibdico-fosfórico (Miranda, M., 1992). (*Mayor información ver Anexo N° 4*), y la determinación de la existencia de taninos del tipo hidrolizable (*Mayor información ver Anexo N° 3*) característico en la *Caesalpinia Spinosa* (Tara).

La cuantificación de los taninos (% / 100 mL) se determinaron para cada extracto tánico de tara, donde aquellos que presentaron los mayores porcentajes de taninos extraídos del proceso de maceración en frío fueron los siguientes:

Cuadro 4.3. Determinación los mayores porcentajes de Taninos de los Extractos Tánicos de Tara empleando el Método del Tungsto-molibdico-fosfórico.

SOLUTO	SOLVENTE	TIEMPO DE MACERACIÓN	PORCENTAJE DE TANINOS (%/100 mL)
Tara	Alcohol Etilico 96°	12 horas	19.50
Tara	Alcohol Etilico 96°	18 horas	20.60
Tara	Alcohol Etilico 96°	24 horas	21.50
Tara	Alcohol Etilico 96°	5 días	25.40
Tara	Alcohol Etilico 96°	21 días	29.00
Tara	Agua estéril	21 días	19.50
Tara	Alcohol Etilico 96°-Agua estéril (1 :1)	12 horas	19.90
Tara	Alcohol Etilico 96°-Agua estéril (1 :1)	24 horas	21.00
Tara	Alcohol Etilico 96°-Agua estéril (1 :2)	24 horas	20.20

(Fuente : *Elaboración Propia*).

Se puede desprender del cuadro, el hecho que el extracto tánico de tara utilizando Alcohol Etilico de 96° como solvente de extracción por un tiempo de maceración de 21 días fue el que presentó mayor porcentaje de taninos en su composición con un 29% en 100 mL de ETT, mientras que el extracto tánico de tara utilizando como solvente la mezcla de Alcohol Etilico 96° - Agua estéril (1:1) por un tiempo de maceración de 24 horas, que fue el que resultó el ETT con mejor poder

de inhibición frente a los microorganismos, presentó un 21 % de taninos en 100 ml de ETT, siendo el cuarto mejor extracto tánico con mayor porcentaje de taninos presente. Por ende, se tendrá dos extractos tánicos diferentes que tienen dos cualidades importantes para encontrar el más óptimo a utilizarse.

Toda nuestra investigación iba perfilándose a encontrar el mejor ETT, pero ambos extractos tánicos fueron descartados debido a que no podían congelarse y por lo tanto no se les podía realizar la operación de Liofilización, necesaria a realizarse en la presente Tesis; es por esto, que se evaluó todos los extractos verificándose que pudiesen congelarse y posteriormente liofilizarse.

Resultando, que el extracto tánico de tara, que emplea un peso de vaina de tara de 10 gramos en un volumen de solvente de 60 mL, conformado por la mezcla de Alcohol Etílico- Agua estéril (1 :6) por un tiempo de maceración de 24 horas, presentó no solo la capacidad de congelarse en 12 horas sino también presentó una inhibición frente a los microorganismos positiva, teniendo un promedio del diámetro del halo de inhibición de 16.20 mm con una coloración ligeramente marrón, y contando con un porcentaje de taninos de 18% en 100 mL de ETT.

A dicho Extracto Tánico de Tara (ETT) se le realizó la operación de liofilización bajo las siguientes condiciones de operación:

$$P = 444 \mu\text{Hg}$$

$$T = -47 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$P_{\text{vacio}} = 224 \text{ VCA}$$

$$t = 9 \text{ horas /día} \rightarrow 3 \text{ días de operación} \rightarrow 27 \text{ horas}$$

Estas condiciones se obtuvieron a partir de una serie de pruebas experimentales a las que se sometieron los diversos extractos tánicos anteriormente tratados, ajustando el tiempo de operación con la temperatura y presión de trabajo,

determinando cuales son las condiciones más óptimas para lograr evaporar la mayor cantidad de agua y contar con mucho más producto liofilizado.

Un factor determinante para hallar el tiempo de operación óptimo en el proceso, fue la variación de los pesos inicial (antes de la liofilización) y final (luego de la Liofilización), el cual al no indicar una variación considerable se fijaba el tiempo conseguido de operación.

Tres extractos tánicos de tara sometidos a la operación de liofilización se realizaron por duplicado. Los datos de algunas pruebas experimentales de liofilizados se muestran a continuación:

Tabla 4.1 Control de los Pesos de las Muestras de Taninos Liofilizados con respecto al tiempo.

Tiempo(días)	N° PLATOS								
	1			2			3		
	W. inicial (plato+muestra) (gr)	W. final (plato +muestra) (gr)	W.liofilizado (muestra) (gr)	W. inicial (plato+muestra) (gr)	W. final (plato +muestra) (gr)	W.liofilizado (muestra) (gr)	W. inicial (plato+muestra) (gr)	W. final (plato +muestra) (gr)	W.liofilizado (muestra) (gr)
1	349	326.2	22.8	444	386.8	57.2	390.8	346.6	44.2
2	326.4	326.2	0.2	386.9	333.8	53.1	346.6	325	21.6
3	325.9	325.8	0.1	333.9	333.7	0.2	325	324.9	0.1
1	404	348.9	55.1	492.6	444	48.6	427.8	390.9	36.9
2	348.9	326.2	22.7	444	386.8	57.2	390.9	346.6	44.3
3	326.2	326.2	0	386.8	386.5	0.3	346.6	346.4	0.2

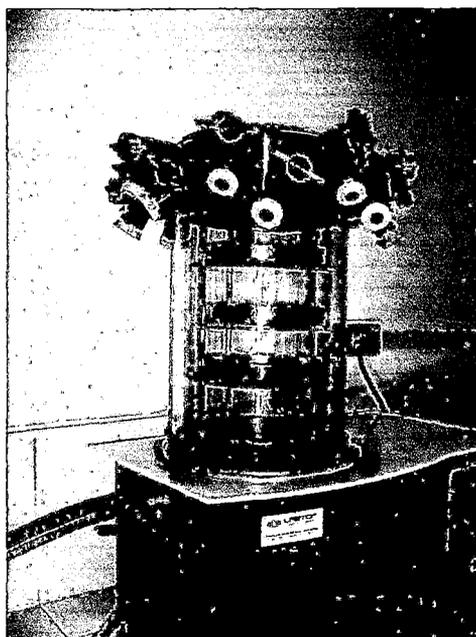
(Fuente : Elaboración Propia).

Fig 4.8-4.9. Bomba del Equipo de Liofilización.

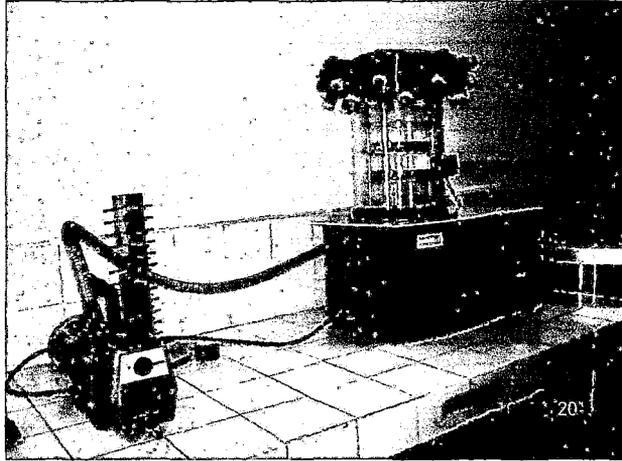


(Fuente: Elaboración propia).

Fig 4.10-4.11. Equipo de Liofilización.

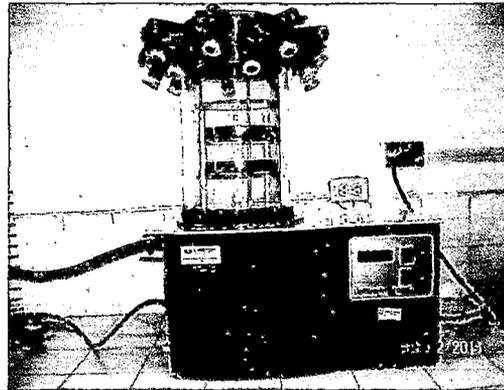
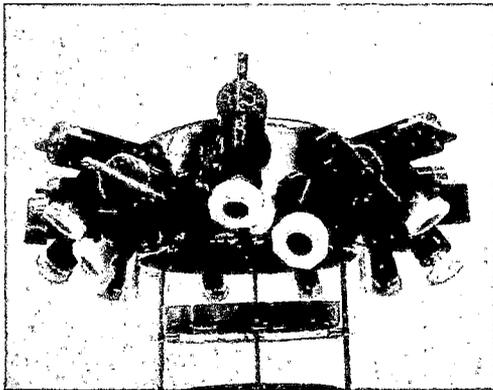


(Fuente: Elaboración propia).

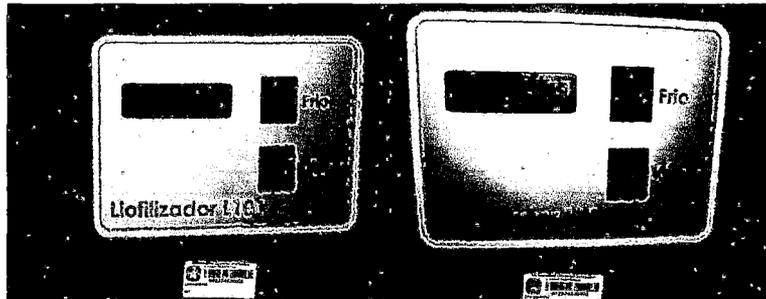


(Fuente: Elaboración propia).

Fig 4.12-4.15. Partes del Equipo de Liofilización.

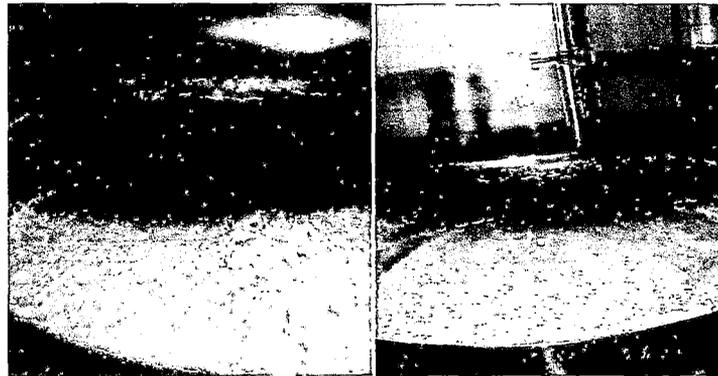
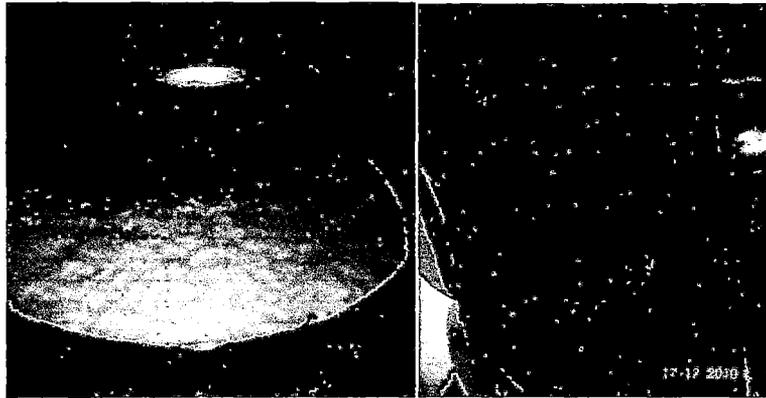


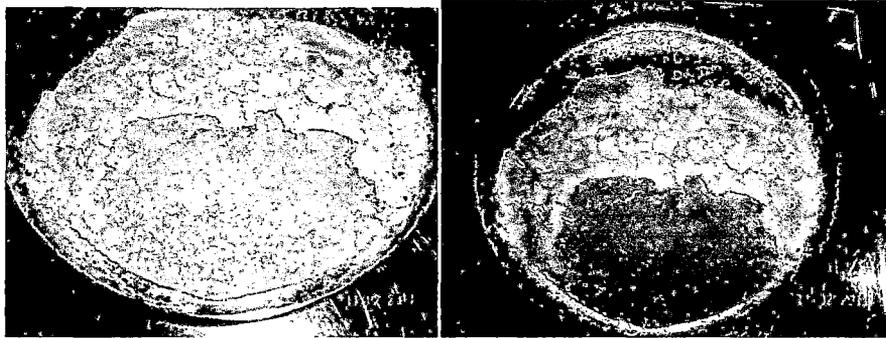
(Fuente: Elaboración propia).



(Fuente: Elaboración propia).

Fig 4.16-4.22. Muestras de Taninos Liofilizados dentro del Liofilizador.

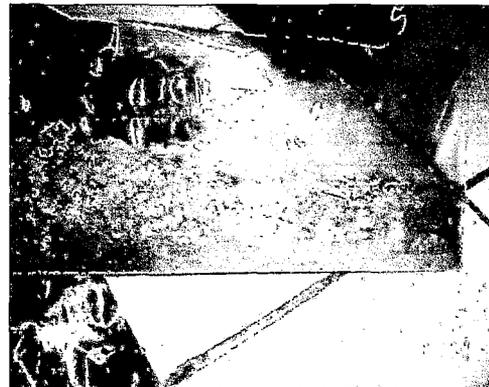
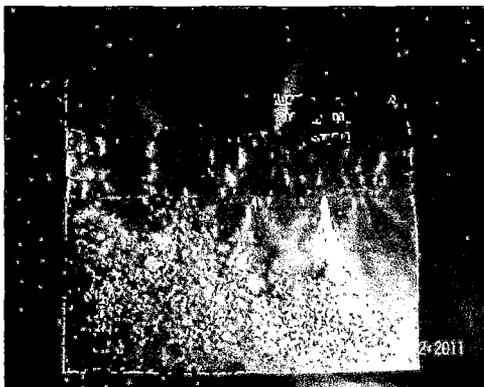
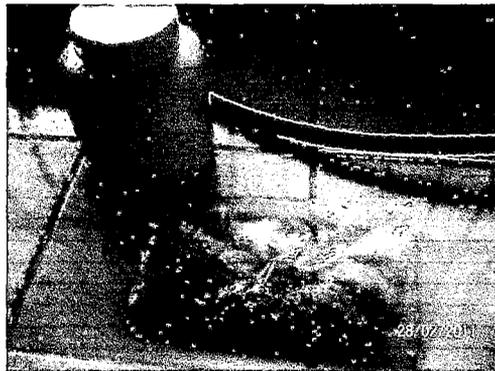


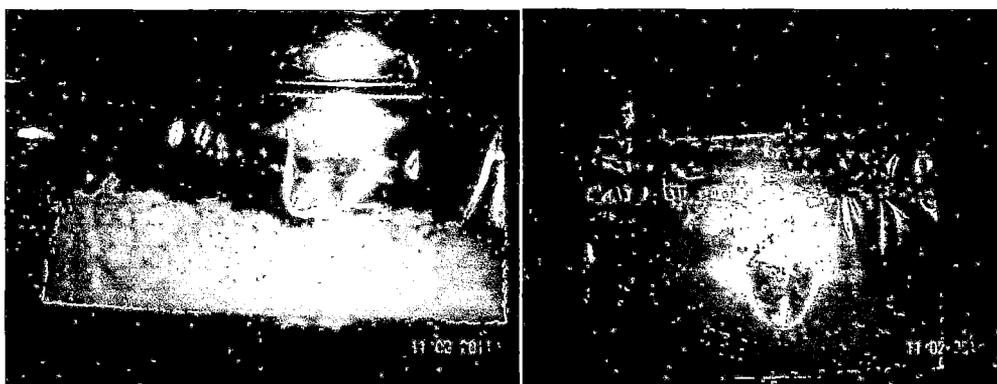


(Fuente: Elaboración propia).

Los Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) fueron debidamente almacenados dentro de una bolsa transparente estéril para luego sellarse y colocarse dentro de un recipiente óptimo (evita captar la humedad del entorno).

Fig 4.23-4.27 Muestras de la obtención de Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara).





(Fuente: Elaboración propia)

La Solución Activada de Taninos Liofilizados se consigue cuando adicionamos un peso de 3.2 gramos de taninos liofilizados en 10 mL de suero fisiológico, homogenizamos la muestra e inmediatamente realizamos las diversas pruebas experimentales microbiológicas posteriores a la investigación.

A partir de este Extracto Tánico de Tara (ETT) se determinaron las diferentes concentraciones mínimas inhibitorias para las bacterias aerobias mesófilas, expresadas en UFC/ mL por triplicado (*Mayor Información ver Anexo N°8*). Los resultados de las pruebas microbiológicas son mostrados a continuación:

Cuadro 4.4. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del ETT para la inhibición de las bacterias aerobias mesófilas.

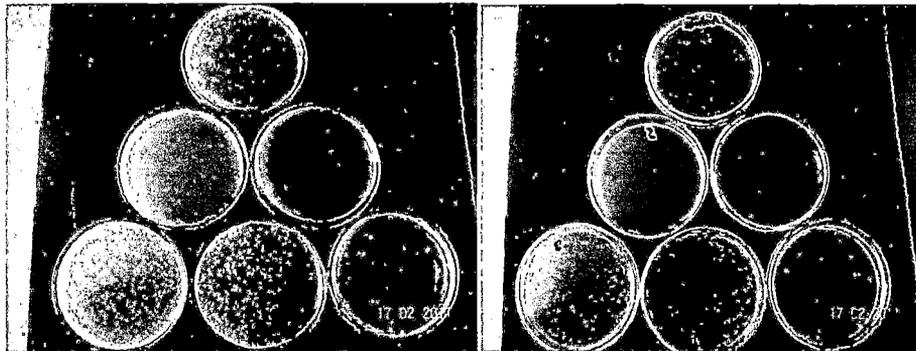
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO TÁNICO DE TARA (ETT) PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS						
Repeticiones	Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL)					
	0 mg/mL ETT	20 mg/mL ETT	40 mg/mL ETT	80 mg/mL ETT	160 mg/mL ETT	320 mg/mL ETT
1	1.60E+07	1.00E+07	9.00E+06	8.40E+06	6.40E+06	3.00E+06
2	1.19E+07	9.80E+06	8.00E+06	1.00E+07	6.70E+06	4.20E+06
3	1.21E+07	1.10E+07	1.00E+07	9.90E+06	6.20E+06	4.00E+06
<i>Promedio</i>	<i>1.33E+07</i>	<i>1.03E+07</i>	<i>9.00E+06</i>	<i>9.43E+06</i>	<i>6.43E+06</i>	<i>3.73E+06</i>
<i>Desv. Estándar</i>	<i>2.31E+06</i>	<i>6.43E+05</i>	<i>1.00E+06</i>	<i>8.96E+05</i>	<i>2.52E+05</i>	<i>6.43E+05</i>

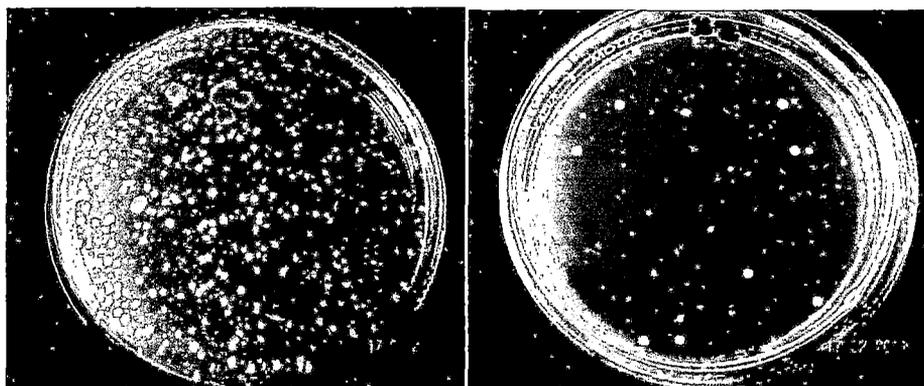
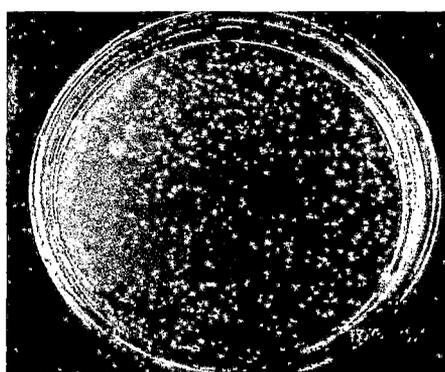
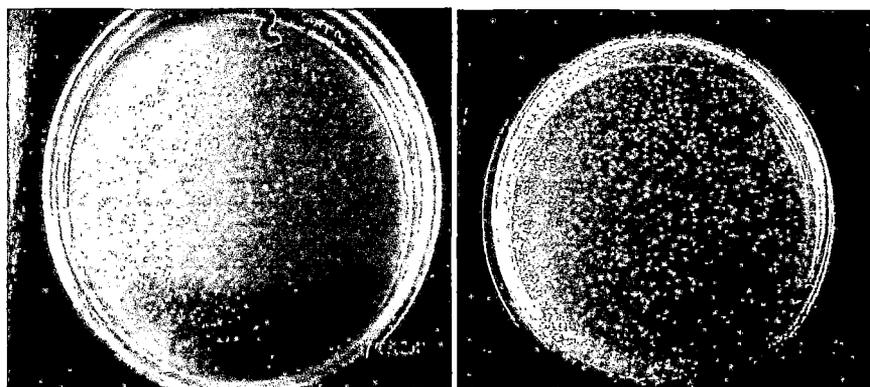
(Fuente: Elaboración propia).

En el cuadro anterior, se observa que disminuye las unidades formadoras de colonia de las bacterias aerobias mesófilas UFC/mL, conforme aumenta la concentración del ETT; aunque no es una disminución considerable se debe tener en cuenta que son resultados en el tiempo cero, es decir, un mínimo contacto del ETT con los microorganismos, logra las reducciones de microorganismos mostradas.

En la presente tesis, no se produjo ningún efecto inhibitorio de consideración con concentraciones por debajo de 160 mg/ mL de ETT; por lo tanto, se decidió tomar esta concentración como la medida de bioactividad, por dicha razón las posteriores pruebas solo se trabajará con tres tratamientos: el control (0 mg/ mL ETT) y las concentraciones de de 160 y 320 mg/ mL de ETT.

Fig 4.28-4.34 Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias para la Inhibición de Bacterias Aerobias Mesófilas a partir de las diferentes concentraciones de ETT.





(Fuente: Elaboración propia).

Luego se realizó el análisis estadístico ANOVA para los datos dados, encontrándose lo siguiente:

Hipótesis alternativa: *El extracto tánico de Tara (ETT) tiene efecto inhibitorio sobre las bacterias Aerobias Mesófilas .*

Hipótesis nula: El extracto tánico de Tara (ETT) no tiene ningún efecto inhibitorio sobre las bacterias Aerobias Mesófilas .

Tabla 4.2 Prueba ANOVA para la Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del ETT para la inhibición de las bacterias Aerobias Mesófilas.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0 mg/ml ETT	3	4.00E+07	1.33E+07	5.34E+12
20 mg/ml ETT	3	3.08E+07	1.03E+07	4.13E+11
40 mg/ml ETT	3	2.70E+07	9.00E+06	1.00E+12
80 mg/ml ETT	3	2.83E+07	9.43E+06	8.03E+11
160 mg/ml ETT	3	1.93E+07	6.43E+06	6.33E+10
320 mg/ml ETT	3	1.12E+07	3.73E+06	4.13E+11

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1.63E+14	5	3.26E+13	24.35	6.79E-06	3.11
Dentro de los grupos	1.61E+13	12	1.34E+12			
Total	1.79E+14	17				

Del cuadro se entiende que:

$$F > F_{crítico}$$

Por lo tanto los valores dados son significativos para las pruebas experimentales realizadas. Se rechaza la Hipótesis nula y se acepta la Hipótesis alternativa.

Para la determinación de la actividad antibacteriana del extracto tánico de tara (ETT) sobre las bacterias aerobias mesófilas, expresadas en UFC/mL por triplicado, realizada a lo largo de 30 días de evaluación y análisis continuo (*Mayor Información ver Anexo N°8*), se generó los siguientes resultados mostrados en el siguiente cuadro:

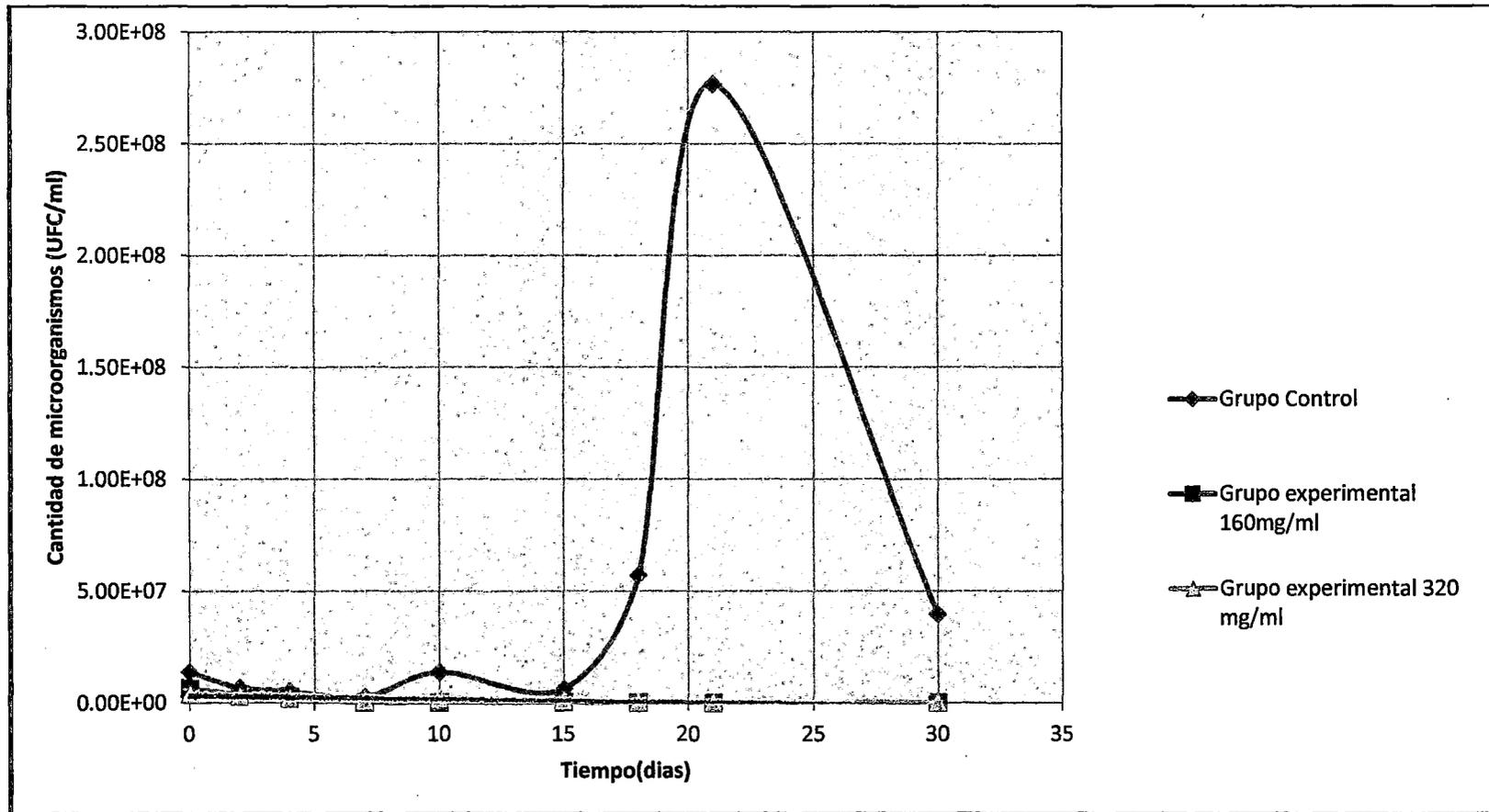
Tabla 4.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana del ETT sobre las Bacterias Aerobias Mesófilas durante 30 días .

TIEMPO(DIAS)	TIEMPO(HORAS)	CONCENTRACIONES DE E.T.T.											
		Control				160 mg/mL				320 mg/mL			
		R1	R2	R3	Promedio	R1	R2	R3	Promedio	R1	R2	R3	Promedio
0	0	1.60E+07	1.19E+07	1.30E+07	1.36E+07	6.40E+06	6.70E+06	6.00E+06	6.37E+06	3.00E+06	4.20E+06	3.98E+06	3.73E+06
2	48	6.07E+06	6.99E+06	7.00E+06	6.69E+06	4.17E+06	3.83E+06	3.00E+06	3.67E+06	3.03E+06	2.62E+06	2.65E+06	2.77E+06
4	96	5.07E+06	5.58E+06	5.00E+06	5.22E+06	3.44E+06	2.67E+06	2.50E+06	2.87E+06	1.84E+06	1.84E+06	1.90E+06	1.86E+06
7	168	2.32E+06	2.65E+06	2.80E+06	2.59E+06	7.80E+04	6.40E+04	5.00E+04	6.40E+04	8.91E+05	9.54E+05	6.32E+05	8.26E+05
10	240	1.08E+07	1.02E+07	2.00E+07	1.37E+07	8.00E+04	2.16E+05	9.74E+04	1.31E+05	2.29E+06	1.84E+06	1.90E+06	2.01E+06
15	360	5.22E+06	6.49E+06	7.00E+06	6.24E+06	1.97E+05	2.23E+05	1.24E+05	1.81E+05	8.91E+05	1.08E+06	9.00E+05	9.57E+05
18	432	6.40E+07	6.50E+07	4.20E+07	5.70E+07	1.93E+04	1.85E+04	1.50E+04	1.76E+04	5.00E+05	4.57E+04	3.23E+04	1.93E+05
21	504	7.00E+07	5.60E+08	2.00E+08	2.77E+08	1.84E+03	1.90E+03	1.50E+04	6.25E+03	5.25E+04	9.00E+04	8.14E+03	5.02E+04
30	720	7.40E+07	1.00E+07	3.50E+07	3.97E+07	2.00E+03	1.50E+03	1.35E+03	1.62E+03	6.00E+03	3.90E+03	4.90E+04	1.96E+04

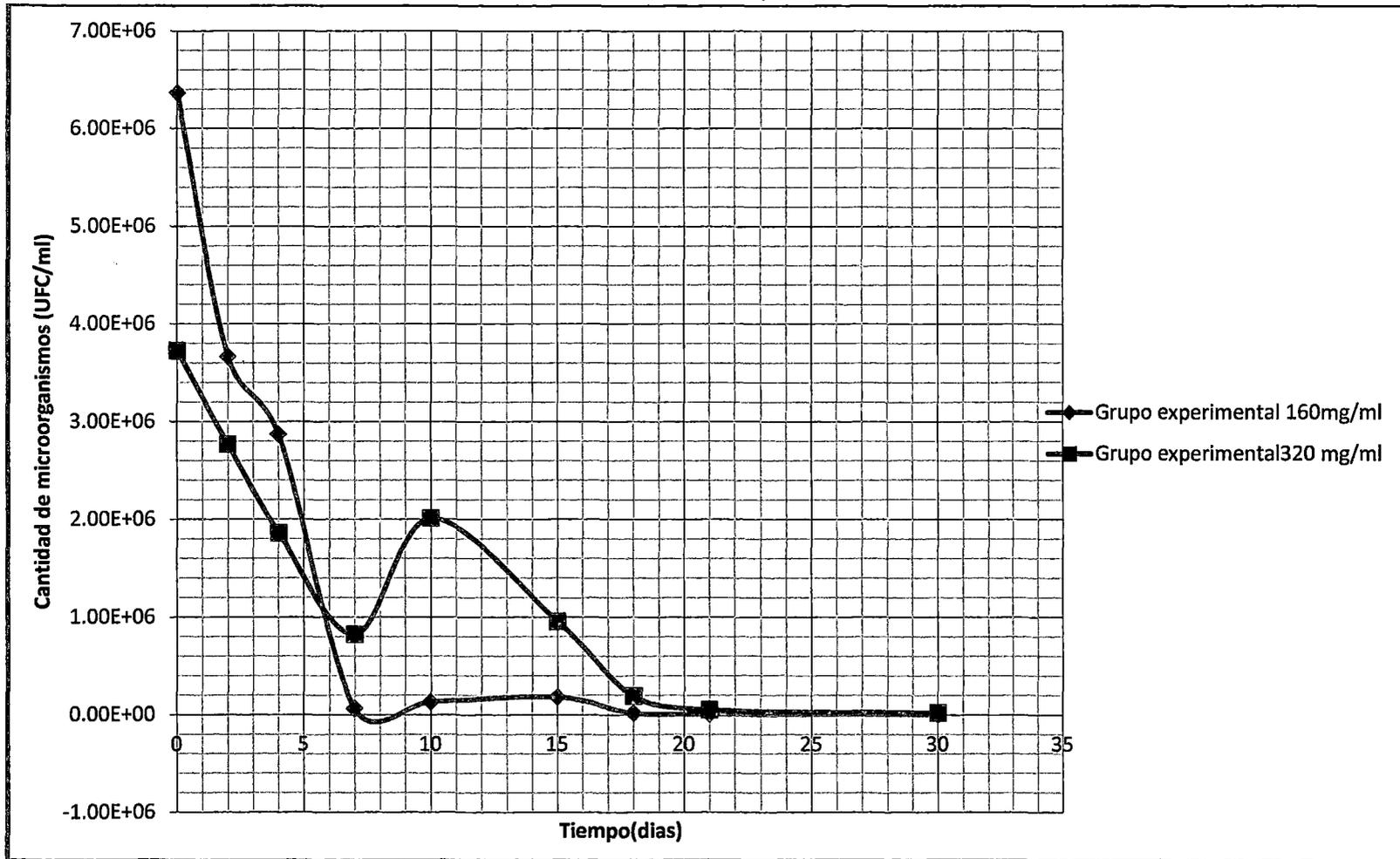
(Fuente : Elaboración Propia).

A partir de dichos datos se podrá realizar las diferentes Curvas de Crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas.

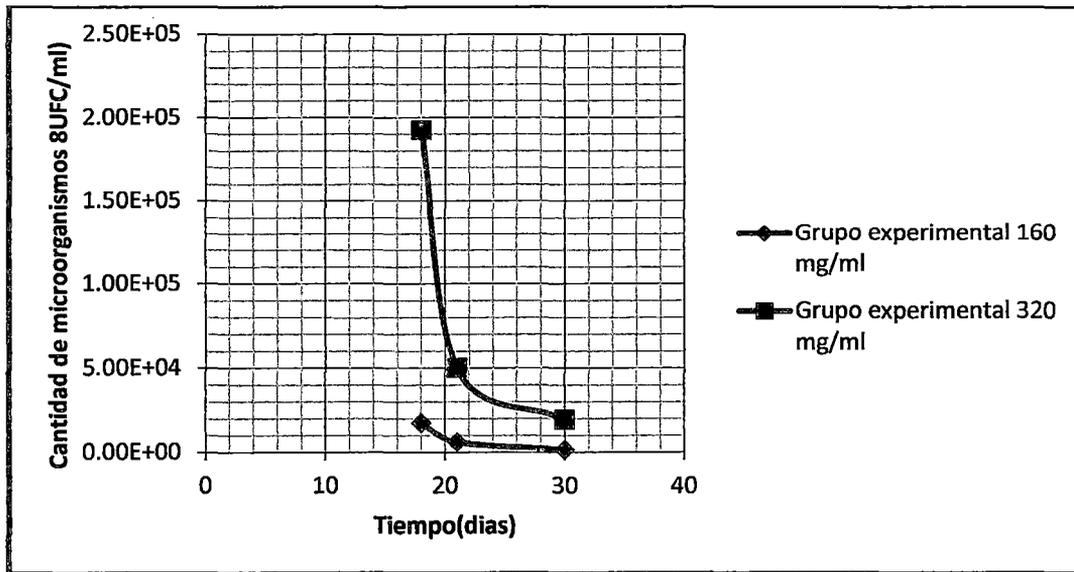
Gráfica 4.1. Comparación de las Curvas de Crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas del Grupo Control con los diferentes Grupos experimentales de Extractos Tánicos de Tara (ETT).



Gráfica 4.2. Comparación de las Curvas de Crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas de los diferentes Grupos experimentales de Extractos Tánicos de Tara (ETT).



Gráfica 4.3. Comparación al detalle de las Curvas de Crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas de los diferentes Grupos experimentales de Extractos Tánicos de Tara (ETT).



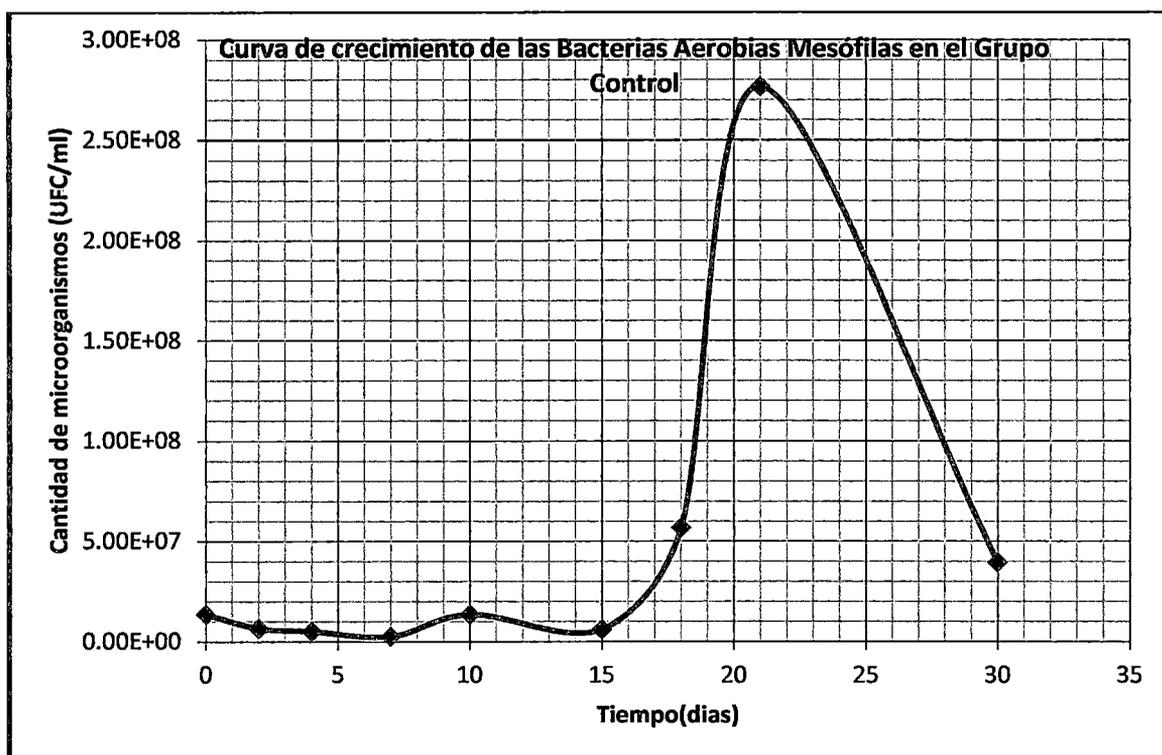
En la Gráfica N°4.1 , se puede apreciar la diferencia que existe entre las curvas de crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas de los grupos experimentales de extractos tánicos de tara a las concentraciones de 160 mg/ mL y 320 mg/ mL con la curva de crecimiento del Grupo Control que no contenía nada de ETT.

A diferencia de ésta, la Gráfica N°4.2, se aprecia la comparación de los grupos experimentales de ETT, donde, aunque el ETT de 320 mg/ mL presentaba una menor cantidad de microorganismos en el tiempo cero que el ETT de 160 mg/mL, a la semana el ETT de 160mg/ mL presentó una reducción máxima de 6.40×10^4 UFC / mL mientras que para el ETT de 320 mg/ mL presentó 8.26×10^5 UFC/ mL, es en este punto donde se empiezan a igualar en la cantidad de microorganismos presentes en el coloide emulsionado de carne de res. En los siguientes días se llegan a aproximar mucho ambas curvas de crecimiento de bacterias aerobias mesófilas, es por eso que en la Gráfica N°4.3 se analiza dichos puntos próximos entre las curvas , pudiendo apreciarse que el ETT de 160

mg/mL va a llegar a reducirse a una cantidad de 1.62×10^3 UFC / mL, no habiendo mucha diferencia con puntos posteriores a éste (Día 30), habiendo inhibido a dichas bacterias presentes en el coloide emulsionado de carne de res, a diferencia del ETT de 320 mg/ mL que solo llegará a la cantidad de 1.96×10^4 UFC / mL.

Las Curvas de Crecimiento para cada grupo tratado en la Tesis, se presentan a continuación:

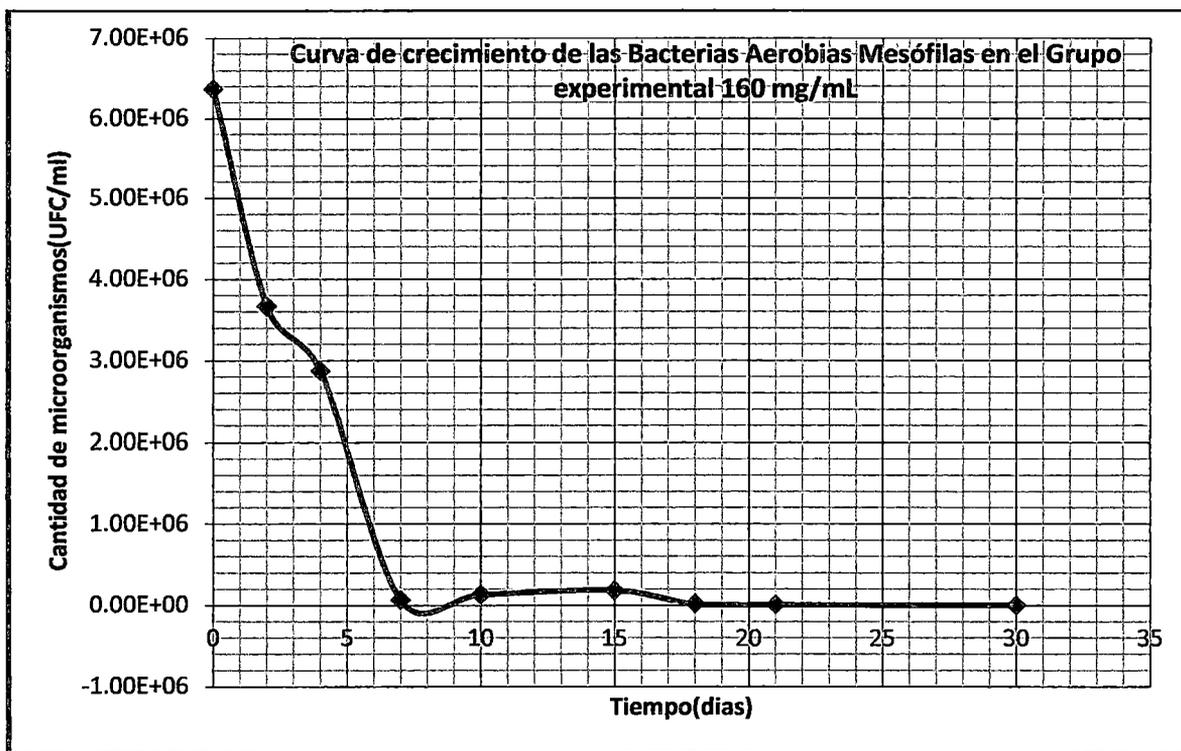
Gráfica 4.4 Curva de Crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas del Grupo Control en el coloide emulsionado de carne de res.



En esta curva de crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas en el Grupo Control con 0 mg/ mL de ETT, en el día 21 se alcanzó la tasa máxima de crecimiento de 2.77×10^8 UFC/ mL y una reducción máxima en la tasa de

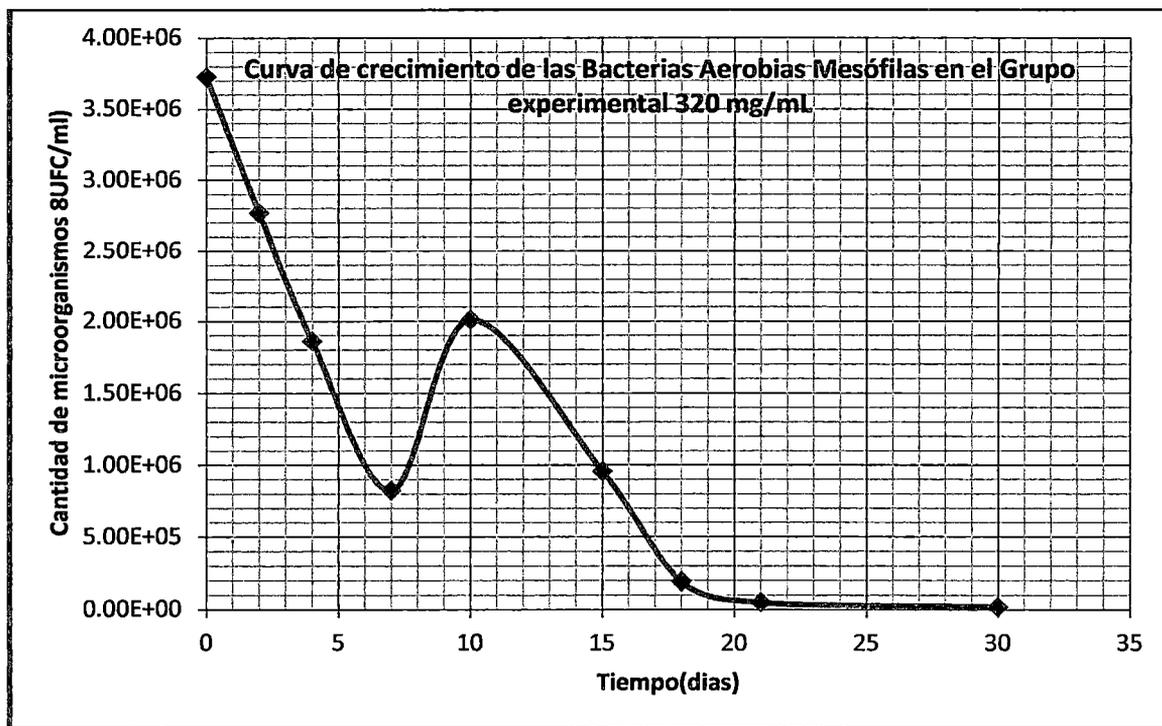
crecimiento de 3.97×10^7 UFC/ mL en el día 30, no habiendo una diferencia notoria en los siguientes días.

Gráfica 4.5. Curva de Crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas en el Grupo Experimental (160 mg/ mL ETT).



En esta curva de crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas en el Grupo Experimental de 160 mg/mL de ETT, se aprecia a la semana una disminución en la tasa de crecimiento de 6.40×10^4 UFC/ mL , además presentó una reducción máxima en la tasa de crecimiento de 1.62×10^3 UFC/ mL en el día 30, no habiendo una diferencia notoria en los siguientes días.

Gráfica 4.6. Curva de Crecimiento de las Bacterias Aerobias Mesófilas en el Grupo Experimental (320 mg/mL ETT).



En esta curva de crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas en el grupo experimental de 320 mg/ mL de ETT, se aprecia a la semana una disminución en la tasa de crecimiento de 8.26×10^5 UFC/ mL , además presentó una reducción máxima en la tasa de crecimiento de 1.96×10^4 UFC/ mL en el día 30, no habiendo una diferencia notoria en los siguientes días.

Además, todos los datos generados de las pruebas de determinación de la actividad antibacteriana del ETT para la inhibición de las bacterias aerobias mesófilas fueron tratados con la prueba ANOVA, generándose los siguientes resultados:

Tabla 4.4. Prueba ANOVA para la Determinación de la Actividad Antibacteriana del ETT para la inhibición de las bacterias aerobias mesófilas durante 30 días.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
CONTROL	9	4.21E+08	4.68E+07	7.77E+15
160 mg/ml	9	1.33E+07	1.48E+06	5.33E+12
320 mg/ml	9	1.24E+07	1.38E+06	1.70E+12

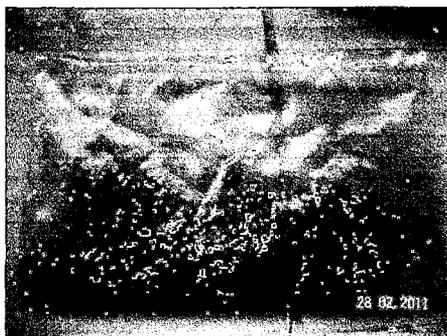
ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico par F</i>
Entre grupos	1.24E+16	2	6.18E+15	2.39	0.11	3.4
Dentro de los grupos	6.22E+16	24	2.59E+15			
Total	7.45E+16	26				

Del cuadro se entiende que:

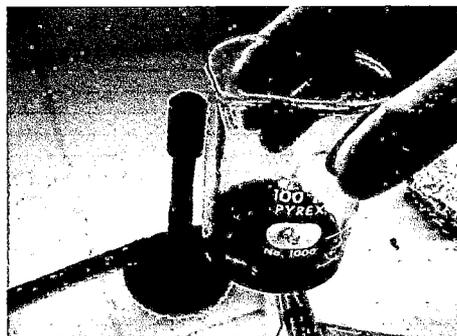
Por lo tanto los valores dados no son significativos para las pruebas experimentales realizadas. Se acepta la Hipótesis nula .

Fig 4.35 . Muestra de Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) .



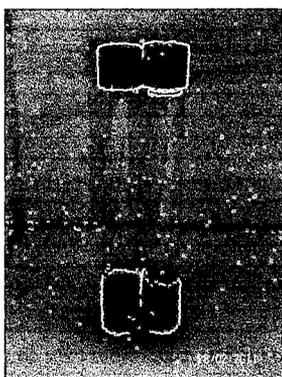
(Fuente : Elaboración Propia).

Fig 4.36 . Obtención de la Solución Activada de Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) .



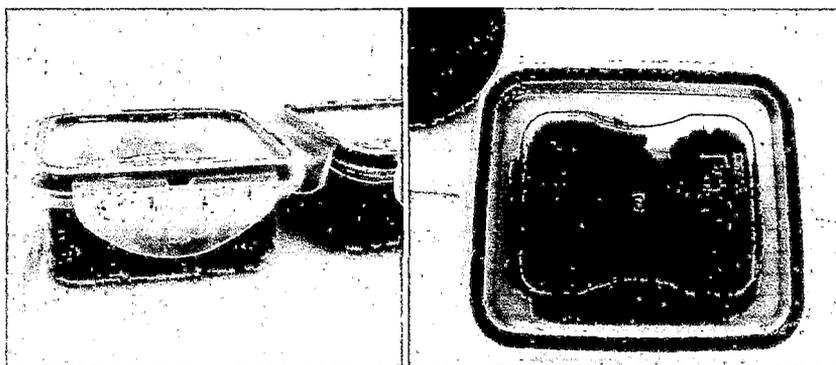
(Fuente : Elaboración Propia).

**Fig 4.37 . Extractos Tánicos de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara)
(320 mg/mL y 160 mg/mL).**



(Fuente : Elaboración Propia).

Fig 4.38-4.40 . Las muestras de Coloide emulsionado de carne de res (Tres tratamientos) con un tiempo de experiencia de 30 días.



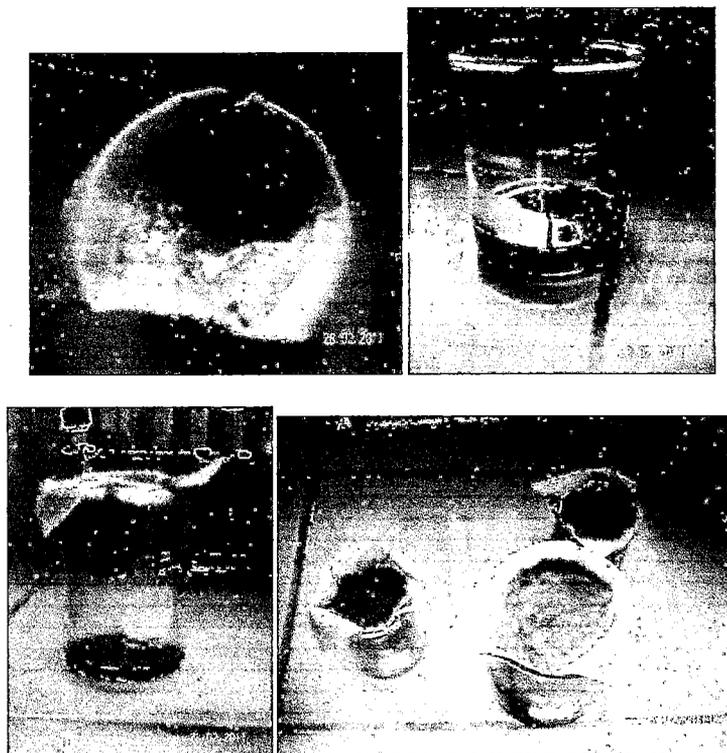
(Fuente : Elaboración Propia).

Fig 4.41-4.42. Cuarteo para la toma de muestra del coloide emulsionado de carne de res aplicado el tratamiento.



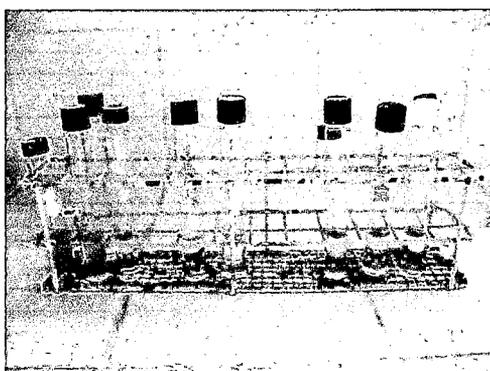
(Fuente : Elaboración Propia).

Fig 4.43-4.46. Filtrado de la muestra del Coloide emulsionado de carne luego de la homogenización.



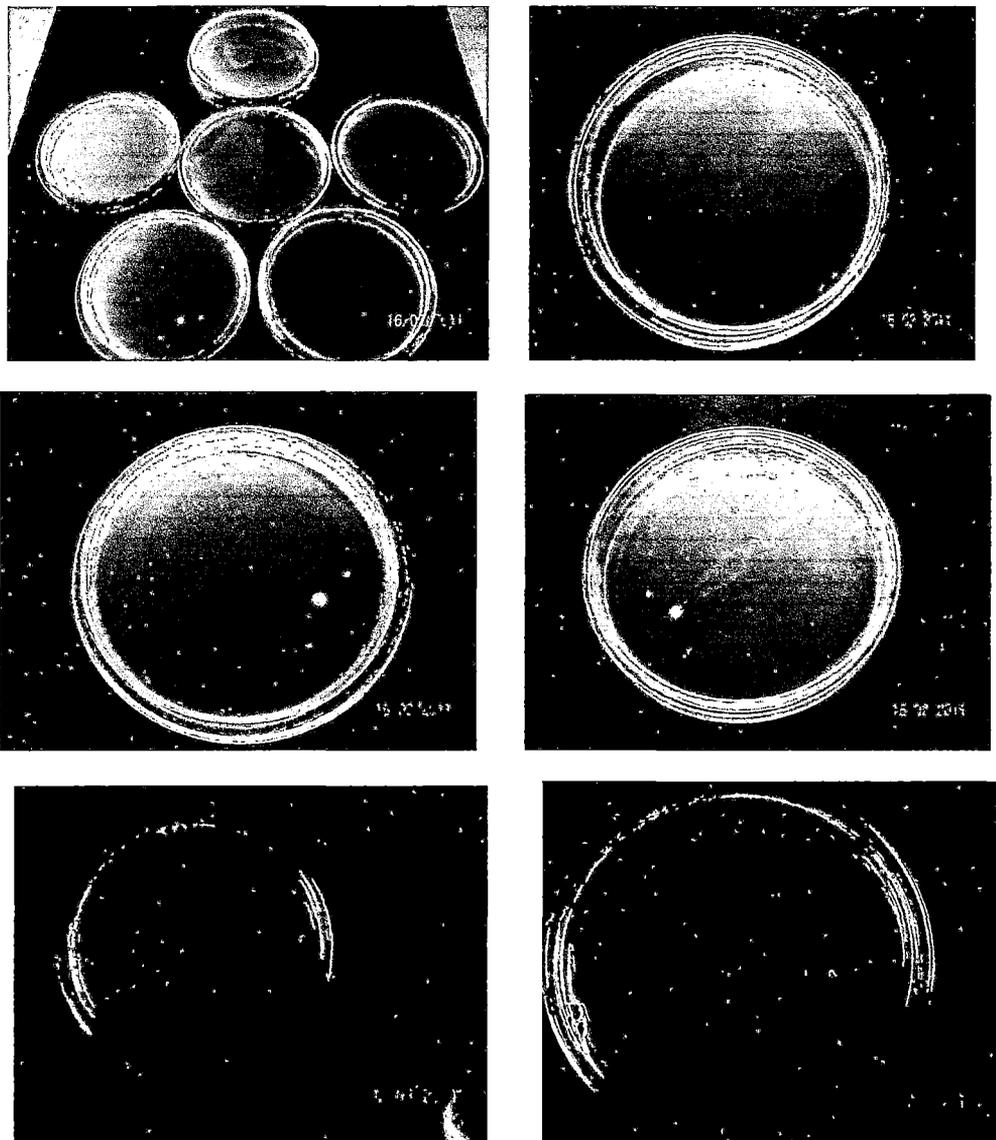
(Fuente : Elaboración Propia).

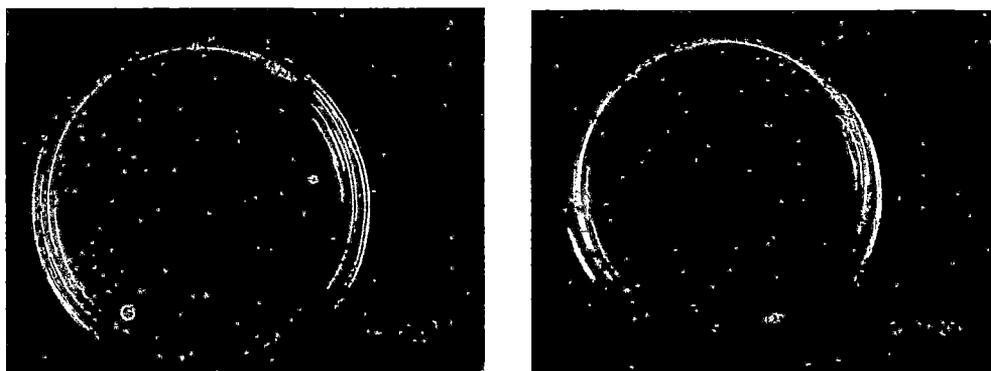
Fig 4.47. Preparación de las diluciones respectivas para los tres tratamientos.



(Fuente : Elaboración Propia).

**Fig 4.48-4.55. Inhibición Antibacteriana del ETT comprobada sobre las Bacterias
Aerobias Mesófilas**





(Fuente : Elaboración Propia).

La determinación de las diferentes concentraciones mínimas inhibitorias para la bacteria patógena *Escherichia Coli* expresadas en UFC/mL por triplicado, también fueron halladas empleando el Extracto Tánico de Tara óptimo (Mayor Información ver Anexo N° 9).

Cuadro 4.5. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del ETT para la inhibición de la bacteria patógena *Escherichia Coli*.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO TÁNICO DE TARA (ETT) PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE <i>E. Coli</i>						
Repeticiones	Unidades Formadoras de Colonias (NMP/100 mL)					
	0 mg/mL ETT	20 mg/mL ETT	40 mg/mL ETT	80 mg/mL ETT	160 mg/mL ETT	320 mg/mL ETT
1	1100	1100	1100	460	150	120
2	1100	460	240	210	93	75
3	1100	460	460	240	75	64
Promedio	1100	673	600	303	106	86
Desv. Estándar	0.00	369.50	446.77	136.50	39.15	29.67

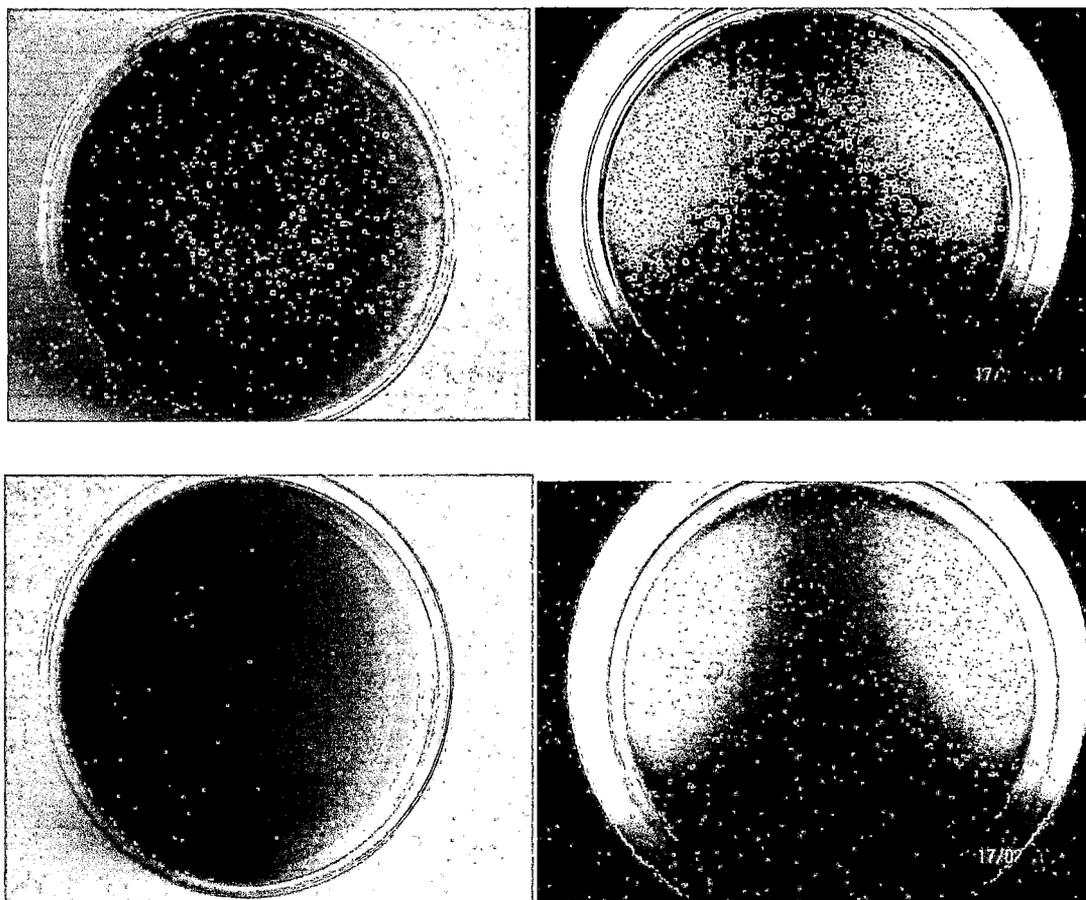
(Fuente : Elaboración Propia).

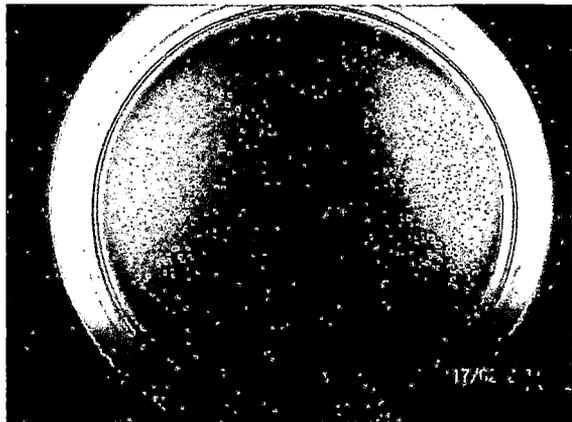
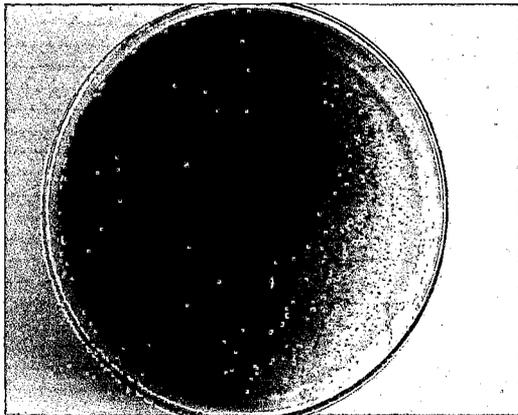
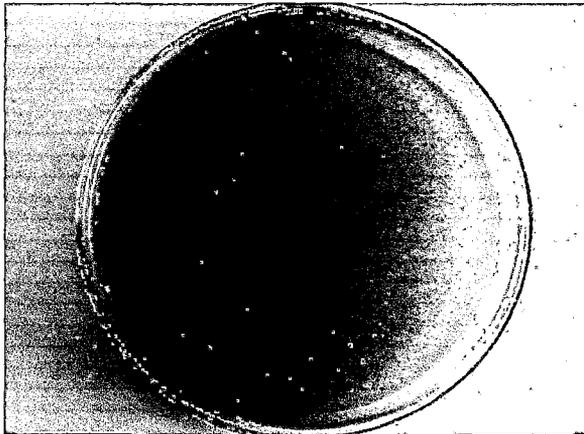
En el cuadro anterior, se observa que disminuye el número más probable de bacterias de *Escherichia Coli* en 100 mL , conforme aumenta la concentración del ETT; cabe indicar que para los valores del grupo control se tuvo que aproximar a 1100 NMP/100 mL debido a que según la Tabla NMP (Determinación del Número Más Probable), da como resultado un valor > 1100

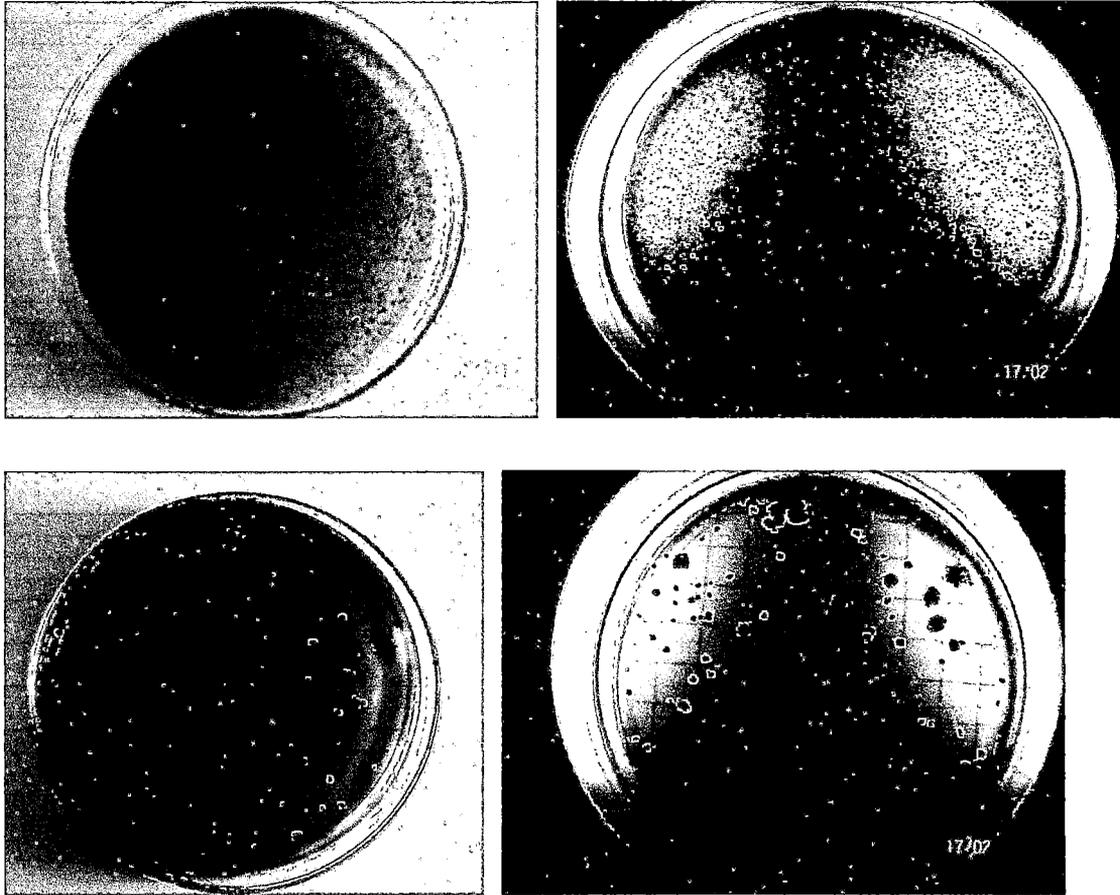
NMP/100 mL, y éste no puede prestarse para la realización de diferentes cálculos numéricos posteriores.

Las concentraciones de 160 mg/ mL y 320 mg/ mL de ETT, son aquellas que llaman nuestra atención por presentar una reducción muy pronunciada con respecto al control (0 mg/ mL ETT), resultando de manera similar a las pruebas trabajadas con las bacterias aerobias mesófilas, es por dicha razón que las posteriores pruebas solo se trabajará con tres tratamientos: el control (0 mg/ mL ETT) y las concentraciones de de 160 y 320 mg/ mL de ETT.

Fig 4.56-4.67. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias para la Inhibición de Bacterias patógenas de *Escherichia Coli* a partir de las diferentes concentraciones de ETT.

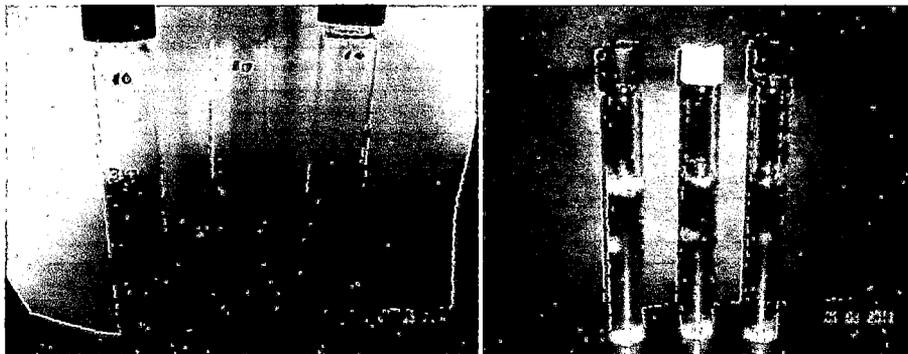


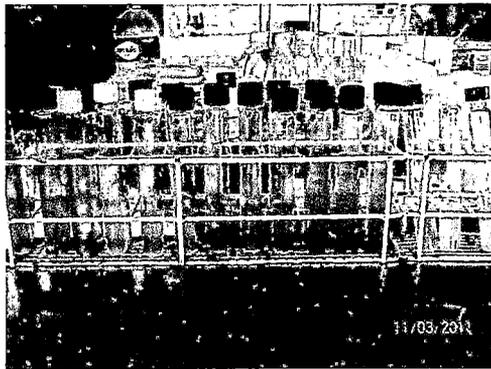
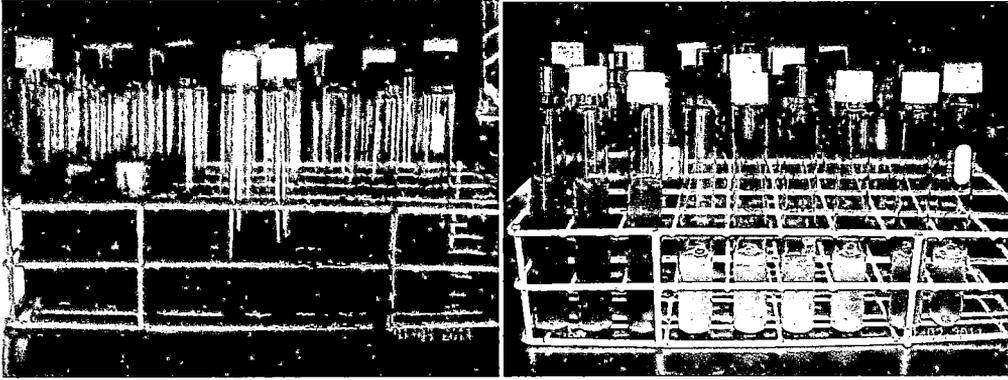




(Fuente : *Elaboración Propia*).

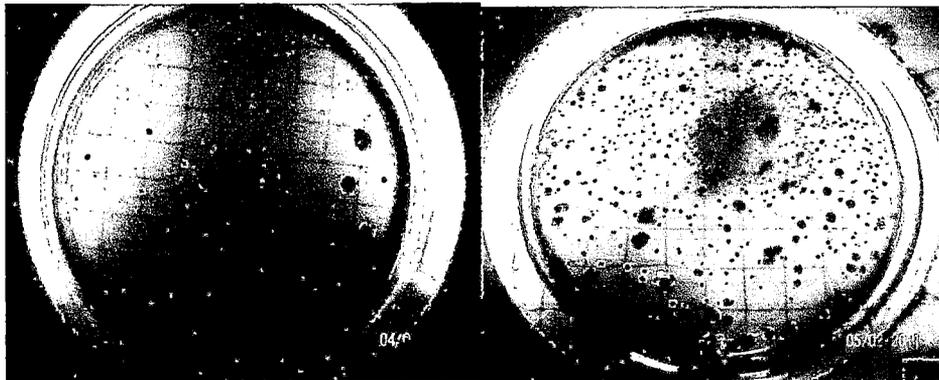
Fig 4.68-4.72. Determinación de los Coliformes Totales y Fecales a partir de las diferentes concentraciones de ETT.

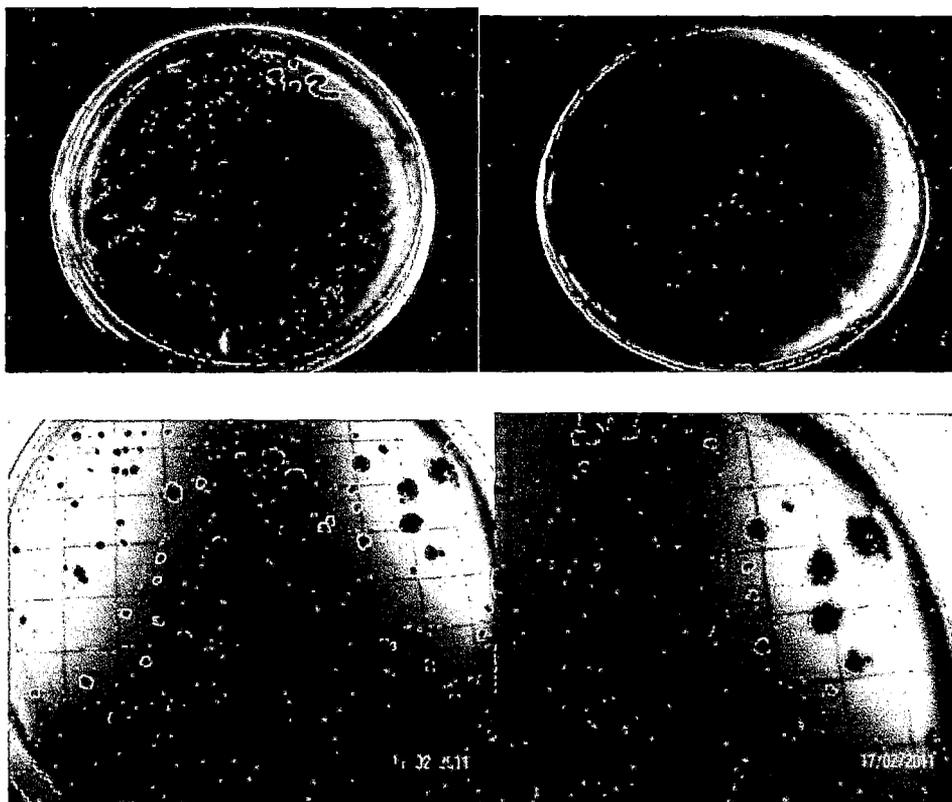




(Fuente : *Elaboración Propia*).

Fig 4.73-4.78. Método de Cuenta en Placa de las bacterias de *Escherichia Coli*.





(Fuente : *Elaboración Propia*).

Luego se realizó el análisis estadístico ANOVA para los datos dados, encontrándose lo siguiente:

Hipótesis alternativa: *El extracto tánico de Tara (ETT) tiene un efecto inhibitorio sobre las bacterias patógenas de Escherichia Coli.*

Hipótesis nula: *El extracto tánico de Tara (ETT) no tiene ningún efecto inhibitorio sobre las bacterias patógenas de Escherichia Coli.*

Tabla 4.5 Prueba ANOVA para la Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del ETT para la inhibición de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli*.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0 mg/ml ETT	3	3300	1100	0
20 mg/ml ETT	3	2020	673.33	136533.33
40 mg/ml ETT	3	1800	600.00	199600.00
80 mg/ml ETT	3	910	303.33	18633.33
160 mg/ml ETT	3	318	106.00	1533.00
320 mg/ml ETT	3	259	86.33	880.33

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2286654.5	5	457330.9	7.682360155	0.001895321	3.105875239
Dentro de los grupos	714360	12	59530			
Total	3001014.5	17				

Del cuadro se entiende que:

$$F > F_{\text{critico}}$$

Por lo tanto los valores dados son significativos para las pruebas experimentales realizadas. Se rechaza la Hipótesis nula y se acepta la Hipótesis alternativa.

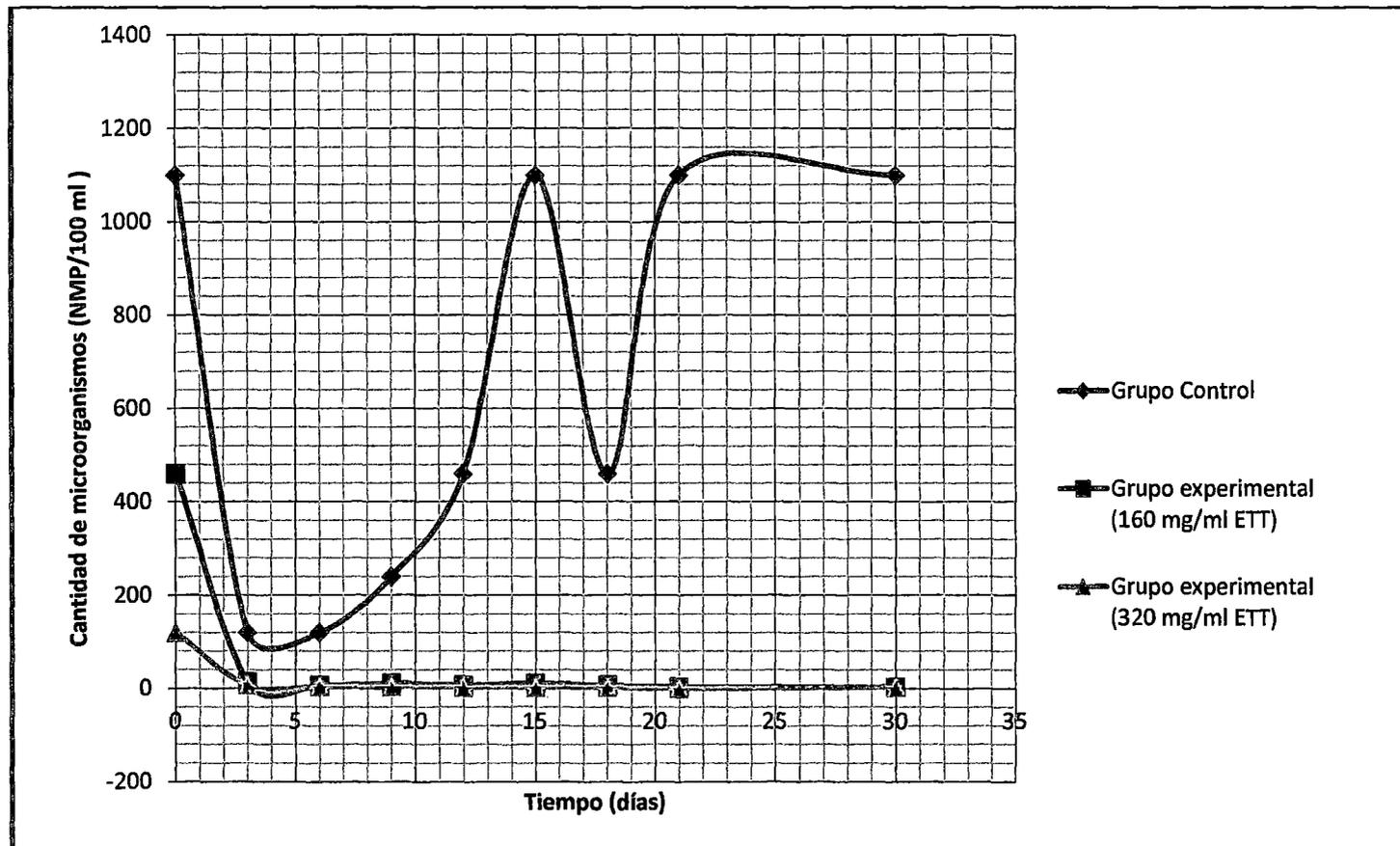
Para la determinación de la actividad antibacteriana del Extracto Tánico de Tara (ETT) sobre las bacterias patógenas de *Escherichia Coli*, expresadas en NMP /100 mL por triplicado, realizada a lo largo de 30 días de evaluación y análisis continuo (*Mayor Información ver Anexo N°9*), donde se generó los siguientes resultados mostrados en el siguiente cuadro:

Tabla 4.6. Determinación de la Actividad Antibacteriana del ETT sobre las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* durante 30 días .

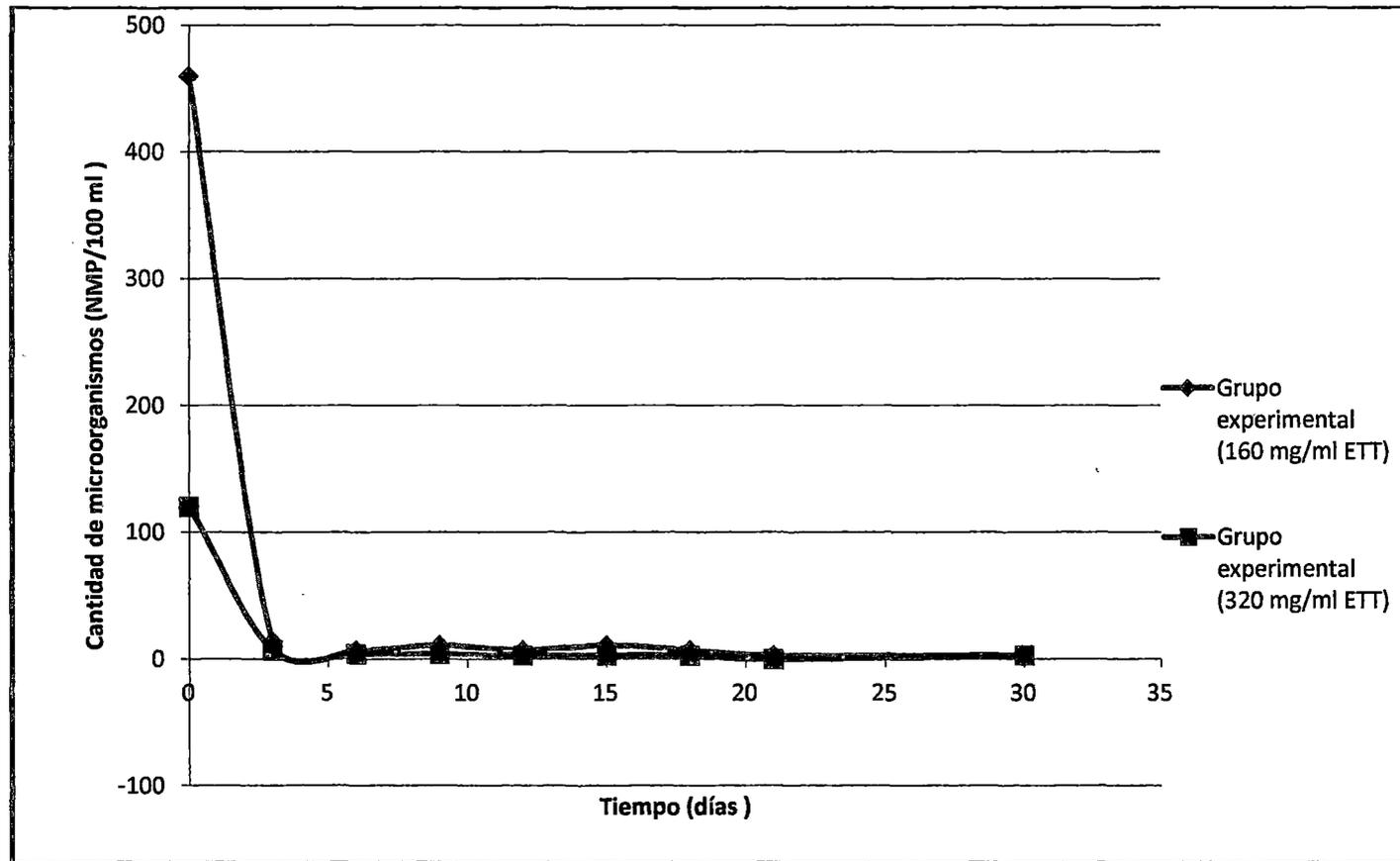
EFEECTO DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS DEL EXTRACTO TÁNICO DE TARA (ETT) PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE <i>Escherichia Coli</i>			
Días	Unidades Formadoras de Colonias (NMP/100 mL)		
	0 mg/mL ETT	160 mg/mL ETT	320 mg/mL ETT
0	1100	460	120
3	120	14	7
6	120	7	4
9	240	11	4
12	460	7	3
15	1100	11	3
18	460	7	3
21	1100	3	0
30	1100	3	3
Promedio	644.44	58.11	16.33

A partir de dichos datos se podrá realizar las diferentes Curvas de Crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli*.

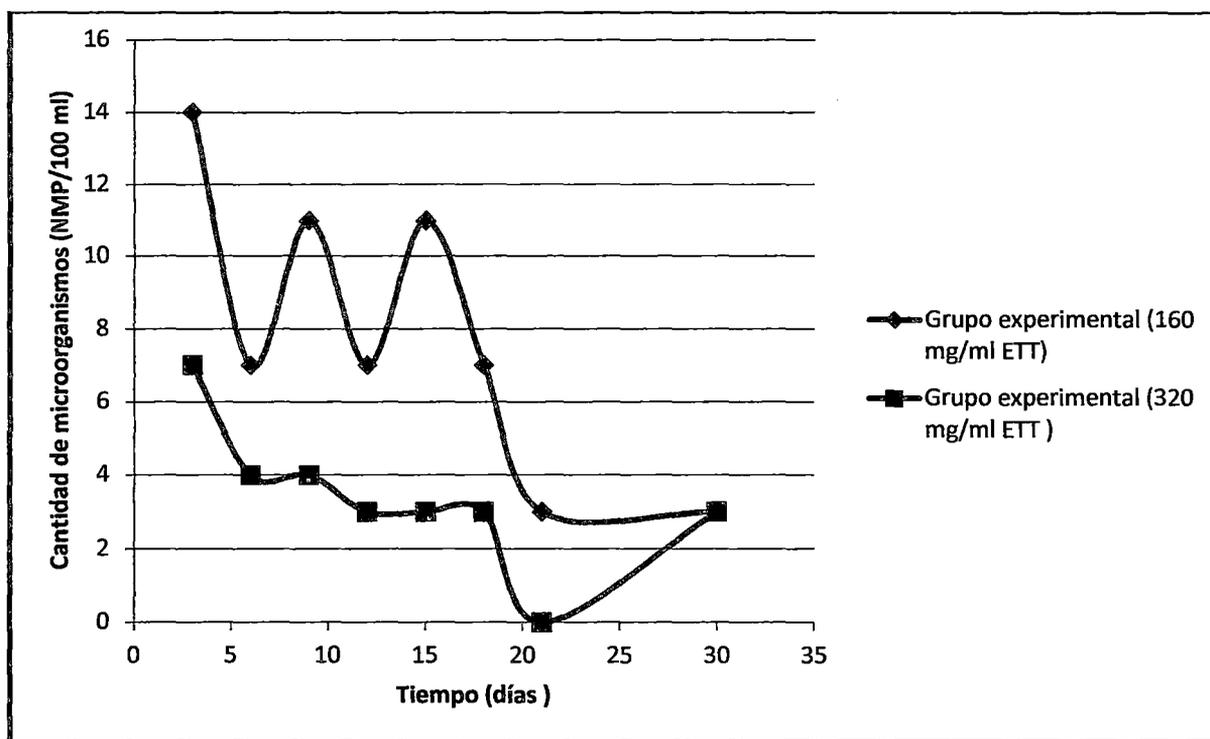
Gráfica 4.7. Comparación de las Curvas de Crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* del Grupo Control con los diferentes Grupos experimentales de Extractos Tánicos de Tara (ETT).



Gráfica 4.8. Comparación de las Curvas de Crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* para los diferentes Grupos experimentales de Extractos Tánicos de Tara (ETT).

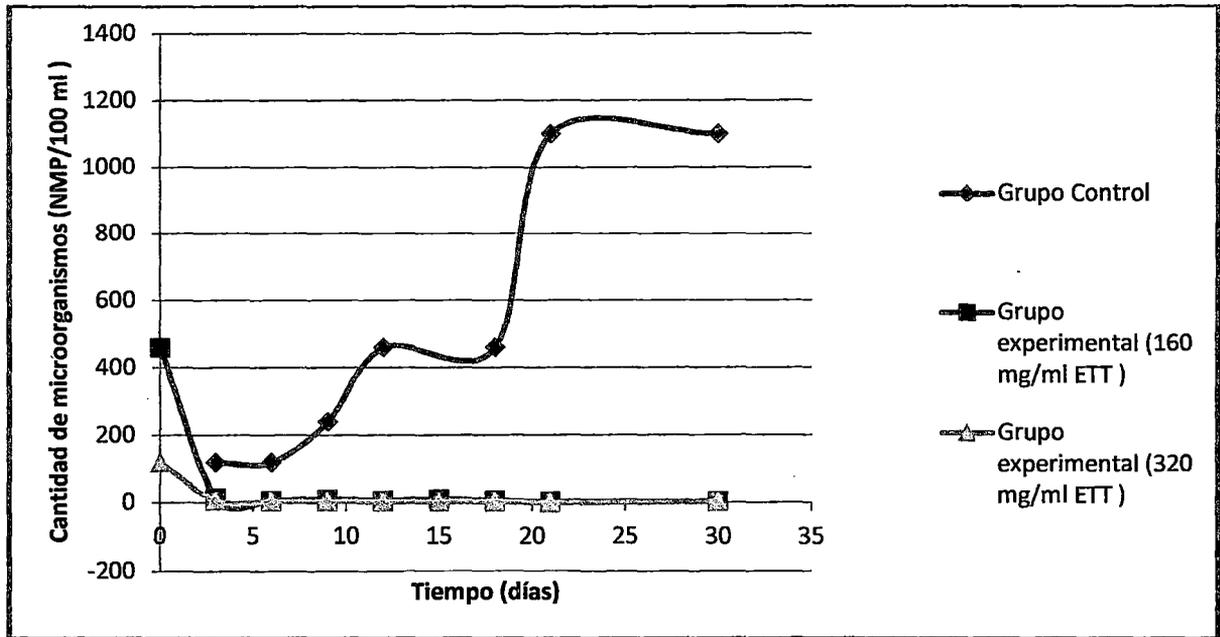


Gráfica 4.9. Comparación al detalle de las Curvas de Crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* de los diferentes Grupos experimentales de Extractos Tánicos de Tara (ETT).



En la Gráfica N°4.7 , se puede apreciar la diferencia que existe entre las curvas de crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* de los grupos experimentales de extractos tánicos de tara a las concentraciones de 160 mg/ mL y 320 mg/ mL con la curva de crecimiento del grupo control que no contenía nada de ETT. Observamos que la curva de crecimiento de bacterias patógenas de *Escherichia Coli* para el grupo control tiene una forma anormal, es decir, se presentaron datos anómalos, de los cuales si anulamos estos puntos (día 0 y día 15) se tendrá la gráfica siguiente:

Gráfica 4.10. Comparación de las Curvas de Crecimiento modificado de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* del Grupo Control con los diferentes Grupos experimentales de ETT.



La curva de crecimiento de bacterias patógenas de *Escherichia Coli* para el grupo control tendrá ahora un ajuste mejor, evidenciándose como se da el aumento de la tasa de microorganismos presente en el coloide emulsionado de carne de res; mientras que para las otras curvas de crecimiento no se nota mucha diferencia entre ellas excepto en el día cero de la experiencia.

Por eso se realiza la Gráfica N°4.8, donde se aprecia la comparación de los grupos experimentales.

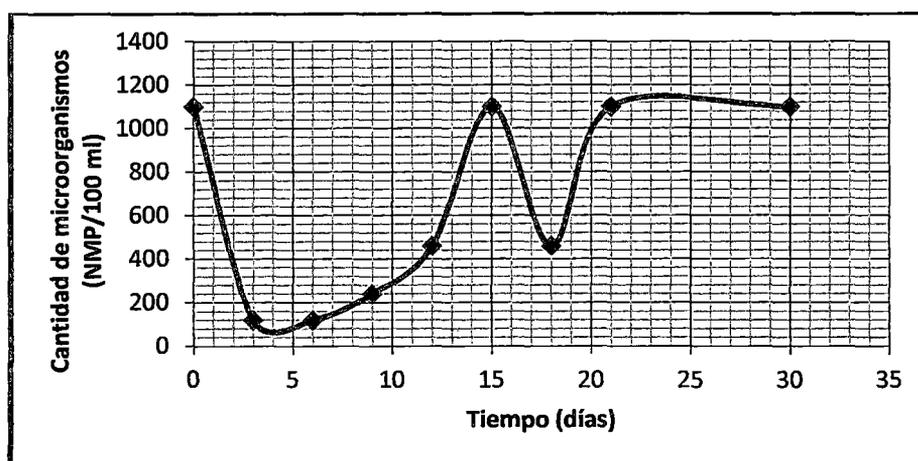
El extracto tánico de 160 mg / mL, aunque presentó en el tiempo cero 460 NMP/100 mL de ETT para el transcurso de tres días presentó solo 14 NMP/100 mL de ETT consiguiéndose una reducción de la tasa de crecimiento de la bacteria patógena de *Escherichia Coli* muy considerable, y consiguió su reducción máxima para el día 21 con la presencia de 3 NMP/100 mL de ETT, lográndose

una inhibición de la bacteria patógena, para los días posteriores. Sin embargo, el extracto tánico de 320 mg / mL, aunque presentó en el tiempo cero 120 NMP/100 mL de ETT para el transcurso de tres días presentó solo 7 NMP/100 mL de ETT consiguiéndose una reducción de la tasa de crecimiento de la bacteria patógena de *Escherichia Coli* mucho más considerable que para el extracto tánico de 160 mg/ml, y consiguiendo su reducción máxima para el día 12 con la presencia de 3 NMP/100 mL de ETT, y para el día 21 no se encontró ningún NMP de *Escherichia Coli* / mL presente en el ETT, lográndose la inhibición de la bacteria patógena, para los días posteriores, teniéndose un dato anómalo en el día 30.

En la Gráfica N°4.9 se analiza más al detalle ambas curvas de crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* presentes en el coloide emulsionado de carne de res, donde no se llegan a aproximar en todos los días de experiencia con excepción del día 30 donde se coincide que se llega a tener presente 3 NMP de *Escherichia Coli* /100 mL de ETT.

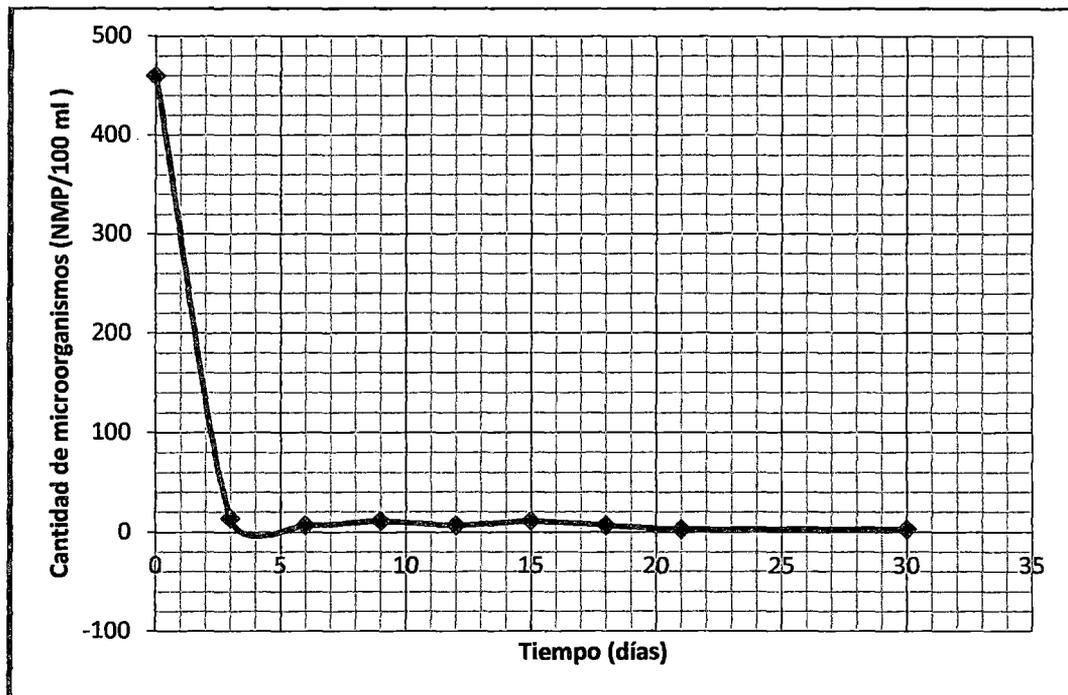
Las curvas de crecimiento para cada grupo tratado en la tesis, se presentan a continuación:

Gráfica 4.11 . Curva de Crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* del Grupo Control en el coloide emulsionado de carne de res.



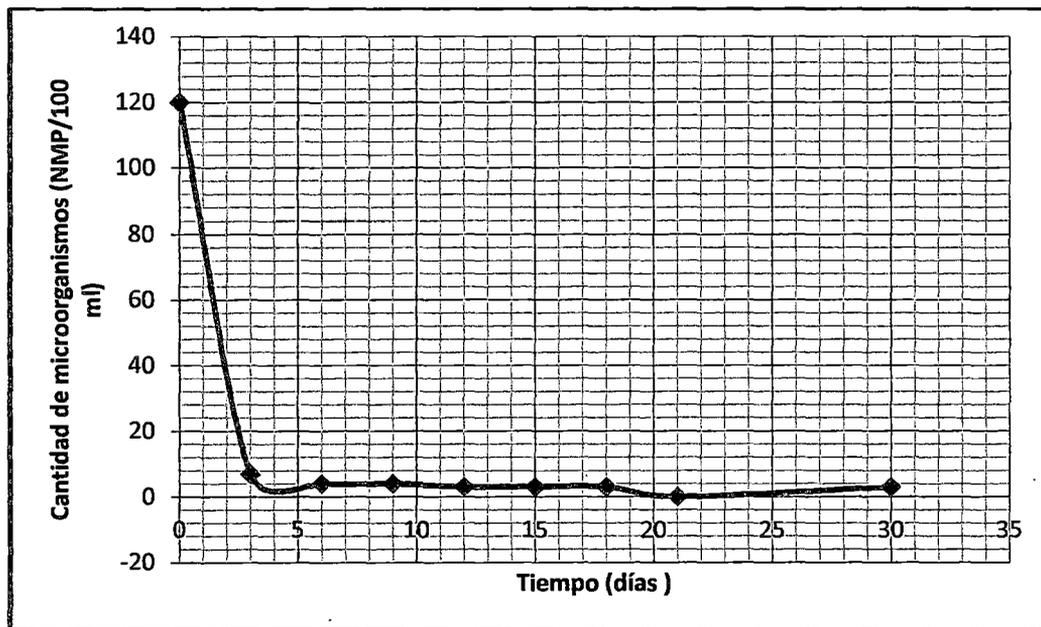
En la curva de crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* en el grupo control con 0 mg/mL de ETT, en el día 15 se alcanzó la tasa máxima de crecimiento de 1100 NMP/100 mL ETT, debido a que se decidió anular el punto determinado en el día cero, por ser anómalo en la experiencia debido a errores en la determinación de *Escherichia Coli*, además presentó una reducción máxima en la tasa de crecimiento de 120 NMP/100 mL ETT en el día 3, no habiendo alguna otra reducción en los días posteriores importante, para el día 30 se llegó a una tasa de crecimiento con valores mayores que 1100 NMP /100 mL ETT, es decir, al interior del coloide emulsionado de carne de res se iba proliferando la cantidad de bacterias patógenas de *Escherichia Coli*, además de recalcar que esta muestra fue la primera en descomponerse, en sufrir el proceso de putrefacción, y debido a los fuertes olores que expedía no se decidió continuar con los días posteriores a la investigación en 30 días.

Gráfica 4.12. Curva de Crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* en el Grupo Experimental (160 mg/mL ETT).



En esta curva de crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* en el grupo experimental de 160 mg/ mL de ETT, se aprecia que aunque inicia en el día cero con una cantidad de 460 NMP/100 mL ETT, para el día 3 presentó solo 14 NMP/100 mL ETT, además presentó una reducción máxima en la tasa de crecimiento de 3 NMP/100 mL ETT para el día 21, no habiendo una diferencia notoria en los siguientes días.

Gráfica 4.13. Curva de Crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* en el Grupo Experimental (320 mg/mL ETT).



En esta curva de crecimiento de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* en el grupo experimental de 320 mg/ mL de ETT, se aprecia que aunque inicia en el día cero con una cantidad de 120 NMP/100 mL ETT, para el día 3 presentó solo 7 NMP/100 mL ETT, teniendo una reducción sumamente importante, donde se demuestra el poder de inhibición de la *Caesalpinia Spinosa*, además presentó una reducción máxima en la tasa de crecimiento de 0 NMP/100 mL ETT para el día 21, no habiendo una diferencia notoria en los siguientes días, exceptuando el día

30, que se consideró un valor anómalo debido a errores en la determinación de *Escherichia Coli*.

Además, todos los datos generados de las pruebas de determinación de la actividad antibacteriana del ETT para la inhibición de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* fueron tratados con la prueba ANOVA, generándose los siguientes resultados:

Tabla 4.7. Prueba ANOVA para la Determinación de la Actividad Antibacteriana del ETT para la inhibición de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* durante 30 días.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0 mg/ml ETT	9	5800	644.44	201477.78
160 mg/ml	9	523	58.11	22726.36
320 mg/ml	9	147	16.33	1514.50

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2.22E+06	2	1.11E+06	14.75	6.63E-05	3.40
Dentro de los grupos	1.81E+06	24	7.52E+04			
Total	4.03E+06	26				

Hipótesis alternativa: *El extracto tánico de Tara (ETT) tiene un efecto inhibitorio sobre las bacterias patógenas de Escherichia Coli.*

Hipótesis nula: *El extracto tánico de Tara (ETT) no tiene ningún efecto inhibitorio sobre las bacterias patógenas de Escherichia Coli.*

Del cuadro se entiende que:

$$F > F_{\text{critico}}$$

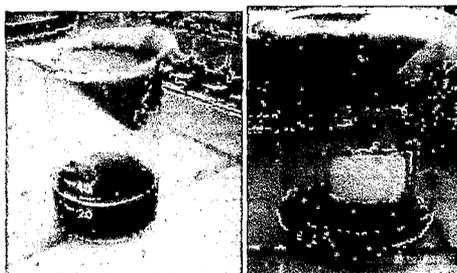
Por lo tanto los valores dados son significativos para las pruebas experimentales realizadas. Se rechaza la Hipótesis nula y se acepta la Hipótesis alternativa.

Fig 4.79 Muestra de Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) .



(Fuente : Elaboración Propia).

Fig 4.80-4.81 . Obtención de la Solución Activada de Taninos Liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara)



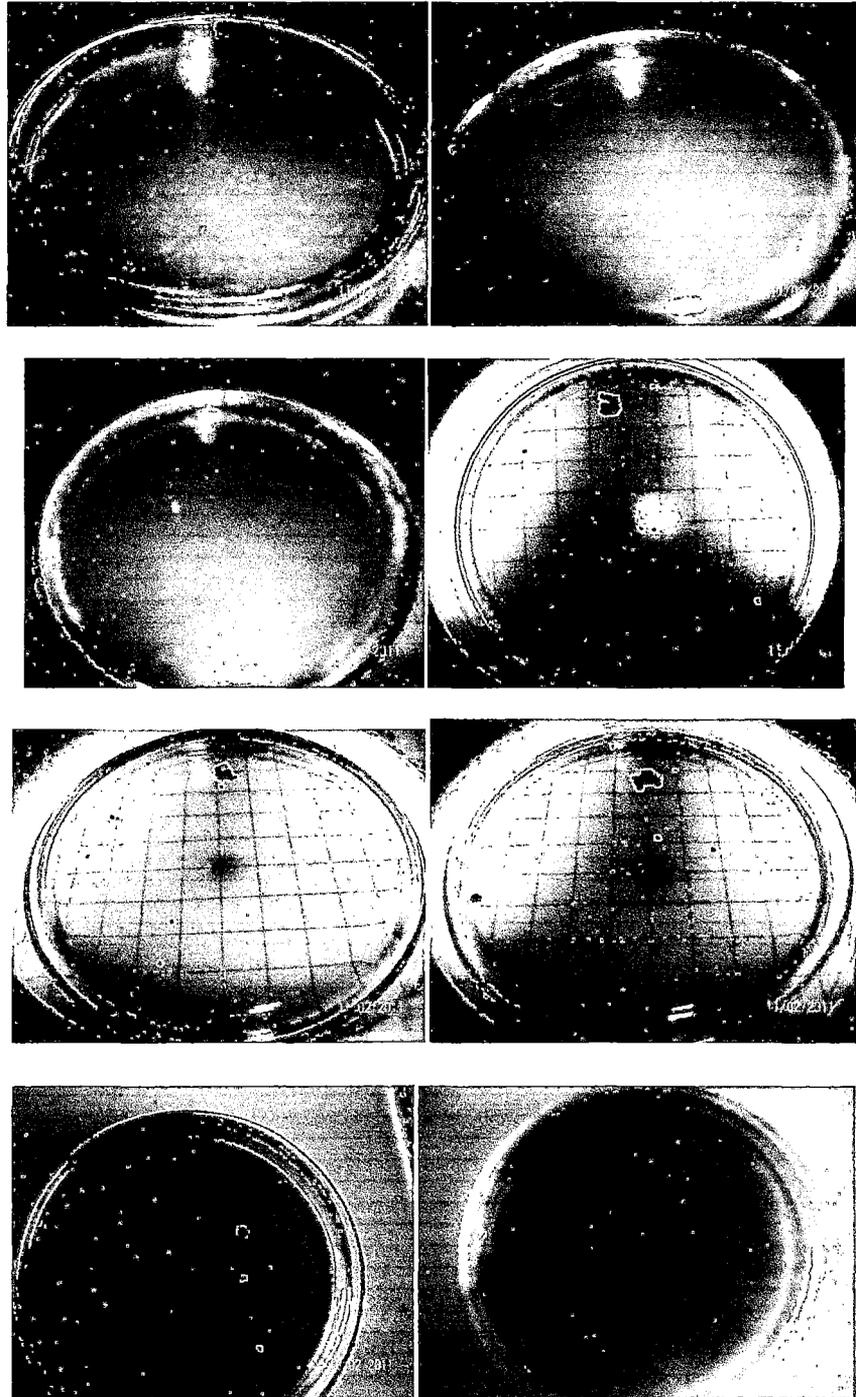
(Fuente : Elaboración Propia).

Fig 4.82 . Muestra del Coloide emulsionado de carne de res con un tiempo de experiencia de 30 días.



(Fuente : Elaboración Propia).

Fig 4.83-4.90. Inhibición Antibacteriana del ETT comprobada sobre las Bacterias patógenas de *Escherichia Coli*.



(Fuente : Elaboración Propia).

CAPÍTULO V

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La resistencia de las bacterias a los antibióticos se reconoce ampliamente como una amenaza para el ejercicio médico en todo el mundo (Livermore DM,2004). A pesar de los esfuerzos de muchas entidades de salud pública para tratar de disminuir dicha resistencia, ésta continua emergiendo y proliferando, como lo demuestra la existente a múltiples medicamentos de cepas de bacterias gram negativas (*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Escherichia coli* y especies de *Salmonella*, entre otras) (Sharma R., 2005); es por eso que nos encontramos en la búsqueda de nuevas sustancias que puedan combatir las bacterias pero que sean de fuentes naturales.

Desde tiempos remotos la población del mundo ha recurrido a las plantas con el fin de curarse alguna dolencia. Numerosos compuestos con actividad antimicrobiana han sido aislados de plantas, de ellos los más importantes corresponden a compuestos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, taninos, terpenoides, alcaloides, etc. Tradicionalmente la *Caesalpinia Spinosa* (tara) ha sido usada en el tratamiento de diversas afecciones respiratorias. (Liu , H. y col. , 2002).

Varios trabajos de investigación dan fe de la eficacia de numerosas plantas con fines medicinales, que cuentan con un poder antibacteriano de las que desconocemos, son plantas que se encuentran en nuestro entorno algunas son conocidas y otras no.

Es por eso que la presente tesis, pretende demostrar que los taninos contenidos en la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) cuentan con un poder

antibacteriano logrando la inhibición de la bacteria patógena *Escherichia Coli* y las bacterias aerobias mesófilas.

Las vainas de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) fueron traídas desde Ayacucho, debido a que allí se encuentra la Tara con mayor porcentaje de taninos como lo demostró López C. y col en el año 1998.

El hecho de encontrar el solvente adecuado para la mejor extracción de taninos presentes en la vaina de la tara fue un proceso exhausto ya que se tuvo que realizar diferentes combinaciones de solvente con materia prima, probar diversos solventes y en diferentes proporciones con el objetivo de encontrar la concentración óptima de extracción de taninos cuya cuantificación se realizó tanto cualitativamente como cuantitativamente por espectrofotometría por el método del Tungsto molibdico fosfórico, los resultados de dicho proceso son apreciados en el Apéndice C.

Por eso era importante la cuantificación de los taninos presente en el extracto obtenido de la vaina de la tara debido a que ya se cuenta con un antecedente que tales compuestos químicos son responsables de la actividad antibacteriana de la tara como lo demostró López C. y col en el año 1998 y Liu, H. y col . en el año 2002.

El alcohol como es conocido, es un buen bactericida, pero la eficacia que tiene es variable, frente a hongos y virus y nula frente a esporas, dependiendo de la concentración a la que se trabaja. La concentración del alcohol a 70° es mucho más eficaz como antiséptico que la de 96°, que es la que frecuentemente se encuentra en las farmacias. Los libros de microbiología no pueden responder aún sobre este caso, yendo en contra de lo que se conoce de que mientras más concentrado es mucho mejor; una hipótesis concluye que el alcohol más concentrado (96°) deshidrata las membranas externas de los microorganismos y forma una capa gruesa que impide el ingreso del alcohol, mientras que el alcohol

más diluido (70°) no tiene la capacidad de deshidratar las capas externas, permitiendo el ingreso del alcohol al interior de las bacterias resultando efectivo para destruirlas. (Silva, L., 2006).

Una disrupción de la membrana celular bacteriana se puede conseguir mediante dos posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de ellas produciría la muerte de la célula bacteriana (Maguna, 2006).

Se entiende por esto, el mecanismo de acción que ejerce el alcohol en la célula bacteriana; el alcohol más diluido 70° logra que la pared de la membrana bacteriana se vuelva permeable y esto logra una disrupción en ella, ocasionando problemas en el interior del microorganismo bacteriano llegando a terminar en su muerte, interpretado simplemente como una desinfección.

Además las bacterias gram negativas, como la *Escherichia Coli*, presentan mayor sensibilidad entre otras cosas, debido a su pared celular menos compleja dado que tiene una capa simple (red de mureína delgada) (Maguna, 2006), en la cual podría actuar el alcohol .

Por esta razón se puede apreciar que los halos de inhibición suelen ser más grandes cuando se utiliza el alcohol etílico a 70° en las diferentes pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, en comparación del alcohol etílico a 96°, además presenta un color y una intensidad más fuerte que el resto. En las pruebas se empleó como solvente el alcohol etílico de 96° en diferentes proporciones debido a que se tenía que contar con un control positivo para lograr la comparación de la mejor inhibición de microorganismos.

La utilización de solventes orgánicos (como alcohol y acetona) tiene la ventaja de preservar mejor los extractos e inhibir el crecimiento de bacterias,

hongos y otros, además de desnaturalizar las enzimas que pueden degradar los compuestos biológicamente activos. (Liu, H. y col. 2002).

En el caso de los extractos usando como solvente agua presentaban coloraciones claras (beige- naranja) y la intensificación del color dependía del tiempo de maceración al que se le sometía, mientras que para el caso de los extractos usando como solvente alcohol presentaban una coloración más oscura, colores marrones en diferentes intensidades de manera similar aumentaba según el tiempo de maceración.

La obtención del extracto tánico de tara realizada fue empleando la operación de maceración en frío con un tiempo de maceración y extracción de 24 horas, una concentración en el rotovapor de 20 minutos a 50 °C usando una proporción de solvente alcohol etílico 96° - agua estéril de 1:6 se obtuvo un extracto con un porcentaje de taninos de 18%.

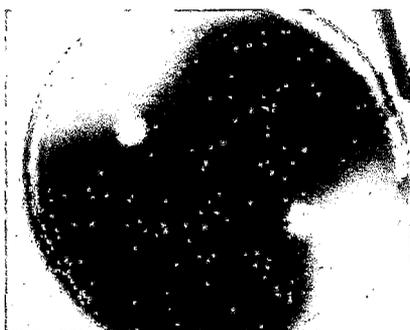
Esto contrasta de manera diferente a la investigación realizada por Gutiérrez, A. (1994), quien realizó la extracción acuosa en caliente, con un tiempo de remojo de 7 horas, un tiempo de extracción de 40 minutos con agitación constante trabajando con una relación de agua / materia prima de 6:1 a una temperatura optima de 65 -70 °C, obteniéndose un extracto con un porcentaje de pureza de taninos de 66%.

La cantidad de taninos obtenida fue superior, ella en su investigación demostró que mediante ese método se obtiene una buena concentración de taninos, pero en este caso era diferente debido a que el solvente empleado era diferente y las condiciones de trabajo para el desarrollo de la tesis también lo fue; sin embargo, cabe resaltar que en las pruebas preliminares se obtuvo el extracto de tara utilizando como solvente la mezcla de alcohol etílico 96° - agua estéril (1:1) por un tiempo de maceración de 24 horas y resultó el ETT con mejor poder de

inhibición frente a los microorganismos con un 21 % de taninos en 100 mL de ETT.

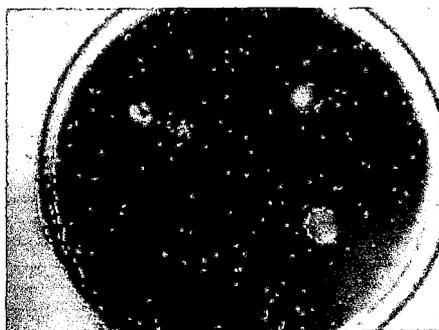
Una complicación en las diversas pruebas experimentales “in vitro” fue el hecho que a veces ciertos factores influían para que se presentaran hechos o datos anómalos. Un hecho anómalo fue la existencia de vainas oxidadas por el tiempo en la recepción de la materia prima las que fueron separadas apropiadamente, la aparición de esta oxidación en las evaluaciones y las contaminaciones existentes en el medio en que se trabajó.

Fig 5. 1 Formación de los halos de inhibición en un ensayo biológico de la Técnica de difusión en Agar nutritivo y aparición de la oxidación de éstas con el paso del tiempo.



(Fuente : Elaboración Propia).

Fig 5.2. Contaminación por levaduras del medio en un ensayo biológico de la Técnica de difusión en Agar.



(Fuente : Elaboración Propia).

Como se puede observar de las fotos anteriores se presentó primero, la oxidación de los taninos apreciada cuando el halo de inhibición variaba su coloración a un marrón oscuro, y segundo, la contaminación con diferentes microorganismos, producido por una mala sanitización del ambiente de trabajo.

En la determinación cualitativa de taninos, en el extracto tánico se observó mediante las diferentes pruebas, una presencia media de taninos tomando como base los ensayos de identificación, evaluación, caracterización y cuantificación a los taninos realizadas a ciertas plantas por Inocente Camones, M. (2009) en su tesis *Actividad Antioxidante y Antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de la Triplaris americana L. (Tangarana colorada)*.

Mediante las diversas experiencias microbiológicas que experimentan las tres concentraciones de ETT (0 mg/ mL, 160 mg/ mL y 320 mg/ mL) , evaluadas para determinar su efecto inhibitorio frente a las bacteria patógena *Escherichia Coli* y a las bacterias aerobias mesófilas durante treinta días, se confirma con los resultados obtenidos por López, C. y col. (1998), Liu, H. y col. (2002) que los taninos extraídos de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) poseen actividad antibacteriana frente a las bacterias aerobias mesófilas y frente a las bacterias patógenas de *Escherichia Coli*.

Para finalizar, debo hacer mención que el investigador Campos Gutierrez, D. (2010), en su reciente investigación *Obtención y Caracterización de Taninos hidrolizados de Tara (Caesalpinia Spinosa) y evaluación de su eficacia antioxidante en carnes y aceites vegetales*, presenta al etanol como uno de los solventes óptimos a utilizar para la extracción de taninos de la tara. En ella, se concluyó que los extractos de tara protegieron la carne de cerdo de la oxidación lipídica comprobándose su propiedad antioxidante, mas no la propiedad antibacteriana que se investigó en la presente tesis, además realiza estudios de calorimetría y cinéticas de reacción de las cuales tampoco se realizaron, aunque

ambos coincidimos en el hecho que la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) tiene muchas propiedades, de las cuales la antioxidante y la antibacteriana son proclives a continuar investigándose en el futuro y darle una mayor importancia a nuestras plantas nativas que a veces desconocemos el enorme potencial que poseen.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

6.1 CONCLUSIONES.

- ❖ El extracto tánico obtenido a partir de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) puede constituir una fuente de principios activos que contribuyan al descubrimiento de antimicrobianos de origen natural los cuales pueden ser utilizados como línea base para la síntesis de moléculas útiles a nivel farmacéutico. El estudio realizado permitió conocer algunos de los potenciales usos antibacterianos de los taninos.
- ❖ La combinación de solventes alcohol etílico 96° con agua estéril en la proporción de (1:6) resultó efectiva para la extracción del principio activo contenidas en las vainas de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) que eran los taninos; ya que contaba con la capacidad de poder congelar el extracto para realizar la operación de liofilización y contar con el poder inhibitorio necesario tanto para las bacterias aerobias como para las bacterias patógenas de *Escherichia Coli*.
- ❖ La obtención de los taninos liofilizados a partir del extracto tánico de tara óptimo se realizó a la presión de 444 μ Hg y a la temperatura de -47 °C durante 3 días de operación discontinua en 9 horas /día.
- ❖ Las concentraciones de extractos tánicos de tara inferiores a 160 mg/ mL no presentaron ninguna inhibición o reducción de consideración en el número de microorganismos, tanto para las bacterias aerobias mesófilas como para las bacterias patógenas de *Escherichia Coli*, luego de realizar

las pruebas de determinación de concentraciones mínimas inhibitorias aplicados a los coloides emulsionados de carne de res.

- ❖ La carga bacteriana en el coloide emulsionando de carne de res al inicio de la tesis presentaba una tasa de bacterias aerobias mesófilas de 1.36×10^7 UFC/ mL y de bacterias patógenas de *Escherichia Coli* una tasa bacteriana mayor a 1100 NMP/ mL antes de la adición del extracto tánico de tara.
- ❖ La solución activada de taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) aplicados en diferentes muestras de coloides emulsionados de carne de res, previamente inoculados con una concentración de 10^5 UFC/ mL de bacterias aerobias mesófilas y la misma concentración de bacterias patógenas de *Escherichia Coli* presentaron actividad antibacteriana en diferentes dimensiones.
- ❖ La concentración mínima inhibitoria necesaria del extracto tánico de tara para conseguir la inhibición de las bacterias aerobias mesófilas fue de 160mg/ mL y la de las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* fue de 320 mg/ mL , pero la concentración de 160 mg/ mL aunque presentó mayor carga bacteriana inicial (tiempo cero) que ésta, pudo reducir y llegar a conseguir la inhibición para ambos microorganismos en estudio, en el mismo tiempo que la de 320 mg/ mL.
- ❖ La actividad antibacteriana del extracto tánico de tara de 160 mg/ mL se evidenció a partir del tercer día presentando una reducción de 460 a 160 NMP/ mL de bacterias de *Escherichia Coli* llegando al día 30 con 3 NMP/ mL , y del ETT de concentración de 320 mg/ mL presentó una reducción de 120 a 7 NMP/ mL de bacterias de *Escherichia Coli* llegando al día 30 con 3 NMP/ mL , evidenciándose que ambas concentraciones

lograron una reducción igual aunque comenzaron con diferentes cargas bacterianas iniciales.

- ❖ La actividad antibacteriana del extracto tánico de tara de 160 mg/ mL presentó una reducción de 6.37×10^6 a 3.67×10^6 UFC / mL de bacterias aerobias mesófilas en los tres primeros días llegando al día 30 con una presencia de 1.62×10^3 UFC / mL , y del ETT de concentración de 320 mg/ml presentó una reducción de 3.73×10^3 a 2.77×10^6 UFC/ mL de bacterias de aerobias mesófilas en los tres primeros días llegando al día 30 con una presencia de 1.96×10^4 UFC/ mL , esto evidencia que la concentración de 160 mg/ mL tiene una mejor actividad antibacteriana que la de 320 mg/ mL.

- ❖ La solución activada de taninos liofilizados obtenido a partir de las vainas de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) con una concentración de 160 mg/ mL de ETT, se consideró como la concentración mínima inhibitoria para conseguir la actividad antibacteriana contra las bacterias patógenas de *Escherichia Coli* y las bacterias aerobias mesófilas.

- ❖ Teniendo en cuenta todos las conclusiones a las que se llegaron anteriormente, podemos confirmar nuestra hipótesis general, los taninos liofilizados de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) inhiben el crecimiento de la bacteria patógena *Escherichia Coli* y las bacterias aerobias mesófilas que se pudiesen encontrar en los coloides emulsionados de carne de res destinados a la elaboración de hamburguesas contaminados con dichos microorganismos.

6.2 RECOMENDACIONES.

- ✓ Las diversas experiencias en los laboratorios debe de realizarse siempre con los implementos de seguridad e higiene: mandil grueso de color claro, mascarilla nasobucal, toca y guantes.

- ✓ Para las pruebas experimentales microbiológicas se debe de tener en consideración lo siguiente :
 - Nunca olvidarse de colocar los implementos de seguridad e higiene para cualquier prueba experimental microbiológica.
 - Lavar y esterilizar los materiales a emplearse en cada análisis.
 - Verificar la temperatura y/o presión de la autoclave durante el proceso de esterilización.
 - Limpiar y desinfectar el área de trabajo antes y después de realizar nuestras experiencias de Laboratorio.
 - Preparar y esterilizar los medios de cultivo de acuerdo con los estándares de calidad requeridos y el análisis a realizar, teniendo en consideración las instrucciones que los acompañan para su preparación y empleo.

- ✓ Se recomienda identificar, separar y elucidar los taninos presentes en la *Caesalpinia Spinosa* (Tara), responsables de la actividad antimicrobiana reportada en el presente trabajo, con el fin de generar alternativas para la obtención de nuevos antimicrobianos naturales.

REFERENCIALES

- Aquihuatl, M., Pérez M. (2004). *Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General*. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Departamento de Biotecnología. México.
- Bello Gutierrez, J. (2005). *Calidad de vida, alimentos y salud humana : Fundamentos científicos*. Ed. Diaz de Santos. España.
- Campos, D. , Chirinos, R. , Martínez, P. , Betalleluz, I. , Chambi, F. , Bravo, N. (2010). *Obtención y caracterización de taninos hidrolizados de tara (Caesalpinia spinosa) y evaluación de su eficacia antioxidante en carnes y aceites vegetales*. Investigación de la Universidad Nacional Agraria –La Molina. Instituto de Biotecnología.
- Carvajal,G. (2000). *Efecto del grupo racial sobre el valor nutricional, suavidad de la carne y rendimiento de la canal*. Tesis para obtener la especialidad de Zootecnia. Universidad de Costa Rica.
- Contreras Blanco, L. (1988). *Estudio Técnico de Implementación de una Planta Piloto para obtener Ácido Gálico a partir de la Tara (Caesalpinia Tinctoria)*. Tesis para obtener grado de Ingeniero Químico. Universidad Nacional del Callao.
- De La Cruz, P. (2004). *Aprovechamiento Integral y Racional de la Tara. Caesalpinia Spinosa- Caesalpinia Tinctoria*. Revista del Instituto de Investigación FIGMMG. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vol 7: 64-73.
- Díaz Gutiérrez, A.(1994). *Obtención de Taninos a partir de la Tara y otros*. Informe de Investigación. Universidad Nacional del Callao. Facultad de Ingeniería Química.
- Dodds,KL., Austin, JW.(1997). *Clostridium botulinum.. Food Microbiology. Fundamental and Frontiers : American Society for Microbiology*. pp.288-304.

- Espinal Corrales, N. (2009). *Extracción y caracterización fisicoquímica del Contenido tánico en la corteza de cinco especies Forestales procedentes del departamento de Petén, aprovechando el subproducto de la Industria de aserradero*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ingeniería Química. Escuela de Ingeniería Química. Guatemala. Mayo. Tesis para obtención de Título de Ingeniero Químico.
- Fernández Andreu, C., Pimentel Turino, T., Martínez Machín, G. y col (1999). *Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fluconazol frente a Cryptococcus neoformans*. Revista Cubana Med. Tropical.51(1):55-57.
- Fernández Escartín, E., Castro Rosas, J. (1998). *Microorganismos patógenos en alimentos*. Extensión. Secretaría de extensión Universitaria. Universidad autónoma de Querétaro. 2:12-14.
- Ferreira de Castro, F. (1999). *Gordura da carne bovina e saude humana. I parte*. Pecuaria de corte.
- Flores, W., Fuentes, R., Galindo, D y col. (2008). *Evaluación de los efectos antioxidante, antibacteriano y antifúngico de Calophyllum Brasilense Cambess (Lagarto Caspi)*. Revista Horizonte Médico. Vol. 8 (2).
- Griffin, PM. , Tauxe,, RV.(1991). *The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. Coli and hemolytic uremic syndrome*. The associated Epidemiol Rev.13 : 60-98.
- Ingram, M. (1962). *Journal of Applied Microbiology*. Vol.5.
- Inocente Camones, M.(2009). *Actividad Antioxidante y Antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de la Triplaris americana L. (Tangarana colorada)*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Tesis para optar el Título profesional de Químico Farmacéutico.
- Larissa, M. (2005). *Emulsión Cárnica de Salchicha de Viena*. Mundo Lácteo y Cárnico. Marzo/Abril .

- Lastra, H. y Col. (2000) . *Método Analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo*. Revista Cubana Plantas Medicinales. Centro de Investigación y Desarrollo de medicamentos. Vol.5 (1);17-22.
- Lawrie, R.A. (1967). *Ciencia de la Carne*. Edit. Acribia. Zaragoza. España.
- Lizcano A., Vergara J. (2008). *Evaluación de la Actividad antimicrobiana de los Extractos Etanólicos y/o Aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos Patógenos y Fitopatógenos*. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Colombia, Bogotá.
- Liu, H. , Lengua, L. , León, G. , La Torre, C. , Huapaya, J. , Chauca, J. (2002). *Evaluación de la Actividad antibacteriana in vitro de los extractos de Caesalpinia Spinosa "tara" y Eucalyptus sp. "eucalipto"*. Revista Horizonte Médico. Vol. 2.
- Livermore, DM.(2004). *The need for new antibiotics*. Clin Microbiol Infect ; 10 (S4):1-9.
- Lock de Ugaz, O.(1988). *Métodos en el estudio de Productos Naturales* . Investigación Fitoquímica. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial; página 211.
- Lock, O. , Unten, L. (1991).*Taninos de Tara: su Acido Gálico y Esteres*. Rev. El Ingeniero Químico. 5:17-21.
- López, C. , Garró, V. , Yrei, V. , Gallardo, T. (1998). *Acción Antimicrobiana Caesalpinia Tintoria (Molina) Kuntze o Tara de diferentes Regiones del Perú*. Revista de Ciencia e Investigación. Vol 1.
- Maguna, F. (2006). *Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides*. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias. Argentina
- Mata, C. (1999). *Empleo de Fermentos Lácticos en la fabricación de productos cárnicos*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria- Universidad de Córdoba.
- Miranda, M. (1992). *Manual de Prácticas de laboratorio de Análisis Farmacognóstico*.

- Niinivaara, FP., Antila, P.(1973). *El valor nutritivo de la carne*. Edit. Acribia. Zaragoza, España.
- Pérez, J. y col. (2009). *Actividad Antibacteriana de extractos de Phenax Rugosus y Tabebuia Chrysantha*.
- Ramírez, L., Díaz H. (2007). *Actividad Antibacteriana de extractos y fracciones del Ruibarbo (Rumex Conglomeratus)*. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia .pp. 397-400.
- Ramos, C . (1984). *Manual de Técnicas Microbiológicas para estudiantes de Ing. Pesquera y Técnicas en Industrias Alimentarias*.
- Sánchez, M. (2004). *Microbiología de Suelos .Técnicas, métodos y medios de cultivo*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza. México.
- Schmidt, J., Peipp, H., Maier, W. y col (1997). *Arbuscular mycorrhizal fungus induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots*. *Phytochemistry*.44:581-587.
- Sharma R, y col. (2005).*Antibacterial resistance : current problems and possible solutions*. *Indian JMed Sci*; 59:120-129.
- Silva,L. y col. (2006). *Enfermeros. Cuerpo Técnico, Escala de Diplomado en Salud Pública*. Administración Regional de Murcia. Vol.I. (Extraído de www.libreriainterbook.com).
- Torres, D. , Nidia, A. y col. (2007). *Evaluación mediante tres técnicas de susceptibilidad a fluconazol en especies de Candida aisladas en pacientes con infecciones invasoras*. Bogotá- Colombia.

Referencias electrónicas:

- ICMSF : International Commission on Microbiological Specifications for foods.
<http://www.icmsf.org>

- FDA : U.S. Food and Drug Administration
<http://www.fda.gov>

- USDA : United States Department of Agriculture
<http://www.usda.gov>

- <http://nelsoncobba.blogspot.com/2008/02/liofilizacin.html>

APÉNDICES

APÉNDICE A

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	MESES						
	1	2	3	4	5	6	7
Recopilación de la Bibliografía	X	X	X				
Adecuación del método	X	X					
Determinar la calidad microbiana: Determinación de E.Coli y Bacterias Aerobias Mesófilas en el coloide emulsionado de carne		X					
Determinar la C.M.I del ETT para E.Coli y Aerobios Mesófilos			X	X			
Determinar la actividad antibacteriana de la C.M.I de los taninos liofilizados extraídos de la tara para E.Coli y Aerobios Mesófilos			X	X	X		
Procesamiento de datos					X	X	X
Presentación del Informe Final							X

APÉNDICE B

RECURSOS, COSTO Y PRESUPUESTO

Requerimientos	Especificaciones	%	Dólares Americanos (\$)
Recursos humanos	Biólogo(Asesor)	3.04727623	206.90
	Ingeniero Químico(Asesor)	2.03146839	137.93
	Investigador	5.07874462	344.83
	Tec. Informática	1.26972298	86.21
	Estadístico	1.52363811	103.45
	Linguístico	1.01580784	68.97
	Especialista en Redacción	1.52363811	103.45
Equipos / Materiales	Materiales de Vidrio	7.36412815	500.00
	Materiales de Metal/Plásticos	2.20923845	150.00
	Reactivos Químicos	0.73641282	50.00
	Insumos	1.47282563	100.00
	Medios de cultivo	11.782605	800.00
	Equipos de Laboratorio	29.4565126	2000.00
	Equipos para preparación de emulsiones cárnicas	12.5190179	850.00
Servicios	Internet	4.03760418	274.14
	Material de Imprenta	2.53929867	172.41
	Impresiones/ Fotocopias	1.26972298	86.21
	Teléfono	0.50783028	34.48
	Luz	1.26972298	86.21
	Agua	2.53929867	172.41
	Transporte	3.55510651	241.38
	Alimentario	3.25037888	220.69
TOTALES		100	6789.67

Pruebas Preliminares con los diferentes Extractos Tánicos de Tara

CORRIDA EXPERIMENTAL	N° DE DISCO	SOLUTO	SOLVENTE	VOLUMEN EN SOLVENTE (ml)	PESO DE MUESTRA (gr)	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO (gr/ml)	TIEMPO DE MACERACIÓN (días)	TIEMPO DE MACERACIÓN (horas)	PRESENCIA DE HALO DE INHIBICIÓN	COLOR DE HALO DE INHIBICIÓN	INTENSIDAD DEL HALO DE INHIBICIÓN	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
												Replica 1 (mm)	Replica 2 (mm)	Replica 3 (mm)	Promedio (mm)
1	1	Tara	Alcohol 96°C	25	50	2.0	5	120	SI	B	+	8.40	9.90	10.20	9.50
	2	Tara	Agua estéril	25	50	2.0	5	120	SI	LC	++	11.20	12.60	12.00	11.93
	3	Tara	Alcohol 96°C	25	50	2.0	21	504	SI	M	+++	18.00	16.00	16.70	16.90
	4	-	Suero Fisiológico	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
2	1	Tara	Agua estéril	25	50	2.0	21	504	SI	C	++	17.20	17.00	15.80	16.67
	2	Tara	Alcohol 96°C	25	50	2.0	21	504	SI	M	+++	18.60	19.40	20.50	19.50
	4	-	Suero Fisiológico	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
3	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril	25	50	2.0	21	504	SI	C	++	16.90	17.80	17.00	17.23
	3	Tara	Alcohol 96°C	25	50	2.0	21	504	SI	M	+++	18.30	19.00	18.40	18.57
	4	-	Suero Fisiológico	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
4	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril	100		0.0	1	24	SI	C	++	16.9	18.0	17.3	17.41
	3	Tara	Alcohol 96°C	100		0.0	1	24	SI	LM	++	15.8	16.7	17.6	16.70
	4	-	Suero Fisiológico	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
5	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (1:1)	30	30	1.0	-	12	SI	LM	++	21.00	23.40	24.60	23.00

	3	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (1:1)	30	30	1.0	1	24	SI	M	+++	30.10	29.00	28.20	29.10
	4	-	Suero Fisiológico	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
6	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (1:1)	30	30	1.0	-	8	SI	LM	++	18.00	15.20	16.10	16.43
	3	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (1:1)	30	30	1.0	-	12	SI	LM	+++	21.00	23.40	24.60	23.00
	4	-	Suero Fisiológico	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
7	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (2:1)	40	20	0.5	-	12	SI	LM	+++	21.20	20.40	19.10	20.23
	3	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (2:1)	40	20	0.5	1	24	SI	LM	+++	25.30	25.00	24.20	24.83
	4	-	Suero Fisiológico	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
8	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (2:1)	40	20	0.5	-	8	SI	LM	++	15.20	16.00	14.40	15.20
	3	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (2:1)	40	20	0.5	-	12	SI	LM	+++	21.20	20.40	19.10	20.23

	4	-	Suero Fisiológico	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
9	1	Tara	Agua estéril	25	50	2.0	21	504	SI	C	++	17.20	17.00	15.80	16.67
	2	Tara	Alcohol 96°C	25	50	2.0	21	504	SI	M	+++	17.80	16.90	18.90	17.87
	3	Tara	Alcohol 96°C	25	50	2.0	5	120	SI	LC	++	15.00	15.60	16.00	15.53
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	20.5	22.0	21.6	21.37
10	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril	25	50	2.0	21	504	SI	C	++	18.30	19.00	18.40	18.57
	3	Tara	Alcohol 96°C	25	50	2.0	21	504	SI	M	++	13.10	12.00	15.40	13.50
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	19.60	20.40	21.00	20.33
11	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Alcohol 96°C	100	10	0.1	-	18	SI	C	++	16.90	16.00	18.80	17.23
	3	Tara	Alcohol 96°C	100	10	0.1	1	24	SI	LM	++	18.00	17.40	15.20	16.87
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	23.50	22.00	19.70	21.73
12	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril	100		0.0	-	18	SI	LC	++	18.00	16.60	17.50	17.37
	3	Tara	Agua estéril	100		0.0	1	24	SI	C	++	19.00	18.60	18.00	18.53
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	19.80	20.10	21.50	20.47
13	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril	100		0.0	1	24	SI	C	++	18.00	17.40	18.50	17.97
	3	Tara	Alcohol 96°C	100		0.0	1	24	SI	LM	+++	17.90	18.00	17.90	17.93
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	24.40	18.90	22.60	21.97
14	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril	100		0.0	-	18	SI	C	++	15.90	16.60	17.00	16.50
	3	Tara	Alcohol 96°C	100		0.0	-	18	SI	C	+	12.30	14.00	12.60	12.97
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	21.00	22.70	23.00	22.23
15	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-

	2	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (1:1)	30	30	1.0	-	12	SI	LC	++	15.00	14.30	12.90	14.07
	3	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (1:1)	30	30	1.0	1	24	SI	C	++	18.00	16.70	17.90	17.53
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	20.00	19.90	21.40	20.43
16	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (2:1)	40	20	0.5	-	12	SI	LC	+	16.70	15.60	18.20	16.83
	3	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (2:1)	40	20	0.5	1	24	SI	C	++	17.70	19.00	17.50	18.07
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	19.00	20.20	18.50	19.23
17	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (3:1)	30	10	0.3	-	12	SI	C	++	14.30	15.00	14.00	14.43
	3	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (3:1)	30	10	0.3	1	24	SI	C	++	16.70	15.50	19.00	17.07
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	18.40	18.00	19.00	18.47
18	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (4:1)	40	10	0.3	-	12	SI	C	++	15.90	16.90	16.00	16.27
	3	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (4:1)	40	10	0.3	1	24	SI	C	++	17.00	17.90	17.00	17.30
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	18.00	14.70	19.90	17.53
19	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-

	2	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (5:1)	50	10	0.2	-	12	SI	LC	++	14.60	15.90	13.90	14.80
	3	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (5:1)	50	10	0.2	1	24	SI	C	++	16.60	17.80	16.00	16.80
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	17.70	18.00	18.80	18.17
20	1	-	Agua	5	-	-	-	-	NO	ND	ND	-	-	-	-
	2	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (6:1)	60	10	0.2	-	12	SI	C	++	12.90	13.90	16.60	14.47
	3	Tara	Agua estéril+ Alcohol 96°C (6:1)	60	10	0.2	1	24	SI	LM	++	15.90	16.90	15.80	16.20
	4	-	Alcohol 70°	5	-	-	-	-	SI	LM	++++	17.90	18.60	20.00	18.83

APÉNDICE D.

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLES INDEPENDIENTES	INDICADORES INDEPENDIENTES
<p>¿Los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> tendrán un efecto inhibitorio sobre la bacteria patógena <i>Escherichia Coli</i> y las bacterias Aerobias Mesófilas presentes en los coloides emulsionados de carne de res para la elaboración de hamburguesas?</p>	<p>Determinar el efecto inhibitorio de los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> en <i>Escherichia Coli</i> y en las Bacterias Aerobias Mesófilas presentes en los coloides emulsionados de carne de res para la elaboración de hamburguesas.</p>	<p>En la producción de hamburguesas se elabora el coloide emulsionado de carne de res, en esta etapa se incrementa la carga bacteriana; la adición del extracto de los taninos liofilizados de la vaina de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> (Tara) permite inhibir la <i>Escherichia Coli</i> y las Bacterias Aerobias Mesófilas presentes en estos emulsionados para asegurar la calidad higiénica del producto final.</p>	<p>F(x) : Carga bacteriana presente en el coloide emulsionado de carne.</p> <p>G(y) : Concentración del extracto de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> (TARA).</p>	<p>x₁= Crecimiento celular inicial de <i>Escherichia Coli</i> y Bacterias Aerobias Mesófilas en el coloide emulsionado de carne.</p> <p>x₂= Crecimiento celular adquirida de <i>Escherichia Coli</i> y Bacterias Aerobias Mesófilas en el coloide emulsionado de carne.</p> <p>y₁= Inhibición del crecimiento celular de <i>Escherichia Coli</i> y Bacterias Aerobias Mesófilas.</p>

PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS SECUNDARIA	VARIABLES DEPENDIENTES	INDICADORES DEPENDIENTES
<p>¿Existe una diferencia en su posible efecto inhibitorio frente a los microorganismos en estudio de las diferentes concentraciones del Extracto Tánico a obtener ?.</p> <p>¿Cuál es la carga bacteriana presente en el coloide emulsionado de carne de res para la elaboración de hamburguesas antes de iniciar la experiencia?.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Obtener distintas concentraciones experimentales del Extracto Tánico (p/v) de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> (Tara). ▪ Determinar la carga bacteriana presente en el coloide emulsionado de carne de res para la elaboración de hamburguesas. 	<ul style="list-style-type: none"> • El efecto inhibitorio aumenta conforme aumenta la concentración de taninos presentes en las diferentes concentraciones experimentales de del Extracto Tánico (p/v) de la <i>Caesalpinia Spinosa</i> (Tara). ▪ La carga bacteriana presente en el coloide emulsionado de carne de res para la elaboración de hamburguesas se encuentra por encima de los valores permitidos por NTS N°071-MINSA/DIGESA. 	<p>H(z) : Acción antibacteriana sobre <i>Escherichia coli</i> y bacterias aerobias mesófilas en el coloide emulsionado de carne.</p>	<p>z_1= Concentración del extracto tánico.</p> <p>z_2= Muerte celular de <i>Escherichia Coli</i> y Bacterias Aerobias Mesófilas en el coloide emulsionado de carne.</p>

¿Cuál es la Concentración Mínima Inhibitoria del Extracto Tánico de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) para *Escherichia coli* y las Bacterias Aerobias Mesófilas en el coloide emulsionado de carne de res?.

¿ Presentará actividad antibacteriana los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) sobre la *Escherichia coli* y las Bacterias Aerobias Mesófilas en el coloide emulsionado de carne, destinado a la elaboración de hamburguesas?.

▪ Obtener la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto tánico de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) para *Escherichia coli* y las Bacterias Aerobias Mesófilas.

▪ Determinar la Actividad Antibacteriana de la Concentración Mínima Inhibitoria de los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* para *Escherichia coli* y las Bacterias Aerobias Mesófilas en el coloide emulsionado de carne, destinado a la elaboración de hamburguesas.

La Concentración Mínima Inhibitoria del extracto tánico de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) para *Escherichia coli* y las Bacterias Aerobias Mesófilas es la concentración del Extracto que presenta la mayor concentración de taninos.

• Los taninos liofilizados extraídos de la vaina de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) presentan una actividad antibacteriana sobre la *Escherichia coli* y las Bacterias Aerobias Mesófilas en el coloide emulsionado de carne destinado a la elaboración de hamburguesas.

ANEXOS

ANEXO N°1

ESTUDIO GENERAL DE LA PLANTA DE LA CAESALPINIA SPINOSA (TARA)

La Tara es un arbusto que mide de 2 a 3 m. de alto, provisto de agijos o espinas, de hojas alternas compuestas con hojitas pareadas, ovoides, verdes y brillantes de 15 cm. de largo más o menos, sus flores en corimbos son de color amarillo muy vistoso, sus frutos son ablongos y esponjosos que varían entre 8 y 10 cm. de largo y de 1 a 2 cm. de ancho, y el espesor entre 7.8 y 10.8 mm., contienen hasta 7 semillas, de color marrón oscuro cuando están maduros.

La Tara crece en los climas semitropical y sub tropical de la Costa, en el de las vertientes occidentales de los Andes y valles interandinos, afronta ventajosamente la sequedad de los suelos, pero en cambio no podría soportar temperaturas bajas, como -4 a -5 °C. Las vainas pueden ser colectadas dos veces al año.

SPRAGINES declara que el nombre más comúnmente usado es CAESALPINIA TINCTOREA (bajo reglas internacionales), sin embargo el correcto nombre de especie es CAESALPINIA SPINOSA.

Nombres Científicos:

- Tara Spinosa.
- Poinciana Spinosa.
- Caesalpinia Spinosa.
- Coultenia Tintorea.

Nombres Vulgares:

- Dividivi, Guarongo y Tara en Colombia.
- Divi-divi en Brasily en los andes de Venezuela.
- Guarango y Huarango en Ecuador.

Taxonomía :

División:	Fanerogamas.
Sub División:	Angiospermas.
Clase:	Dicotiledoneas.
Sub Clase:	Arquidamideas.
Orden:	Rosales.
Familia:	Leguminosa.
Sub Familia:	Caesalpinodea.

Género: Caesalpineae.
Especie: Spinosa(Tinctorea).
Nombre Vulgar: Tara (Centro y Sur).
Taya (Norte del País).
Achara en el Dpto. de Piura.
Pampay en el Dpto. de la Libertad.

A1.1 USOS DE LA TARA

a. Curtidos y peletería

La industria de curtidos y peletería tiene como objetivo la transformación de pieles de animales en cuero, producto resistente e imputrescible, de amplia utilización industrial y comercial en la elaboración de calzado, prendas de vestir (guantes, confección), marroquinería y pieles. El curtido de las pieles animales puede hacerse empleando agentes curtientes minerales, vegetales y sintéticos, o bien en casos muy especiales, mediante aceites de pescado o compuestos alifáticos sintéticos. El curtido vegetal utiliza: extractos de: cortezas, madera, hojas, frutos (Tara), agallas y de raíces.

Los componentes de los extractos corresponden a los siguientes tipos de taninos: Pirocatecol, Pirogalol y Elágicos, todos ellos taninos hidrolisables o condensados. Ambos tipos de taninos, hidrolizables y condensados, se emplean en la industria del cuero, por su gran poder curtiente, permitiendo obtener una amplia variedad de cueros, que se diferencian en flexibilidad y resistencia.

Entre sus características:

- Los hace inmune al ataque bacteriano.
- Aumenta temperatura de encogimiento.
- Impide que las fibras colágenas aglutinen en gramos al secar, para que quede un material poroso, suave y flexible.
- Sustitución del cromo y aprovechamiento de los residuos en el curtido de la piel.

Con la utilización de taninos vegetales la corriente residual es menor y contiene una menor concentración de taninos, por lo que la coloración de las aguas residuales de las tenerías disminuye, aunque la concentración de materia orgánica es la misma. Se puede conseguir una reducción del 65% en el consumo del agua.

Los principales Taninos vegetales son extractos acuosos de tipos especiales de fruto, madera y corteza, especialmente Tara, quebracho y acacia. El principal constituyente activo es el ácido tánico.

Los taninos penetran en el cuero o la piel después de largos períodos de inmersión, durante los cuales los agregados moleculares de tanino forman entrecruzados entre las cadenas polipeptídicas de las proteínas de la piel. La formación de puentes de hidrógeno es un factor importante.

b. En Medicina

En medicina se prescriben como astringentes. La propiedad ya comentada de coagular las albúminas de las mucosas y de los tejidos, crean una capa aislante y protectora que reduce la irritación y el dolor. Externamente, los preparados a base de drogas ricas en taninos, como las decocciones, se emplean para detener pequeñas hemorragias locales; en inflamaciones de la cavidad bucal, catarros, bronquitis, quemaduras, hemorroides, etc. Internamente, son útiles contra la diarrea, enfriamiento intestinal, afecciones vesiculares, y como contraveneno en caso de intoxicación por alcaloides vegetales.

c. En Alimentación

En alimentación, originan el característico sabor astringente a los vinos tintos (de cuyo bouquet son, en parte, responsables), al té, al café o al cacao. Las propiedades de precipitación de los taninos son utilizadas para limpiar o clarear vinos o cerveza.

d. En la Industria

En la industria se utilizan para la fabricación de tintas y el curtido de pieles, gracias a la capacidad de los taninos para transformar las proteínas en productos resistentes a la descomposición. En este proceso se emplean determinados taninos, los más utilizados son los procedentes de la acacia, el castaño, la encina, el pino o la bastarda.

Se emplean en la industria textil por su capacidad de reaccionar con las sales férricas, los cuales dan lugar a productos negro-azulados adecuados para tintes. Igualmente son utilizados como mordientes para la aplicación de tintes en tejidos, coagulantes de gomas, o aprestos para papeles o sedas.

Los taninos condensados se usan principalmente en la fabricación de adhesivos y resinas. Por ejemplo, aquellos que han sido aislados de especies de Acacia, han servido para desarrollar adhesivos en frío y termofraguados, por tratamiento con úrea-formaldehído, o con copolímeros fenol-formaldehído, estos últimos usados en la fabricación de enchapes de madera a prueba de agua. También se menciona su empleo como precipitantes para suspensión de arcilla.

Los taninos hidrolizables encuentran amplia aplicación debido a sus propiedades antioxidantes y su habilidad para formar complejos solubles e insolubles con las proteínas. Por ello se emplea en la industria de alimentos, farmacéutica y en cervecería. En este último campo, por ejemplo, se usan como estabilizadores de la cerveza: en el producto que no a sido recientemente preparado, las proteínas se combinan con los polifenoles para formar complejos que son responsables de la presencia de turbidez. Al agregar los taninos, el nivel de proteínas es disminuido a un valor apropiado y se aumenta así el tiempo de almacenamiento de la cerveza. En la industria farmacéutica, se emplean para contraatacar el efecto de los alcaloides y el envenenamiento por sales de metales, inactivándose éstos por precipitación. En la industria de alimentos se puede por ejemplo, remover impurezas proteínicas por precipitación con taninos; emplearlo en la preservación y maduración de alimentos, aprovechando sus propiedades antisépticas y antioxidantes; así como en la clarificación del vino. Su aplicación en otros campos está

orientada, por ejemplo, a la extracción de Pb, Fe, Ca, Ba, y Ra presentes en soluciones, por coprecipitación con gelatina y taninos; al efecto anticorrosivo en superficies de Fe, expuestas al medio ambiente; al empleo en la elaboración de tintas; como recubrimiento protector de Cinc y aleaciones del mismo metal.

También se puede dar la utilización de las vainas, para la extracción de taninos y de ácido gálico. Aplicación posterior del ácido gálico.

Diversos métodos se reportan para la obtención del extracto tánico a partir de las vainas de tara seca y molida, y la posterior hidrólisis para la obtención del ácido gálico. Existen seis métodos, los tres primeros realizan hidrólisis química y los dos siguientes es a través de hidrólisis enzimática, el sexto es un interesante ensayo que no utiliza catalizadores con lo que se estaría en pos de un proceso amigable con el ambiente y el que estaría produciendo pirogalol además del ácido gálico.

- Extracción con una mezcla de acetato de etilo: etanol (1:3) .
- Extracción por una hora con agua (1:4 p/v) a 65 °C.
- Extracción e hidrólisis en una sola etapa.
- Extracción con agua desionizada .
- Mezcla del polvo de Tara con microorganismos.
- Hidrólisis no catalizada de taninos y otros galotaninos con agua líquida a alta temperatura sin catalizadores.

Aplicaciones en la Industria Química y Farmacéutica.

- Las fuentes principales de taninos son la corteza y madera de los árboles y las cáscaras de frutos. La mayoría de los taninos utilizados en la industria son los obtenidos de la corteza y de la madera de acacia y de quebracho, procedentes de Sudáfrica y Sudamérica. Sin embargo, es preciso considerar que la corteza o madera, tanto de otras especies arbóreas como de otras localizaciones, y disponibles en gran cantidad, podrían llegar a ser también útiles como fuentes potenciales de taninos.
- Una de las aplicaciones principales de los taninos ha sido en la industria del curtido de pieles para la obtención de cuero, en la que los taninos procedentes de acacia y quebracho son considerados de muy buena calidad, ya que penetran rápidamente en la piel y dotan de un color luminoso al producto final. Aunque la tecnología del curtido de pieles tiene una larga historia, el conocimiento sobre los mecanismos de interacción entre taninos y proteína animal es reciente. Se sabe que la estructura química del flavanol, la capacidad de penetración del tanino y la capacidad de fijación en la piel animal son los factores más importantes, que condicionan la calidad del cuero obtenido (Bliss, 1989; Pauckner, 1992; Krisper e. al., 1992).
- Otra importante utilidad de los taninos, en particular de los taninos condensados, está en la industria de obtención de adhesivos, especialmente para madera de conglomerado. Han sido descritas una amplia variedad de formulaciones de adhesivos derivados de taninos condensados, en las que estas sustancias son frecuentemente utilizadas como coaductos junto con otros polímeros sintéticos, para conseguir adhesivos efectivos (Pizzi, 1983, 1992 y 1993).
- Debido a las propiedades antimicrobianas de los taninos (Laks, 1987; Scalbert, 1991), estos compuestos son contemplados en la investigación actual de áreas tan diversas

como, por ejemplo, la conservación de alimentos y la protección de la madera, habiéndose obtenido, especialmente en esta última faceta, buenos resultados (Laks, 1989 b; Tisler, 1992). Numerosos estudios han demostrado que las formulaciones basadas en complejos polifiavanoles-cobre son eficaces protectores de madera. Su utilización presenta numerosas ventajas debido al reducido impacto ambiental durante la fabricación y aplicación, y también ante la mayor seguridad que presentan para el personal dedicado al tratamiento de maderas, frente a otros tratamientos más convencionales, derivados de la petroquímica

- Además, a los taninos se les ha atribuido importantes propiedades de insecticidas y biocidas en general. La toxicidad para los escarabajos de los taninos condensados de las cubiertas de las semillas de legumbres ha sido demostrada en el caso de *Viola faba*, cuyos taninos inhibieron el desarrollo de *Callosobruchus maculatus* (Boughdad et al., 1986). El crecimiento de las larvas de *Heliothis virescens* resultó fuertemente inhibido por cianidín-3-glucósido (Hedin e. al., 1993).
- Otras muchas actividades biológicas de los taninos los hacen potencialmente útiles en la industria farmacéutica: actividad antiviral, actividad antitumoral, inhibición de la peroxidación de lípidos, disminución de capacidad mutagénica o disminución del contenido de urea en sangre, entre otras actividades

Uso Tradicional.

La tara tiene diversos usos tradicionales, la infusión de las vainas maduras se utiliza para la amigdalitis en forma de gárgaras, la infusión de las hojas se utiliza para la estomatitis, la cocción de las ramas tiernas se usa como abortivo, igualmente se prepara una bebida que se toma como depurativo del colesterol, el cocimiento de las vainas se usan para secar las llagas de las piernas. En general es también muy utilizada para el tratamiento de infecciones vaginales y micóticas, para el lavado de ojos inflamados, para el dolor de estómago y diarreas, para el reumatismo y resfriado, para curar úlceras, como cicatrizante, entre otros. En alimentación, originan el característico sabor astringente a los vinos tintos (de cuyo bouquet son en parte responsables), al té, al café, debemos mencionar que la astringencia se explica al complejarse los taninos con macromoléculas y provocar la precipitación de las glicoproteínas ricas en prolina que contiene la saliva. En la cosmética se utiliza para la evitar la caída del cabello, para su tintura y para la elaboración de champús y bronceadores; también se usa como biocida contra piojos y otros insectos.

A pesar del uso tan amplio no se encuentra literatura científica que avale estos usos tradicionales. Igualmente las recetas son solamente “recetas caseras”.

A1.2 ANALISIS QUIMICO DE LA TARA.

- A) frutos (vaina y semilla)
- B) semillas
- C) gomas o hidrocoloides
- D) germen
- E) cáscara

Humedad: El contenido de humedad se expresa por la pérdida de peso de muestra bajo condiciones de temperatura y presión.

Proteína: El porcentaje de proteína se determinó empleando el método Kjeldahl, utilizando como catalizador selenio; factor de conversión de proteínas 6,25

Extracto etéreo: Se determinó por el método Soxhlet en un tiempo de extracción de 6 horas.

Cenizas: Se determinó por el método de incineración a la temperatura de 550°C por 6 horas.

Fibras brutas: Es el residuo orgánico lavado y seco que queda después de hervir sucesivamente el material con H₂SO₄ y NaOH y finalmente convertido en ceniza.

Carbohidratos: se determina por diferencia de los análisis de humedad, proteína, cenizas, fibra bruta y extracto etéreo.

Azúcares totales: Se utilizó el método volumétrico del Lane Eynon que consiste en agregar la solución hidrolizada de goma a un volumen determinado de solución de Fehling, a fin de reducir todo el ión cúprico o cuproso.

Fibra dietética: La muestra gelatinizada y digestada enzimáticamente con proteasa y amilglucosidasa para remover la proteína y el almidón. Se agrega cuatro volúmenes de 60 ml de etanol al 95% para precipitar la fibra soluble. El precipitado es filtrado, y secado y pesado.

a) Análisis químico en los frutos (vainas y semillas):

HUMEDAD	PROTEINAS	CENIZAS	FIBRA BRUTA	EXTRACTO ETEREO	CARBOHIDRATOS	TANINOS (vainas)
11,70%	7,17%	6,24%	5,30%	2,01%	67,58%	62%

b) Análisis químico de la semilla:

HUMEDAD	PROTEINAS	CENIZAS	FIBRA BRUTA	EXTRACTO ETEREO	CARBOHIDRATOS
12,01%	19,62%	3,00%	4,00%	5,20%	56,17%

c) Análisis químico de las gomas o hidrocoloides:

HUMEDAD	PROTEINAS	CENIZAS	FIBRA BRUTA	EXTRACTO ETEREO	CARBOHIDRATOS	AZÚCARES TOTALES
13,76%	2,50%	0,53%	0,86%	0,48%	81,87%	83,2%

d) Análisis químico del germen:

HUMEDAD	PROTEINAS	CENIZAS	FIBRA BRUTA	EXTRACTO ETereo	CARBOHIDRATOS
11,91%	40,22%	8,25%	1,05%	12,91%	25,66%

e) Análisis químico de la cáscara:

HUMEDAD	PROTEINAS	CENIZAS	FIBRA BRUTA	EXTRACTO ETereo	CARBOHIDRATOS
10,44%	1,98%	3,05%	1,05%	0,97%	83,56%

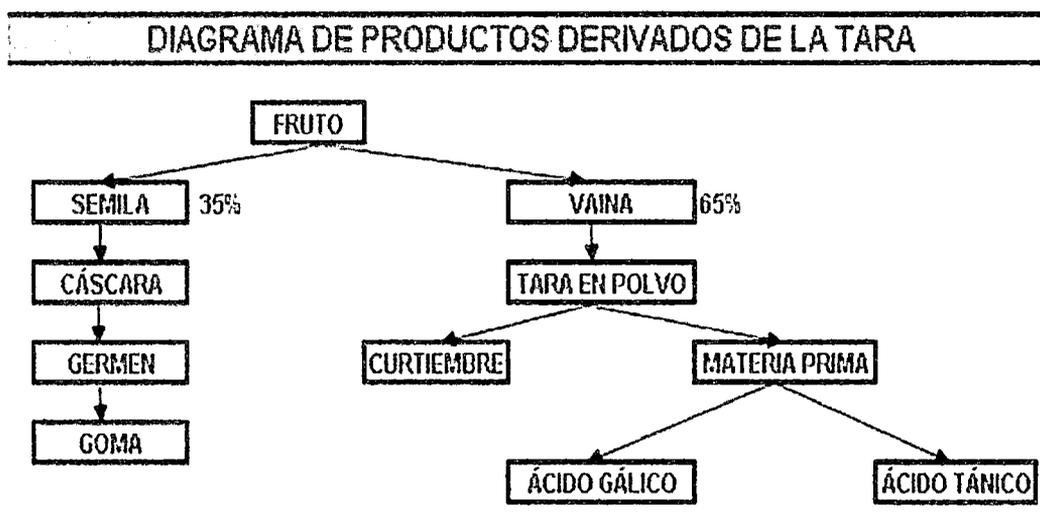


Fig. Diagrama de Productos derivados de la Tara.

ANEXO N°2

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE TANINOS HIDROLIZABLES

2 gr.de *Taninos Liofilizados* a partir de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) se introducen en un tubo grueso (de cultivo) con 20 mL de agua. Calentar a baño maría durante cinco minutos y filtrar. Diluir de nuevo con igual volumen de agua destilada. Posteriormente se tomarán cuatro alícuotas donde se ensayarán las siguientes pruebas:

- a) Sabor astringente: Probar la muestra. Los taninos poseen un sabor amargo.
- b) Solución de FeCl_3 diluido : A partir del reactivo diluido al 5% diluir aun mas con agua hasta que la solución tenga un color ligeramente amarillo. Añadir gota a gota a la solución problema hasta ver el cambio de color o precipitación.
- c) A cada porción del extracto tánico se añaden 3 o 4 gotas de HCl concentrado y alrededor de 1 mL de solución de formaldehído. Hervir durante unos minutos. Los taninos catéquicos precipitan en caliente, pudiendo variar el color del precipitado.

La cuarta fracción sirve como muestra comparativa para observar los cambios de coloración.

ANEXO N°3

MÉTODOS EXPERIMENTALES PARA DIFERENCIAR LOS TANINOS CONDENSADOS

• Método I

Calentar a punto de ebullición una solución de extracto fuertemente acidificada con ácido clorhídrico a la que previamente se le haya agregado un poco de formaldehído. Los extractos hidrolizables permanecerán solubles mientras que los condensados precipitarán. El ácido clorhídrico en caliente actúa hidrolizando las moléculas de los extractos hidrolizables, dando moléculas más pequeñas que aunque lleguen a condensar con el formaldehído continúan siendo solubles. En los extractos condensados sin embargo, el formaldehído forma puentes metilénicos entre dos o más moléculas, lo que hace disminuir su solubilidad y llegan a precipitar.

• Método II

Realizando una valoración potenciométrica de una solución del extracto queda de manifiesto que los taninos hidrolizables tienen grupos carboxílicos con un carácter más ácido que los grupos fenólicos de los taninos catequínicos. Los extractos vegetales forman lacas con las sales férricas de colores oscuros; si son taninos hidrolizables lacas de color negro verdoso y si son taninos condensados de color negro azulado.

ANEXO N°4

MÉTODO DEL TUNGSTO – MOLIBDICO-FOSFÓRICO

(Cuantificación de Taninos)

Se agitan 10 g de muestra con 500 mL de etanol al 50% durante 6 horas, se deja en reposo 8 horas y se agita nuevamente por 30 minutos para posteriormente filtrar. Se transfieren 3 mL del filtrado a una matraz aforado de 50 mL y se diluye con agua destilada hasta enrase (Sm). Finalmente se preparan matraces aforados de 50 mL, los cuales contendrán:

REACTIVOS	BLANCO	PATRÓN	MUESTRA
Sm.	-	-	1.0 mL
Solución de referencia de ácido tánico	-	3.0 mL	-
Agua destilada	5.0 mL	2.0 mL	4.0 mL
Reactivo para taninos	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
Se agita y se deja en reposo 5 min.			
Solución de Carbonato de Sodio al 20%	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

Se completa con agua destilada hasta enrase, se mezcla bien y se lee cada uno a 700 nm.

Solución de referencia de ácido tánico:

Se disuelven 25 mg de ácido tánico en 100 mL de agua destilada, de ahí se cogen 20 mL y se completa volumen hasta 100 mL.

Reactivo para taninos:

10 g de Tungstato de Sodio Dihidratado, 0.2 g de ácido Fosfomolibdico y 5 mL de ácido Fosfórico al 85% en 75 mL de agua destilada. Se refulja 2 horas y después se completa a 100 mL con agua destilada.

La expresión para los cálculos será la siguiente:

$$x = \frac{A_m \times P \times 1000 \times 100}{A_p \times PM \times (100 - p)}$$

Donde :

X= contenido de taninos (%).

P= masa de la sustancia de referencia (g).

A_m = absorbancia de la muestra (nm).

A_p = absorbancia de la solución de referencia (nm).

PM = masa del material vegetal.

p = humedad del material vegetal.

ANEXO N°5

EMULSIÓN CÁRNICA

Una emulsión cárnica es un complejo sistema polifásico que consta de las siguientes fases:

- a) Una solución verdadera: sal, fosfatos, ácidos orgánicos, azúcar, etc.
- b) Dispersión coloidal: proteínas de la carne
- c) Suspensión: Trozos de carne
- d) Emulsión: Grasa
- e) Espuma: Aire atrapado

La fabricación de los productos cárnicos de conveniencia tales como las emulsiones dependen de la formación de una matriz funcional dentro del producto. En general, cuanto mayor es el contenido de carne, mayor es la calidad de dicha matriz.

Sin embargo, cuando se busca desarrollar productos económicos y accesibles al bolsillo de los consumidores, la cantidad de carne empleada será el límite mínimo legal además de que se utilizara diferente tipo de carne.

Aunque el contenido de proteína en la carne de una especie a otra es más o menos similar, la funcionalidad de las proteínas no es exactamente la misma y deberá hacerse uso de otro tipo de ingredientes para subsanar esta diferencia en propiedades funcionales.

ANEXO N°6

CARNE PICADA DE LA HAMBURGUESA

Es el ingrediente más caro e importante de la hamburguesa. La carne ha sido tradicionalmente de carne de vacuno aunque es posible ver algunos casos de mezcla (vacuno-cerdo), existen comercializaciones en las que se emplea carne de bisonte estadounidense (*buffalo burger*), carne de avestruz (*ostrich burger*), o de cérvidos como puede ser el venado. Dentro de las variantes de carne de vacuno, existen algunas variantes especiales que emplean razas de vacuno especiales como aberdeen angus (Hamburguesa angus).

La carne picada es conocida en otros platos, se puede decir que es el elemento más controvertido de la hamburguesa, esta es la razón por la que a veces se denomina hamburguesa a ciertos sándwiches, que sin contener carne, poseen la misma filosofía: hamburguesa vegetal (hamburguesa sin carne elaborada para vegetarianos), hamburguesa de pescado.

La carne picada se suele "aplastar" (generalmente con una espátula apropiada) hasta que tenga una forma de disco (en inglés se le denomina "*patty*"). Algunas cadenas de restaurantes históricas como la estadounidense White Castle las sirve de forma rectangular. En las compañías de restauración de comida rápida, lo más habitual es que la carne se pique en la propia industria cárnica, se le proporcione la forma adecuada y en breve se congele en grandes sistemas de congelación para su almacenamiento. Estas piezas congeladas se distribuyen posteriormente en masa a los puntos de venta, y van directamente a las freidoras o a las parrillas según sea el método de cocinado.

Preocupa a menudo el contenido graso de la carne picada, se sabe que puede rondar entre los 20% a 40% de peso. El caso es que el contenido graso de la carne, junto con la forma específica de ser cocinada (frita, barbacoa, al horno, al microondas, etc.) resultan ser un factor relevante a la hora de definir el conjunto

de sabores presentes. Por regla general los valores más apreciados de ternura, se asocian a contenidos altos de grasa y a preparaciones al horno de forma tradicional.

A la carne picada suele añadirse alguna sustancia ligante para que se compacte adecuadamente y pueda ser más fácil de ingerir, como puede ser huevo, pan rallado. La carne picada debe manipularse con extremo cuidado debido a que puede tener bacterias que contaminan la carne y provocar intoxicaciones alimentarias, tal y como puede ser la causada por la *Escherichia Coli O157:H7*. Es por esta razón por la que conviene hacer la carne lo más posible y que alcance una temperatura de 90°C en su interior.

Las tendencias de cocinado de la carne picada de la hamburguesa pasan por dos procesos diferentes que de forma mayoritaria:

- **Fritas** - Generalmente se vierten los pedazos en una sartén que contenga aceite caliente y se dejan freír hasta que la carne picada logre tener el punto deseado (realizado por la cadena de restauración rápida McDonalds).
- **A la parrilla** - En este caso se suele hacer la carne directamente sobre el calor de una fuente. Es el método más habitual en las barbacoas familiares (realizado por la cadena Burger King).

La diferencia estriba en el sabor final, depende de los gustos se prefiere un método sobre otro. Cabe pensar que la fritura es más grasienta pero permite distinguir y realzar los sabores finales. En la actualidad se emplea también el horno microondas, sobre todo en las hamburguesas congeladas. En la mayoría de los casos suele emplearse unas láminas de cebolla puestas en su superficie para que sus aromas se mezclen con la carne, intensificando sabores.

ANEXO N°7

ESCALA DE McFARLAND

Fundamento:

El patrón o la escala de Mc Farland consiste en una serie de tubos herméticamente cerrados, previamente calibrados y con una densidad óptica diferente originada por la aparición de un precipitado de sulfato de bario (SO_4Ba) resultante de la reacción entre el cloruro de bario (Cl_2Ba) al 1,175% (0,048 M) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% (0,36N). Esta turbidez puede interpretarse ópticamente o por métodos espectrofotométricos y cada una de ellas se corresponde a una concentración conocida de bacterias/mL. Para cada cepa bacteriana hay que establecer la equivalencia entre la turbidez de cada tubo y la masa o la concentración de bacterias (cél/mL) que genera una turbidez similar.

Inconveniente:

Es un método poco preciso, que solo se emplea cuando no hace falta exactitud, ha sido desplazado por los métodos espectrofotométricos. Conservación: El estándar de Mc arland puede ser almacenado hasta por 6 meses en la oscuridad y a temperatura ambiente entre 22° a 25°C. Sin embargo, se recomienda almacenarse a ser posibles en refrigeración.

Cuidados:

Descartar después de 6 meses o antes si su volumen es menor. Antes de cada uso, debe agitarse muy bien usando un shaker, hasta que el precipitado blanco de sulfato de bario se haya disuelto en todo el medio. Para asegurar la densidad del estándar de McFarland así preparado puede ser chequeado usando un

espectrofotómetro con una celda de cuarzo de 1 cm; para el estándar 0,5 de Mc Farland, la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm puede estar entre 0,08 a 0,1. Alternativamente, el aseguramiento del estándar de McFarland puede ser verificado por ajuste de una suspensión de una cepa control (por ejemplo, *E. coli* ATCC 25922) a la misma turbidez, preparando diluciones seriadas 1:10, y realizando el respectivo recuento en placa. La suspensión así ajustada puede tener un conteo de $1,5 \times 10^8$ UFC/ mL. Para levaduras el estándar 0,5 de Mc Farland es equivalente a una suspensión de 10^6 UFC/ ML.

Preparación:

Se adicionan cantidades crecientes (o decrecientes según corresponda) de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1,175% (p/v) en H_2SO_4 al 1% (v/v) de acuerdo a la siguiente tabla para obtener la equivalencia deseada:

Los estándares de turbidez se preparan en tubos similares a los que se emplearan para preparar la suspensión del inoculo. Después, el tubo debe ser bien tapado usando una tapa rosca con teflón, parafilm, o algún otro medio que evite la evaporación del mismo. Esta escala de 3×10^8 a 3×10^9 bacterias por mL es de gran utilidad en cuanto que, en la mayoría de los experimentos, los conteos quedarán dentro de estos límites, excepto en los casos de muy bajo crecimiento.

Escala de McFarland	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.048M)	H_2SO_4 (0.36N)	mL final	[] celular
1	0,1	9,9	10,0	3×10^8
2	0,2	9,8	10,0	6×10^8
3	0,3	9,7	10,0	9×10^8
4	0,4	9,6	10,0	12×10^8
5	0,5	9,5	10,0	15×10^8
6	0,6	9,4	10,0	18×10^8
7	0,7	9,3	10,0	21×10^8
8	0,8	9,2	10,0	24×10^8
9	0,9	9,1	10,0	27×10^8
10	1,0	9,0	10,0	30×10^8

Fuente: NTC 2455, 2000.

ANEXO N°8

NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS VIABLES

Fundamento :

Cuando se pretende investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica más comúnmente usada es el recuento en placa. Esta técnica se aplica para una gran variedad de microorganismos y su fundamento consiste en contar las colonias que desarrollan en el medio de elección después de cierto tiempo y temperatura de incubación presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo en la muestra en estudio. La variedad de especies y tipos diferenciales por sus distintas necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc, hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente.

Materiales y Equipos :

- Autoclave con termómetro y manómetro.
- Baño maría con termómetro y termostato.
- Licuadora de cuatro velocidades.
- Vasos esterilizables para una licuadora.
- Balanza con sensibilidad de 0.01 g.
- Incubadora con termostato
- Utensilios estériles para la preparación de las muestras: cuchillos, cucharas, espátulas.
- Pipetas estériles de 10 y 1 mL graduadas en 0.1 y 0.01 mL respectivamente
- Micropipeta estéril
- Tips estériles para emplearse por la Micropipeta
- Portatips estéril con capacidad de 50 tips

- Placas Petri
- Tela Tocuyo
- Vasos Precipitados de vidrio de 50 ml

Procedimiento:

Distribuir las placas estériles en la mesa de trabajo de manera que su inoculación, la adición de los medios de cultivo y su rotación se realice en forma cómoda y libremente. Marcar las placas en sus tapas con los datos pertinentes previa inoculación de la muestra.

Transferir 1 ml o 0.1 mL de la muestra de cada una de las diluciones a las placas petri estériles evitando todo tipo de contaminación durante la maniobra y aplicando la punta de la pipeta al fondo de la placa mientras escurre el líquido.

Agregar 12 mL del medio de cultivo fundido y manteniendo una temperatura de 45°-48°C en un baño maría. Mezclarlo con la muestra (6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante) sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculos en el medio, procurando que el medio no moje la cubierta de las placas, y dejar solidificar.

El tiempo transcurrido desde el momento que la muestra se incorpora al diluyente, hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las placas, no debe exceder los 20 minutos.

Incubar las placas en posición invertida (la tapa de la placa hacia abajo) durante el tiempo y a la temperatura que se requiera.

Contar las colonias que se presentan en la placa luego de su incubación.

ANEXO N°9

RECUESTO DE COLIFORMES TOTALES Y DE COLIFORMES FECALES - DETERMINACIÓN DEL NMP Y RECUESTO DE *E.Coli*

La presencia de coliformes detectado por la producción de acidez y gas a partir de la lactosa, es considerada como prueba Presuntiva, prueba que se realiza por dilución en tres o cinco tubos con el medio indicado en el diagrama correspondiente. Los tubos presuntivamente positivos se confirman por la producción de gas en el medio correspondiente del mismo diagrama de trabajo. Comparando la combinación de tubos positivos y negativos obtenido en cada dilución con las Tablas de Probabilidades se puede determinar el NMP de “Coliformes Presuntivos” y “ Confirmados”.

Para el recuento de Coliformes Fecales, se toma a partir de los “ presuntivos positivos “ una asada en el medio óptimo y se incuba a 44.5 ± 0.2 °C ó a 45.5 ± 0.2 °C durante 24 horas, conocida como la prueba de Eijkman , es considerada positiva cuando existe crecimiento. Es aconsejable calentar previamente los tubos a la temperatura de incubación antes de la siembra. Para el recuento de colonias de bacterias Coliformes y de *E.Coli* se observará las características morfológicas de las colonias en el medio apropiado según la técnica dada en el diagrama de trabajo.

PRUEBA PRESUNTIVA:

Todas las operaciones deberán efectuarse en absolutas condiciones de asepsia.

1. Preparar tres series sucesivas de 3 tubos con caldo lactosado, una de doble concentración y las otras dos de concentración sencilla.

2. Etiquetar las series con 10, 1 y 0.1 mL.
 3. Agitar vigorosamente la muestra por lo menos 20 veces antes de tomar el volumen que se va a inocular, a efecto de homogeneizar.
 4. Antes y después de realizar las inoculaciones, la boca del frasco de la muestra deberá ser flameada con objeto de evitar contaminación.
 5. Inocular con una pipeta de 10 mL este volumen de muestra en la serie de tubos con caldo de doble concentración, con otra pipeta de 1 mL para 1 mL de muestra en la segunda serie de tubos con concentración sencilla.
 6. Igualmente con la misma pipeta podrá inocularse la tercera serie de tubos con 0.1 mL de muestra.
 7. Incubar todos los tubos a una temperatura de 35 -37°C durante 24-48 horas.
 8. Después de 24 horas de incubación efectuar una primera lectura para observar si hay tubos positivos, es decir, con producción de ácido, si el medio contiene un indicador de pH, turbidez y producción de gas en la campana Durham.
- Al hacer esta verificación es importante asegurarse que la producción de gas sea resultado de la fermentación de la lactosa en cuyo caso se observará turbidez en el medio de cultivo y no confundir con burbujas de aire.
- Para evitar este tipo de confusiones es recomendable revisar las campanas Durham antes de proceder a la inoculación y desechar aquellos que contengan burbujas de aire ó de alguna manera eliminar éstas y así poder utilizarlos.
9. De los tubos que en esta primera lectura den positivos, ya se pueden hacer las pruebas confirmatorias para coliformes totales y coliformes fecales.

10. En caso de no apreciarse alguno o todos los cambios mencionados en el resto de los tubos, continuarán en incubación 24 horas más.

11. Después de 48 horas (± 2 h) a partir de la inoculación, se hace la lectura final.

12. Si pasadas estas 48 h tampoco se aprecia turbidez ni producción de gas, los tubos se toman como negativos.

INTERPRETACION:

- Si el total de tubos son NEGATIVOS: El examen se da por terminado, reportando la AUSENCIA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES en la muestra analizada.
- Todos aquellos tubos que den POSITIVOS para prueba presuntiva se anotarán convenientemente y se procederá a realizar la PRUEBA CONFIRMATORIA para Coliformes Totales y Fecales.

PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES TOTALES:

1. A partir de cada uno de los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva, agitándolos previamente para homogeneizar, inocular con tres asadas tubos conteniendo caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (LBVB).

2. Incubar durante 48 ± 3 h a 35 ± 0.5 °C.

3. Después de la incubación observar la presencia de turbidez y de gas.

INTERPRETACION:

- Si se observa turbidez y producción de gas: La prueba se considera POSITIVA, debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.

- Si en ninguno de los tubos se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez: Se consideran negativos, estableciéndose el Código 0,0,0 para efecto del cálculo del NMP.

PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES FECALES:

1. A partir de cada uno de los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva, agitándolos para homogeneizar, inocular con tres asadas tubos conteniendo caldo Nutritivo.

2. Incubar durante 24 horas a 44 °C (± 0.5 °C), observar presencia de turbidez y gas.

INTERPRETACION:

- Si se observa turbidez y producción de gas: La prueba se considera POSITIVA, debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.
- Si no se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez: Se reporta la AUSENCIA DE COLIFORMES FECALES.

Confirmación de *Escherichia Coli*

La confirmación de *E.Coli* se realiza siguiendo los pasos de las pruebas de IMVIC. Anotar el numero de tubos positivos (formación de gas) y expresar el resultado en referencia a la tabla del NMP.

GLOSARIO

ADITIVO ALIMENTICIO

Son cualquier sustancia o mezcla de sustancias que directa o indirectamente modifican las características físicas, químicas o biológicas de un alimento. Los aditivos deben ser inocuos por sí mismos o a través de su acción; su empleo debe justificarse por razones tecnológicas, sanitarias, nutricionales o psicosensoriales necesarias y deben responder a las exigencias que establezca el código alimentario.

AGENTES ANTIBACTERIANOS

Es la sustancia que se administra a un alimento para reducir la carga bacteriana o impedir el crecimiento de bacterias sin causarle daño.

AGENTES MICROBIANOS

Son los microorganismos de vida útil, indicadores y patógenos señalados en la disposición.

ALIMENTOS APTOS PARA CONSUMO HUMANO

Aquellos alimentos que cumplen los criterios de calidad sanitaria.

ANTÍGENOS

Es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria. Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Esto incluye partes de bacterias (cápsula, pared celular, flagelos, fimbrias, y toxinas), de virus y otros microorganismos. Los lípidos y ácidos nucleicos son antigénicos únicamente cuando se combinan con proteínas y

polisacáridos. Cada antígeno está definido por su anticuerpo, los cuales interactúan por complementariedad espacial.

ANTISÉPTICO

Es un compuesto capaz de inhibir o impedir el desarrollo bacteriano o llegar a destruir a microorganismos en tejidos vivos.

BACTERICIDA

Los agentes que destruyen o matan las bacterias .

BACTERIOSTÁTICO

Los agentes que impiden el crecimiento de bacterias .

CALIDAD SANITARIA

Es el conjunto de requisitos microbiológicos, físico-químicos y organolépticos que debe reunir un alimento para ser considerado inocuo para el consumo humano.

CARGA BACTERIANA

Número de unidades formadoras de Colonias (UFC) de bacterias presentes en un volumen (m^3) de una sustancia patrón analizado.

CEPA

En microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

CRITERIO MICROBIOLÓGICO

Es la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basado en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos por unidades de masa y volumen.

COLOIDE

Es una sustancia cuyas partículas pueden encontrarse en suspensión en un líquido, merced al equilibrio coloidal. También llamada dispersión coloidal, se basa en el tamaño de las partículas que lo forman, llamadas micelas. Poseen un tamaño bastante pequeño, tanto que no pueden verse con los mejores microscopios ópticos, aunque son mayores que las moléculas ordinarias. Las partículas que forman los sistemas coloidales tienen un tamaño comprendido entre 50 y 2.000 Å.

CONTAMINACIÓN

Es la alteración nociva del estado natural de un medio como consecuencia de la introducción de un agente totalmente ajeno a ese medio (contaminante), causando inestabilidad, desorden, daño o malestar en un ecosistema, en el medio físico o en un ser vivo. El contaminante puede ser una sustancia química, energía (como sonido, calor, o luz), o incluso genes.

CURTIDO

Tratamiento al que se someten las pieles para hacerlas impermeables y resistentes.

EMULSIÓN

Líquido que tiene en suspensión pequeñísimas partículas de sustancias insolubles en agua.

EN CANAL

Se aplica al animal destinado al consumo que está abierto y sin órganos internos, sin cabeza y sin extremidades

EXTRACCIÓN

Separación de los componentes de cualquier sustancia por el contacto con un líquido.

EXTRACTO TÁNICO

Es el producto líquido obtenido a partir de la extracción de de la *Caesalpinia Spinosa* (Tara) mediante diferentes procedimientos y con varios solventes. Esta solución es generalmente acuosa.

FLOBÁFENOS

Los flobafenos son, junto a las antocianinas, los pigmentos más importantes en plantas.

GRAM POSITIVO MICROORGANISMO

Son las bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. La envoltura celular de las bacterias Gram-positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior. La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico. La capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias y es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram. A diferencia de las Gram-negativas, las Gram-positivas no

presentan una segunda membrana lipídica externa a la pared celular y esta pared es mucho más gruesa.

GRAM NEGATIVO MICROORGANISMO

Son las bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son uno de los principales grupos de bacterias. Presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano.

HALO DE INHIBICIÓN

Zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen.

HEMOLISINA

Sustancia tóxica producida por ciertas bacterias que origina la lisis de los hematíes.

HIDRÓLISIS

Reacción química mediante la cual resultan dos nuevos compuestos a partir de una sustancia compleja mediante la adición de agua y su posterior descomposición.

INHIBICIÓN

Acción que evita el crecimiento de bacterias o de microorganismos patógenos en una determinada zona de cultivo.

INOCUIDAD

La garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y consuman de acuerdo con el uso a que se destinan.

IN VITRO

Literalmente en el vidrio (placa petri) o en el tubo de ensayo del laboratorio, investigado y manipulado fuera del organismo vivo.

IMPUTRESCIBLE

Que no se pudre fácilmente.

MACERACIÓN

Operación que consiste en sumergir un sólido vegetal en un líquido para extraer de él sus partes solubles.

MEDIO DE CULTIVO

Es una solución acuosa de diferentes compuestos que contiene todos los elementos indispensables que requieren los microorganismos para crecer.

METABOLITOS SECUNDARIOS

Compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas.

PATÓGENO

Un patógeno o agente biológico patógeno es aquel elemento o medio capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño en el cuerpo de un animal, un ser

humano o un vegetal, cuyas condiciones estén predispuestas a las ocasiones mencionadas.

PELETERÍA

Un patógeno o agente biológico patógeno es aquel elemento o medio capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño en el cuerpo de un animal, un ser humano o un vegetal, cuyas condiciones estén predispuestas a las ocasiones mencionadas.

POLIMERIZACIÓN

Proceso químico por el cual mediante el calor, la luz o un catalizador se unen varias moléculas de un compuesto para formar una cadena de múltiples eslabones de estas y obtener una macromolécula.

POLÍMERO

Son materiales de origen tanto natural como sintético, formados por moléculas de gran tamaño, conocidas como macromoléculas. Macromolécula y polímero son términos equivalentes, el primero se utiliza para referirnos a propiedades relativas a la escala molecular mientras que el segundo se emplea más para referirnos al material y sus propiedades macroscópicas.

pH

Valor que representa convencionalmente la concentración de iones de hidrógeno de una disolución acuosa.

SUSPENSION

Estado de un cuerpo cuyas partículas se mezclan con un fluido sin lograr la disolución.

TANINOS

Compuestos polifenólicos elaborados en el interior de las plantas principalmente herbáceas y leñosas, formados por carbono, hidrógeno y oxígeno, al aplicarse en pieles las convierten en cueros, en que le confiere una función protectora.

TOXINA

Son sustancias creadas por plantas y animales que son venenosas para los seres humanos. La mayoría de las toxinas que causan problemas en humanos son secretadas por microorganismos como bacterias.

TOXIINFECCIONES

Se designa con este término una gastroenteritis aguda provocada por la contaminación bacteriana de los alimentos o las bebidas. Se trata de una toxemia más que de una infección bacteriana. Existen dos formas distintas, con diferente origen pero con el mismo cuadro clínico. Tales son la *forma infecciosa*, en que la bacteria se multiplican en el alimento contaminado y elaboran sus toxinas al pasar al intestino, y la *forma tóxica*, en que las toxinas son elaboradas en el alimento antes de ser ingerido y la bacteria no se multiplican en el organismo. Ambas formas se caracterizan por vómitos violentos y diarrea, acompañados de postración grave e incluso profunda.

VASOCONSTRICCIÓN

Es la constricción o estrechamiento de un vaso sanguíneo. Cuando un vaso sanguíneo se constriñe, se produce una restricción o disminución del flujo sanguíneo