



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ingeniería Química

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral,
para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ingeniería Química

Inhibición de bacterias del género *Leuconostoc* a partir del uso de
extractos vegetales naturales

Ing. Mónica Andrea Serra

Tesis desarrollada en la Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional San
Francisco y en el Instituto de Lactología Industrial (Universidad Nacional del Litoral –
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)



I N L A I N



Directora: Dra. Alfonsina Ester Andreatta

Codirectora: Dra. Andrea del Luján Quiberoni

Miembros del Jurado de la Tesis:

Dra. Analía Graciela Abraham

Dr. Carlos Carrara

Dra. Marcela Raquel Longhi

Año de presentación: 2021

Dedicatoria

A vos mamá por tu apoyo incondicional para poder realizar mis sueños y enseñarme que con esfuerzo se llegan a cumplir los proyectos. Mi admiración hacia vos!!!

A Uds. papá y Miki, donde quiera que el universo los refugie, siento que siempre están a mi lado y aunque nos faltaron vivir muchas cosas juntos, sé que este momento lo están disfrutando tanto como yo.

A mis hijos, Agustín, Ignacio y Carolina, por permitirme dedicar el tiempo necesario para escribir este texto, por ser mi principal motivación para terminar lo que comencé hace mucho tiempo.

A mis hermanos, Fernando y Gustavo, por estar siempre presentes.

A Hernán, Caty, M. Susana y Clemar por formar parte de mi vida y por enseñarme que se puede seguir avanzando, día a día.

A Raquel, por ser una gran amiga, mi sostén, por estar siempre acompañándome.

A mis abuelos, por ser mis guías y mis maestros.

A toda mi gran familia y mis amigos.

¡¡¡¡Eternamente agradecida!!!!

Agradecimientos

A mi directora, Dra. Alfonsina Andreatta, y a mi codirectora, Dra. Andrea Quiberoni, por haberme brindado ánimo y ayuda constante, por sus valiosos aportes, por estar siempre presentes con sus sugerencias. Además, por la confianza, la paciencia y, sobre todo, por la oportunidad que me dieron.

A la Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional San Francisco; a sus autoridades, **Ing. Alberto Toloza, Ing. Gabriel Cerutti, Ing. Javier Saldarini** por el apoyo institucional y por permitirme utilizar su infraestructura; muy agradecida por la confianza puesta en mí.

A Ing. Daniel Altina, por haber sido el nexo para comenzar con mi beca doctoral que me permitió descubrir el apasionante mundo de la investigación.

A Msc. Bioq. Jorge Garnero, por su predisposición siempre, por cederme desinteresadamente la cepa para mi estudio, por todos sus aportes y enseñanzas.

A mis compañeros Dr. Matías Raspo y Dra. María Belén Vignola por sus enseñanzas, su colaboración y apoyo constante.

A Dra. Daniela Guglielmotti, por transmitirme sus conocimientos, por sus acertados consejos, por sus valiosos y desinteresados aportes sobre microbiología y en especial, sobre *Leuconostoc mesenteroides*.

A los **Miembros del Jurado** por la disposición e interés para participar en la evaluación de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio **Belu L., Mica S., Mica P., Nico F., Flor P., Andrés T., Guille L., Yaz T.**, por su inmensa colaboración en la tarea diaria, por el ánimo y apoyo constante.

A **Raquel, Ana, Olga, Armando y Andrés**, por ser incondicionales hacia mí y mis hijos en esta etapa.

A **Msc. Ing. Susana Garnero, Dra. Anahí Pavese, Dra. Verónica Nicolau**, por su predisposición y colaboración en todo momento.

A **Ing. Fernando Barbero y Bioq. Nicolás De Rossi**, por la información sobre sabores y los productos brindados para la prueba en el alimento.

A **Vanina G., Paula G., Carlos S., Melisa P., Lina G. Sara R., Paula S., Federico P., Giuli B., Lucila F.** por compartir los cursos de posgrado en la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme su amistad, por el compañerismo que me brindaron y por compartir momentos inolvidables.

A **Lucas B., Gustavo Y., Leo P., Lucio C.**, por compartir los viajes a Santa Fe, con muchísimas anécdotas y hacer más llevadera esa etapa.

A mis compañeros de **LARes** y a **Mica Z.** por alentarme siempre y estar pendientes de mis avances.

Gracias a todos los que de alguna manera estuvieron presentes e hicieron posible este trabajo.

¡¡Muchas gracias!!

Mónica

Resumen

El tema de la presente tesis surge como una necesidad de una Empresa de nuestra zona de influencia (San Francisco, provincia de Córdoba, República Argentina), en la cual se elaboran salchichas tipo Viena, envasadas al vacío. Hace un tiempo, estos envases comenzaron a presentar alteraciones, tales como, hinchazón y formación de exudado lechoso, a partir de dos a tres semanas de almacenamiento bajo refrigeración. Luego de realizar un estudio teórico del tema, se aislaron bacterias de la superficie de las salchichas, y se procedió a la tipificación biológica y bioquímica de una de ellas que confirmó el género y la especie, *Leuconostoc mesenteroides*. Como es una cepa silvestre, se le ha dado el nombre de *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

Para inhibir la cepa mencionada, se han llevado a cabo ensayos de sensibilidad microbiana con diferentes extractos y aceites esenciales. Se obtuvieron diferentes extractos naturales a través de las técnicas de hidrodestilación, arrastre con vapor de agua, extracción asistida por microondas y extracción asistida por ultrasonido. También se han evaluado aceites esenciales comerciales, compuestos puros presentes en el reino vegetal y soluciones. De este estudio se ha encontrado que los aceites esenciales obtenidos de la cáscara de limón (*Citrus lemon*); de las hojas de: burro (*Aloysia polystachya*), eucalipto (*Eucalytus cinerea*) y laurel (*Laurus nobilis*); y el compuesto puro L-carvona, pueden ser utilizados como potenciales inhibidores de *Leuconostoc mesenteroides* MS1. En una etapa posterior, se obtuvieron las concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas de estos aceites esenciales y del compuesto puro L-carvona, frente a la cepa mencionada, utilizando el método de macrodilución en caldo. Por último, se realizaron pruebas en la matriz alimentaria, utilizando los aceites esenciales de *Aloysia polystachya*, *Eucalyptus cinerea* y *Laurus nobilis* y el compuesto puro L-carvona. Por un lado, se utilizaron salchichas esterilizadas, en las mismas condiciones que el medio de cultivo; y en otras pruebas se utilizaron salchichas provistas por la Empresa. En las primeras se utilizó un inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y se realizó el recuento de células bacterianas viables a 0, 2, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días; en las segundas se trabajó con la microbiota natural

del producto y se realizó el recuento de células bacterianas viables a 0, 2, 7, 14 y 21 días.

Como trabajo a futuro, se propone estudiar la toxicidad en humanos y las aptitudes sensoriales, de los aceites esenciales y del compuesto puro mencionados en el párrafo anterior, para poder utilizarlos en salchichas tipo Viena como aditivos. También se investigará la forma de adicionarlo a las salchichas para lograr la mejor actividad antimicrobiana.

Abstract

The subject of this thesis arises as a need for a company in our area of influence (San Francisco, Córdoba province, Argentine Republic), in which Vienna sausages are made, vacuum packed. Some time ago, these containers began to show changes, such as swelling and the formation of ropy exudate, after two to three weeks of storage under refrigeration. After carrying out a theoretical study of the subject, bacteria were isolated from the surface of the sausages, and one of them was biologically and biochemically typed, which confirmed the genus and species, *Leuconostoc mesenteroides*. As it is a wild strain, it has been given the name *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

To inhibit the mentioned strain, microbial sensitivity tests have been carried out with different extracts and essential oils. Different natural extracts were obtained through hydrodistillation, steam stripping, microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction techniques. Commercial essential oils, pure compounds present in the plant kingdom and solutions have also been evaluated. From this study it has been found that essential oils obtained from lemon peel (*Citrus lemon*); from the leaves of: burro (*Aloysia polystachya*), eucalyptus (*Eucalyptus cinerea*) and laurel (*Laurus nobilis*); and the pure compound L-carvone, can be used as potential inhibitors of *Leuconostoc mesenteroides* MS1. In a later stage, the minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations of these essential oils and of the pure compound L-carvone were obtained, against the mentioned strain, using the macrodilution method in broth. Finally, tests were carried out on the food matrix, using the essential oils of *Aloysia polystachya*, *Eucalyptus cinerea* and *Laurus nobilis* and the pure compound L-carvone. On one hand, sterilized sausages, under the same conditions as the culture medium, were used; and in other tests, sausages provided by the Company were used. In the first, an inoculum of *Leuconostoc mesenteroides* MS1 was used and the viable bacterial cells were counted at 0, 2, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days; in the second, the natural microbiota of the product was used and the viable bacterial cells were counted at 0, 2, 7, 14 and 21 days.

As work in the future, it is proposed to study the toxicity in humans and the sensory aptitudes, of the essential oils and the pure compound mentioned in the

previous paragraph, to be able to use them in Vienna sausages as additives. The way to add it to sausages to achieve the best antimicrobial activity will also be investigated.

Índice de contenidos

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	7
ÍNDICE DE CONTENIDOS	10
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	15
Tablas.....	15
Figuras	16
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	18
Sustancias químicas.....	22
CAPITULO I.....	23
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	23
CAPÍTULO II.....	29
2. MARCO TEÓRICO DE ACEITES ESENCIALES.....	29
2.1 Introducción.....	29
2.2 Aceites esenciales.....	29
2.2.1 Composición química	32
2.2.1.1 Terpenos	36
2.2.1.2 Fenilpropanoides (Alil fenoles).....	36
2.2.1.3 Otros componentes	37
2.2.2 Variabilidad de los AE	38
2.2.3 Uso de aceites esenciales	39
2.2.4 Métodos de obtención de aceites esenciales	42
2.2.4.1 Métodos convencionales de extracción de aceite esencial	42
2.2.4.2 Nuevos métodos de extracción "verdes"	44
2.2.5 Preparación del material vegetal	47
2.2.6 Rendimiento de las extracciones	49
2.2.7 Determinación de la composición química de los aceites esenciales	51
2.3 Aditivos en alimentos	53
2.3.1 Desafíos para la aplicación de antimicrobianos naturales	55
2.3.1.1 Situación regulatoria.....	55
2.3.1.2 Efectos toxicológicos y alergénicos	56

2.3.1.3 Costos	57
2.3.1.4 Efectos sensoriales.....	57
2.3.1.5 Interacciones de los componentes alimentarios	58
2.4 Conclusiones	59
CAPÍTULO III.....	61
3. MARCO TEÓRICO DE SALCHICHAS TIPO VIENA	61
3.1 Introducción.....	61
3.2 Salchichas tipo Viena.....	61
3.2.1 Definición	64
3.2.2 Proceso de elaboración de salchichas	64
3.2.3 Marco regulatorio	66
3.2.4 Microbiota natural	71
3.2.4.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	74
3.2.4.2 Aislamiento, purificación y tipificación.....	77
3.2.5 Industria frigorífica	78
3.3 Conclusiones	79
CAPÍTULO IV.....	80
4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NATURALES	80
4.1 Introducción.....	80
4.2 Preparación del material vegetal.....	80
4.3 Obtención de extractos naturales.....	80
4.3.1 Arrastre con vapor de agua	82
4.3.2 Extracción asistida por microondas	85
4.3.3 Extracción asistida por ultrasonido	85
4.4 Rendimiento de las extracciones.....	86
4.5 Contenido de polifenoles.....	87
4.6 Aceites esenciales comerciales.....	88
4.7 Conclusiones	89
CAPÍTULO V.....	90

5. LEUCONOSTOC MESENTEROIDES MS1 Y MICROBIOTA NATURAL EN SALCHICHAS TIPO VIENA.....	90
5.1 Introducción.....	90
5.2 Materiales y métodos	90
5.2.1 Aislamiento, purificación y tipificación de la cepa silvestre causante del deterioro	90
5.2.1.1 Tipificación bioquímica	91
5.2.1.2 Tipificación molecular	95
5.3 Microbiota natural de salchichas tipo Viena	96
5.3.1 Diluciones decimales	96
5.3.2 Recuento en superficie	97
5.3.3 Recuento en muestras de salchichas tipo Viena	99
5.3.3.1 Prueba de catalasa.....	100
5.4 Resultados y discusión	101
5.4.1 Tipificación de la cepa silvestre causante del deterioro	101
5.4.2 Microbiota natural de salchichas tipo Viena	102
5.4.3 Recuento en muestras de salchichas tipo Viena	102
5.5 Conclusiones	105
CAPÍTULO VI.....	107
6. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE LEUCONOSTOC MESENTEROIDES MS1	107
6.1 Introducción.....	107
6.2 Medición de la actividad antimicrobiana.....	107
6.2.1 Pruebas <i>in vitro</i> para evaluar la actividad antimicrobiana	109
6.2.1.1 Pruebas de difusión en agar	110
6.2.1.2 Preparación del inóculo	111
6.2.2 Trabajo experimental	112
6.2.3 Pruebas de sensibilidad	113
6.2.4 Análisis estadísticos de los datos de la prueba de difusión en agar	124
6.3 Conclusiones	127
CAPITULO VII.....	128
7. CARACTERIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y DETERMINACIÓN DE CIM Y CBM	128
7.1 Introducción.....	128

7.2	Macrodilución en caldo.....	128
7.2.1.1	Emulsión del aceite esencial con agua.....	130
7.2.1.2	Trabajo experimental.....	133
7.3	Cualidades del material vegetal y del compuesto L-carvona.....	135
7.3.1	<i>Aloysia polystachya</i>	135
7.3.2	<i>Eucaliptus cinerea</i>	137
7.3.3	<i>Laurus nobilis</i>	138
7.3.4	<i>Citrus lemon</i>	139
7.3.5	Carvona.....	141
7.4	Marco regulatorio de los aceites esenciales estudiados y del compuesto L-carvona.....	142
7.5	Caracterización de los AE.....	144
7.6	Conclusiones.....	146
CAPITULO VIII.....		148
8.	PRUEBA, EN LA MATRIZ ALIMENTARIA, DE LOS EXTRACTOS Y APLICACIÓN INDUSTRIAL.....	148
8.1	Introducción.....	148
8.2	Métodos de aplicación de los AE en alimentos.....	149
8.3	Matriz alimentaria.....	153
8.3.1	Recuento de células viables en muestras esterilizadas e inoculadas con <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MS1.....	153
8.3.1.1	Cultivo <i>overnight</i>	154
8.3.2	Recuento de células viables en muestras de salchichas sin esterilizar.....	161
8.4	Ejemplos de aplicación de aceites esenciales en salchichas.....	165
8.5	Ejemplos de aplicación de aceites esenciales contra <i>Leuconostoc mesenteroides</i>.....	167
8.6	Ejemplos de aplicación de conservantes químicos y bacteriocinas contra <i>Leuconostoc mesenteroides</i>.....	169
8.7	Conclusiones.....	170
CAPÍTULO IX.....		172
9.	CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO.....	172

9.1 Conclusiones generales	172
9.2 Trabajo a futuro	174
ANEXO I.....	176
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179

Índice de Tablas y Figuras

Tablas

Tabla 2.1. Los componentes químicos principales en aceites esenciales.....	34
Tabla 3.1. Criterios de aceptación microbiológica de los chacinados embutidos cocidos.....	68
Tabla 3.2. Resultados de los ensayos microbiológicos de salchichas tipo Viena.....	70
Tabla 3.3. Resultados de los análisis fisicoquímicos a salchichas tipo Viena. .	70
Tabla 4.1. Ejemplos del rango de rendimientos de diversos aceites esenciales obtenidos y comparados con diferentes autores.	87
Tabla 5.1. Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a cepa en estudio.	101
Tabla 5.2. Resumen de colonias obtenidas de la siembra de salchichas tipo Viena.....	104
Tabla 6.1. Controles positivos y negativos frente a <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MS1.....	115
Tabla 6.2. Extractos naturales, soluciones de compuestos puros, compuestos puros y aceites esenciales comerciales sin efecto bactericida frente a <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MS1.	116
Tabla 6.3. Contenido de polifenoles totales en extractos provenientes de semillas.	118
Tabla 6.4. Antimicrobianos con efecto bactericida frente a <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MS1.	120
Tabla 6.5 Resumen del modelo de análisis de la varianza respecto a las masas de extracto adicionadas	125
Tabla 6.6 Resumen del modelo de análisis de la varianza respecto a los diámetros de los halos de inhibición.....	125
Tabla 6.7 Resultados de prueba Dunnet, brindada por R Studio	126
Tabla 6.8 Resultados del método Tukey, brindada por R Studio	126
Tabla 7.1 Rango de concentraciones utilizadas de los AE de <i>Aloysia polystachya</i> , <i>Eucaliptus cinerea</i> , <i>Laurus nobilis</i> , <i>Citrus lemon</i> y el compuesto puro L-carvona	134
Tabla 7.2. Valores promedios en µg/mL, con su desviación estándar, de CIM y CBM de los AE de <i>Aloysia polystachya</i> , <i>Eucaliptus cinerea</i> , <i>Laurus nobilis</i> , <i>Citrus lemon</i> y del compuesto puro L-carvona, frente a <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MS1.....	134
Tabla 7.3. Cantidades de aceites esenciales o de compuestos, testeadas por otros autores, contra <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	135
Tabla 7.4. Composición porcentual de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus cinerea</i> y <i>Laurus nobilis</i> mediante GC-MS.	145
Tabla 7.5 Principales componentes del aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i> , reportados en bibliografía.....	146
Tabla 7.6. Composición porcentual de los aceites esenciales de <i>Citrus lemon</i> y <i>Aloysia polystachya</i> mediante GC-MS.	146

Tabla 8.1. Comparación entre los valores de UFC/g de la salchicha inoculada con <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MS1 sin adición de antimicrobiano (AM) y con adición de los AE y el compuesto puro.	158
Tabla 8.2. Recuentos de BAL, en agar MRS, en las muestras de salchichas tipo Viena con y sin ácido láctico, con la adición de L-carvona o AE de <i>Aloysia polystachya</i> por aspersion.....	164

Figuras

Fig. 2.1. Unidad de isopreno C ₅	33
Fig. 2.2. Patrón general de biosíntesis de metabolitos secundarios.....	35
Fig. 3.1. Esquema general del proceso de elaboración de salchichas tipo Viena.	66
Fig. 4.1. Imagen de hojas de <i>Eucaliptus tereticornis</i> , antes y después del picado.	81
Fig. 4.2. Recipiente con cáscara de limón (<i>Citrus lemon</i>) picada para proceder a la extracción de AE.	81
Fig. 4.3. Equipo de arrastre con vapor de agua, para extracción de AE.	83
Fig. 4.4. Equipo de extracción de AE marca Figmay. La imagen de la izquierda muestra el extractor en funcionamiento en el laboratorio. En la imagen de la derecha se aprecia el esquema del equipo, del manual de usuario.....	84
Fig. 4.5. Recolección de AE obtenido en equipo de arrastre con vapor (imagen izquierda) y en equipo marca Figmay (imagen derecha).	85
Fig. 4.6. Recipiente para conservar los AE, con el rótulo del grupo de investigación.....	86
Fig. 5.1. Esquema de la realización de diluciones decimales y siembra en superficie.....	99
Fig. 5.2. Bolsa estéril conteniendo una muestra de salchicha con agua peptonada.	100
Fig. 5.3. Vista de las diferentes colonias en la placa de Petri.....	103
Fig. 5.4. Imágenes de la colonia (1) en microscopio de contraste de fases. .	103
Fig. 5.5. Imagen de la colonia (2) en microscopio de contraste de fases.....	104
Fig. 5.6. Formación de CO ₂ , en caldo MRS con campana Dürham invertida, a partir de la siembra de colonias (1) y (2).	105
Fig. 6.1. Representación esquemática de los pasos de las pruebas de sensibilidad.....	113
Fig. 6.2 Halos de inhibición de <i>E. cinerea</i>	121
Fig. 6.3 Halos de inhibición de hidroquinona.....	122
Fig. 6.4 Sin formación de halos de inhibición, para el caso de limoneno	122
Fig. 6.5 Comparación entre los halos de inhibición para el antibiótico Gatifloxacina, y las diferentes cantidades de antimicrobiano adicionado al disco de papel.	122
Fig. 6.6. Comparación entre los diámetros de inhibición con la cantidad de extracto, para los AE de <i>A. polystachya</i> , <i>E. cinerea</i> , <i>L. nobilis</i> , <i>C. lemon</i> , y el antibiótico Gatifloxacina.	123

Fig. 6.7. Comparación entre los diámetros de inhibición con la cantidad de extracto, para diferentes concentraciones de eugenol/aceite de girasol y el antibiótico Gatifloxacina.	124
Fig. 7.1. Esquema de la técnica de macrodilución en caldo.	130
Fig. 7.2. Planta de <i>Aloysia polystachya</i> en floración.	136
Fig. 7.3. Hojas secas de <i>Eucalyptus cinerea</i>	138
Fig. 7.4. Hojas secas de <i>Laurus nobilis</i>	139
Fig. 7.5. Molécula de D-carvona y L-carvona.	141
Fig. 8.1. Métodos de aplicación de un AE en alimentos.	150
Fig. 8.2. Preparación de las muestras con diferentes tratamientos.	155
Fig. 8.3. Placas de Petri conteniendo las muestras de cada tratamiento.	156
Fig. 8.4. Recuento en placa de diluciones decimales de diferentes muestras de salchichas estériles inoculadas. Las placas superiores contienen 0.5 mL de L-carvona, y las placas inferiores carecen de antimicrobiano.	156
Fig. 8.5. Comparación entre los valores de UFC/g de la salchicha inoculada con <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MS1 sin adición de antimicrobiano y con adición de 0.1 mL de AE de <i>Aloysia polystachya</i> o 0.1 mL de L-carvona.	159
Fig. 8.6. Comparación entre los valores de UFC/g de la salchicha inoculada con <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MS1 sin adición de antimicrobiano y con adición de 0.5 mL de AE de <i>Aloysia polystachya</i> , 0.7 mL de AE de <i>Aloysia polystachya</i> o 0.5 mL de L-carvona.	160
Fig. 8.7. Comparación entre los valores de UFC/g de la salchicha inoculada con <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MS1 sin adición de antimicrobiano y con adición de 0.5 mL de AE de <i>Laurus nobilis</i> o 0.5 mL de AE de <i>Eucalyptus cinerea</i>	161
Fig. 8.8. Envase spray para agregar, por aspersion, el AE de <i>Aloysia polystachya</i> y L-carvona.	163
Fig. 8.9. Comparación de los valores UFC/g de BAL de las diferentes muestras de salchichas analizadas, en agar MRS.	164

Abreviaturas y símbolos

<u>Sigla</u>	<u>Significado</u>
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
µg	Microgramo
A	Ampere
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Aceite esencial
AGD	Aceitera General Deheza
AM	Antimicrobiano
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANOVA	Análisis de la Varianza (ANalysis Of VAriance)
APHA	Asociación Americana de Salud Pública (American Public Health Association)
art.	Artículo
ATCC	Colección Americana de Cultivos (American Type Culture Collection)
a_w	actividad acuosa (activity water)
BAL	Bacterias ácido lácticas
BAM	Manual analítico bacteriológico (Bacteriological Analytical Manual)
bp	pares de bases (base pairs)
CAA	Código Alimentario Argentino
Cl	Cloro
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute)
cm	Centímetros
CBM	Concentración mínima bactericida

CIM	Concentración mínima inhibitoria
CoE	Consejo de Europa
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
D	Dextrógiro
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DL50	Dosis letal media
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	y otros (y colaboradores)
EUCAST	Comité Europeo sobre Ensayos de Susceptibilidad Antimicrobiana (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
Fac.	Facultad
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization)
Farm.	Farmacopea
FCC	Federal Communications Commission
FCC	Código de productos químicos alimentarios (Food Chemical Codex)
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration)
FEMA	Asociación de Fabricantes de Sabores y Extractos (Flavor Extract Manufacturers Association)
FID	Detector de ionización de llama
FSIS	Food Safety and Inspection Service
g	Gramo
GC	Cromatografía gaseosa
GC-MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
GMC	Grupo Mercado Común
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
h	Horas
HLB	Balance Hidrófilo – Lipófilo

ICMSF	Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (International Commission on Microbiological Specifications for Foods)
INLAIN	Instituto de Lactología Industrial
IOFI	Organización Internacional de Industrias de Sabores (International Organization of the Flavor Industries)
IRAM	Instituto Argentino de Normalización y Certificación
ISO	Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization)
kg	Kilogramo
L	Levógiro
Log	Logaritmo decimal
m	Metro
MAP	Envasado en atmósfera modificada (Modified Atmosphere Packaging)
máx	Máximo
Mercosur	Mercado Común del Sur
mg	Miligramo
min	Minutos
mín	Mínimo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPa	Mega Pascal
MRS	Man Rogosa and Sharpe
ms	Material seco
MS	Espectrometría de masas
nd	no detectado
N°	Número
Nac.	Nacional
NIST	Instuto Nacional de Normas y Tecnología (National Institute of Standards and Technology)
nM	Nanomolar

NMP	Número más probable
OMS	Organización Mundial de la Salud
O/W	oil/water
PCR	Polymerasa chain reaction
PE	Perkin Elmer
PEN	Poder Ejecutivo Nacional
pH	Potencial hidrógeno
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
psi	Libra por pulgada cuadrada (Pound-force per Square Inch)
p/p	peso/peso
p/v	peso/volumen
R	Resistente
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
RDA	Ruptura tipo retro Diels – Alder
Reg.	Regional
S.A.	Sociedad Anónima
SAGPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
SAGyP	Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca
SAV	Secretaría de Agregado de Valor
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
spp.	Especies
SPReI	Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos
SPyRS	Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias
TCD	Detector de conductividad eléctrica
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNL	Universidad Nacional del Litoral
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture)
UTN	Universidad Tecnológica Nacional

v/v	volumen en volumen
vol	Volumen
W	Watt
W/O	water/oil

Sustancias químicas

<u>Fórmula química</u>	<u>Nombre del compuesto</u>
CaCl ₂	Cloruro de calcio
NaClO	Hipoclorito de sodio
NaNO ₂	Nitrito de sodio
Na ₂ SO ₃	Sulfito de sodio
(NH ₄) ₃ PO ₄	Fosfato de amonio
NaCl	Cloruro de sodio

Capítulo I

1. Introducción y objetivos

Las causas de la pérdida de cualidades adecuadas en un alimento, pueden ser daños físicos, reacciones químicas, infestación de insectos y roedores y crecimiento microbiano. A pesar de las cadenas de refrigeración, los conservantes químicos y la aplicación de técnicas recientes, se ha estimado que el 25 % de todos los alimentos producidos a nivel mundial se desperdicia después de la cosecha o después del sacrificio debido al deterioro microbiano, por lo que esta es, en realidad, la causa más común de alteraciones en calidad de los alimentos. Comparada con multitud de alimentos, la carne representa uno de los más perecederos: primero, por la presencia de actividades químicas y enzimáticas, y segundo, porque constituye un pábulo perfecto para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, especialmente como resultado de su composición de nutrientes, alto contenido de agua y pH moderado. El crecimiento microbiano, la oxidación y la autólisis enzimática son los tres mecanismos básicos responsables del deterioro de la carne. Además de la oxidación de los lípidos y las reacciones enzimáticas, el deterioro de la carne casi siempre es causado por el crecimiento microbiano. La descomposición de grasas, proteínas y carbohidratos en la carne da como resultado el desarrollo de malos olores, sabores y formación de limo, que determinan la carne desagradable para el consumo humano. La comunidad científica se interesó en la microbiología de la carne cuando los productos cárnicos comenzaron a enviarse a largas distancias y cuando la expansión de los supermercados en la década de 1950 cambió los hábitos de los consumidores. Hoy en día, los productos se han dirigido desde los mercados locales al comercio internacional y los productos cárnicos listos para consumir se han convertido, de manera inequívoca, en parte de las dietas modernas. Esta nueva cultura alimentaria requiere que se garanticen altos estándares de calidad y seguridad alimentaria durante toda la vida comercial del producto, con estrictos requisitos adicionales a cumplir para ser aceptado para el comercio internacional. La estabilidad de las características de la carne se convierte en el primer paso esencial para que los productores de alimentos eviten modificaciones indeseables durante el período de almacenamiento (Lulietto et al., 2015).

Los microorganismos están presentes en todo el suministro de alimentos y pueden contaminarlos de diversas maneras, incluso a nivel de la granja, como la manipulación por parte de los trabajadores, el procesamiento, el almacenamiento y la distribución de los alimentos; agua de lavado y contaminación cruzada de otros alimentos. Estos microorganismos plantean dos problemas importantes para el suministro de alimentos: el riesgo para la salud humana de las enfermedades transmitidas por los alimentos y el perjuicio económico asociado con la pérdida de alimentos debido al deterioro (Davidson et al., 2014).

Como complemento al párrafo anterior, podemos mencionar que el deterioro de los alimentos puede ocurrir tanto en los mercados mayoristas o minoristas, como en el hogar del consumidor. Cabe aclarar, que un alimento está deteriorado cuando pierde las características organolépticas deseables apreciadas por el consumidor, tales como el olor, sabor, color y/o textura característicos del mismo. Los alimentos deteriorados, generalmente, se consideran no aptos para el consumo humano, por lo que todo deterioro prematuro (previo a la fecha de caducidad) representa forzosamente pérdidas económicas para las empresas productoras de alimentos, además del desprestigio y demérito de la marca afectada (Ceja Farias et al., 2018).

Se han utilizado diversas estrategias para reducir el crecimiento microbiano en productos cárnicos procesados, incluida la adición de conservantes y el uso de atmósferas modificadas y bajas temperaturas. Sin embargo, es necesario minimizar la contaminación microbiana durante el proceso de producción, al mejorar la calidad de las materias primas y mantener buenas prácticas de fabricación para lograr una larga vida útil de los alimentos (Padilla-Frausto et al., 2015).

El envasado de carne al vacío o en atmósfera modificada con CO₂ ha dado como resultado una vida útil más prolongada en comparación con las condiciones de envasado tradicionales. El uso de CO₂ y N₂ extiende la fase de latencia de los microorganismos aeróbicos y promueve el crecimiento de especies anaeróbicas facultativas y estrictas. Este cambio en las condiciones de empaque determina un cambio de bacterias aerobias, como *Pseudomonas* spp., a especies anaerobias facultativas, como *Brochotrix thermosphacta* y bacterias ácido lácticas (BAL). Las BAL son la microbiota predominante de los productos

envasados al vacío o en atmósfera modificada con CO₂ y representan, también, las principales causantes de deterioro. De hecho, la combinación de condiciones microaerofílicas y una a_w reducida inhibe las bacterias de deterioro Gram negativas y favorece la proliferación de BAL (Lulietto et al., 2015).

Para ayudar a garantizar la seguridad microbiológica de los alimentos, el uso de antimicrobianos es útil para reducir las pérdidas de alimentos causadas por el deterioro microbiano. Cabe mencionar, que los antimicrobianos son compuestos químicos que están presentes de forma natural o se agregan a los alimentos, envases, superficies de contacto con alimentos o entornos de procesamiento para inhibir o inactivar los microorganismos patógenos y de descomposición (Davidson et al., 2014).

La aplicación de extractos de productos naturales como antimicrobianos, recibe un particular interés por los “green consumers” principalmente porque representan una alternativa a los conservantes alimentarios comunes de síntesis química y porque son productos con menor impacto ambiental (Burt, 2004; Settanni et al., 2012). Además, la resistencia de las bacterias patógenas a los clásicos conservantes y la reducción del contenido de sal en la elaboración de alimentos, determinan un alto interés en contar con agentes microbianos alternativos (Burt, 2004).

Diferentes estudios se han realizado en el establecimiento industrial que originó este estudio, con el fin de encontrar un inhibidor para el deterioro cárnico ocurrido específicamente en salchichas tipo Viena envasadas al vacío. En este sentido, han ensayado humos líquidos obtenidos de maderas duras, sobrenadantes de cultivos de bacterias lácticas conteniendo bacteriocinas, agentes inhibitorios comerciales de composición no informada por el proveedor y bacterias lácticas comerciales. Sobre los productos elaborados se evaluó la capacidad de conservación en condiciones de almacenamiento bajo refrigeración (0 °C – 5 °C), con recuento de bacterias ácido lácticas, en medio de cultivo MRS, en forma semanal. También han investigado que extractos de semillas de pomelo habían funcionado en otras empresas del mismo rubro.

Actualmente, la Empresa adiciona por aspersion ácido láctico previo al envasado al vacío. No fueron precisadas las concentraciones ni las cantidades utilizadas del mismo.

En este sentido, el objetivo general de la presente tesis, se enmarca en evaluar la inhibición microbiana de alterantes, en salchichas tipo Viena, con el uso de extractos vegetales naturales y así encontrar un antimicrobiano natural para resolver el problema de la Empresa.

Para el caso particular de salchichas tipo Viena, el crecimiento de estos alterantes se manifiesta en el envasado al vacío a partir de 2 – 3 semanas de almacenamiento bajo refrigeración (0 °C – 5 °C). Los primeros estudios sugieren que la alteración es producida por bacterias del género *Leuconostoc* que crecen en condiciones anaerobias con formación de gas, lo que provoca el hinchamiento de los envases que contiene el producto.

Para el desarrollo del objetivo general se propone completar los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Realizar un marco teórico de este estudio.
- ✓ Obtener extractos naturales de diversos materiales vegetales.
- ✓ Aislar, purificar, tipificar e identificar la cepa silvestre causante de deterioro en salchichas tipo Viena.
- ✓ Determinar, mediante ensayos de sensibilidad antimicrobiana, los extractos naturales con mayor capacidad inhibitoria en pruebas *in vitro*.
- ✓ Determinar la composición química de los extractos naturales que dieron los mejores resultados en las pruebas de sensibilidad.
- ✓ Establecer la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la concentración mínima bactericida (CBM) de los extractos naturales con mayor capacidad inhibitoria en pruebas *in vitro*.
- ✓ Analizar el comportamiento en salchichas tipo Viena, esterilizadas e inoculadas con la cepa en estudio, frente a la CIM y CBM de los extractos naturales utilizados en las pruebas *in vitro*.
- ✓ Realizar las pruebas en las salchichas tipo Viena, con su microbiota natural, frente a los extractos naturales estudiados *in vitro*.
- ✓ Enunciar las conclusiones y trabajos a futuro.

A continuación, se detalla, de manera resumida, la compilación de mi Tesis Doctoral con el objeto de facilitar su lectura y comprensión.

En el capítulo II se presenta un estudio del arte acerca de aceites esenciales y sus usos como aditivos alimentarios. Se definen los aceites esenciales, la composición química, la variabilidad, los usos y los métodos de obtención de los mismos. También, se explican los desafíos para la aplicación de antimicrobianos naturales, mencionando la situación regulatoria, los efectos toxicológicos y alergénicos, costos, efectos sensoriales e interacciones de los componentes alimentarios.

En el capítulo III se muestra el marco teórico sobre las salchichas tipo Viena, indicando el marco regulatorio para las mismas, tanto en su composición como en los aditivos que se pueden incorporar a este alimento, el proceso de elaboración y la microbiota natural de las salchichas. Además, se describe específicamente la especie *Leuconostoc mesenteroides*, indicando las técnicas actuales de aislamiento, purificación y tipificación de la especie estudiada, mencionando las características de su taxonomía.

En el capítulo IV se dan a conocer las condiciones utilizadas para la obtención de los extractos vegetales naturales, en nuestra investigación. También se explica la técnica utilizada para determinar el contenido de polifenoles en extractos de semillas y las especificaciones de los aceites esenciales comerciales utilizados para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

En el capítulo V se explican las técnicas utilizadas para el aislamiento, purificación y tipificación bioquímica y molecular de la cepa, provista por la Empresa, *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Además, se lleva a cabo el recuento inicial de células viables, analizando la microbiota natural de las salchichas tipo Viena.

En el capítulo VI se realizan los estudios *in vitro* de sensibilidad de los extractos obtenidos, frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Se realizan las pruebas de difusión en agar de los aceites esenciales extraídos en el laboratorio, de compuestos puros, de soluciones y de aceites esenciales comerciales; además de los controles positivos y negativos. En esta etapa se obtienen los

extractos naturales con efectos bactericidas y bacteriostáticos, frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y se realiza un estudio estadístico de los halos de inhibición comparados con los halos de los controles y de un antibiótico comercial en diferentes concentraciones.

En el capítulo VII se mencionan los extractos seleccionados para realizar las pruebas en la matriz alimentaria, se realiza su caracterización y se explican las características del material vegetal utilizado como materia prima. Además, se realizan las pruebas de dilución, específicamente macrodilución en caldo, y se determinan las concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas de los extractos utilizados frente a la cepa en estudio. También se mencionan las especificaciones de los extractos seleccionados, según el marco regulatorio que los contempla.

En el capítulo VIII se llevan a cabo las pruebas en la matriz alimentaria. Se estudia la relación entre el recuento de células bacterianas viables, en las diferentes matrices de alimento utilizadas, con los diversos tratamientos y con la variación de las cantidades de los aceites esenciales, de *Aloysia polystachya*, *Eucaliptus cinerea*, *Laurus nobilis* y del compuesto puro L-carvona, adicionados. Además, se mencionan ejemplos de aplicación industrial de aceites esenciales en alimentos y en productos cárnicos, y los conservantes químicos y bacteriocinas utilizados frente a *Leuconostoc mesenteroides*.

En el capítulo IX se mencionan las conclusiones finales y los trabajos a futuro que llevaremos a cabo.

Vale destacar que parte de este trabajo, ha sido distinguido en las Jornadas de Jóvenes Investigadores Tecnológicos (JIT) 2018, UTN Facultad Regional Rafaela, seleccionado en la posición 13 de los veinte mejores trabajos presentados.

En el Anexo I, se mencionan los proyectos que han financiado esta investigación y las publicaciones realizadas con los resultados obtenidos de nuestro estudio.

Capítulo II

2. Marco teórico de Aceites Esenciales

2.1 Introducción

En este capítulo se explican parte de los conceptos necesarios para comprender el desarrollo de la presente tesis. El marco teórico de aceites esenciales se divide en dos partes: aceites esenciales y aditivos en alimentos. En la primera parte, se definen los aceites esenciales, la composición química de los mismos, los métodos de obtención, la variabilidad en la composición y rendimiento, como así también los usos de los aceites esenciales por sus efectos biológicos y antimicrobianos. En la segunda parte, se hace un relevamiento de algunos aditivos utilizados en productos cárnicos, específicamente en salchichas tipo Viena y contra *Leuconostoc mesenteroides*, y se mencionan algunos desafíos de aplicación de antimicrobianos en productos cárnicos.

2.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son sustancias odoríferas y altamente volátiles presentes en las plantas. Debido a su volatilidad, estas sustancias pueden aislarse mediante destilación al vapor de una planta aromática de una especie botánica y pueden detectarse tanto por el olor como por el sabor. Como resultado de la alta volatilidad de los AE, estas sustancias requieren condiciones de almacenamiento exigentes, incluido el uso de depósitos herméticos y evitar la exposición a la luz (Lang et al., 2012). Los aceites esenciales individuales se conocen por el nombre de la planta de la que derivan y el olor es similar al de la parte de la planta de la que se obtienen, aunque el aroma es generalmente más intenso. Hay varias definiciones de aceites esenciales, pero la más precisa es probablemente la propuesta por Schilcher, Hegnauer, y Cohn-Riechter, que fue resumida como sigue (Sonwa, 2000): "Los aceites esenciales son productos o mezclas de productos, que se forman en el citoplasma y normalmente están presentes en forma de pequeñas gotas entre las células, son volátiles y aromáticos. Se componen de mezclas de sustancias fragantes o mezclas de sustancias fragantes e inodoras, donde una sustancia fragante se define como

un compuesto químicamente puro que es volátil en condiciones normales y que debido a su olor puede ser útil para la sociedad".

Por su parte, la Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization, ISO) ha definido los aceites esenciales como "producto obtenido de una materia prima natural de origen vegetal, por destilación al vapor, por procesos mecánicos del epicarpio de cítricos, o por destilación seca, después de la separación de la fase acuosa, si la hay, por procesos físicos, especificando que el aceite esencial puede someterse a tratamientos físicos, que no resultan en ningún cambio significativo en su composición " (International Organization for Standardization, 2021). La 7ª edición de Farmacopea Europea, está en concordancia con esta definición de ISO.

A temperatura ambiente, los aceites esenciales generalmente varían de incoloro a ligeramente amarillento cuando se destilan, con un olor aromático, muy limpio al tacto y fácilmente absorbible por la piel. Además, poseen una baja densidad, excepto en casos particulares como los aceites de canela, clavo y sasafrás, que son más densos que el agua. Tienen poca solubilidad en agua (debido a su naturaleza hidrófoba), pero son solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos comunes, incluidos el etanol y el éter dietílico, y se mezclan bien con aceites vegetales, grasas y ceras (Ríos, 2016). Además, se pueden separar de la fase acuosa por decantación. Sin embargo, sus rendimientos de extracción, que varían según la especie y los órganos, son muy bajos (alrededor del 1%) (Asbahani et al., 2015).

Se han descrito casi 3000 aceites esenciales diferentes. De estos, alrededor de 400 especies, de 67 familias de plantas, se cultivan a gran escala comercial para la producción de aceites esenciales. Las familias más importantes, desde este punto de vista, son *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae* y *Rutaceae*. Cada uno incluye más de 15 especies que producen aceites esenciales a gran escala. Otras familias de importancia son *Fabaceae*, *Rubiaceae*, *Zingiberaceae*, *Pinaceae*, *Myrtaceae*, *Piperaceae* y *Burseraceae*.

La familia *Asteraceae* presenta 1620 géneros y 23600 especies. En Argentina viven 222 géneros y 1490 especies, de las cuales 387 especies, una subespecie, 32 variedades y una forma son endémicas. El nombre del género

Aster L. proviene del término latino “aster” que significa “estrella” y que se refiere a la forma de las inflorescencias (Freire Fierro, 2004).

La familia *Lamiaceae* comprende aproximadamente 240 géneros y cerca de 7000 especies, de distribución cosmopolita, ausente en las latitudes altas. Para la Argentina la familia comprende 30 géneros y 109 especies y taxones inespecíficos, que se cultivan como hierbas medicinales o culinarias. Entre las más importantes están: *Melissa officinalis*, nativa del sur de Europa, y especies de menta y salvia (Zuloaga et al., 2018).

La familia *Apiaceae* (*Umbelliferae*) está compuesta por varias hierbas y algunos arbustos, tradicionalmente llamadas “umbelíferas”, debido a la forma similar a la sombrilla en que se presentan las inflorescencias. Está ampliamente distribuida en el mundo en regiones frías, templadas y subtropicales, con 455 géneros y alrededor de 3700 especies. En la Argentina está representada por 36 géneros y 128 especies, 89 nativas, 20 endémicas y 19 naturalizadas. Muchas especies de la familia tienen importancia económica. Dentro de esta familia se encuentran, por ejemplo, eneldo, cilantro y perejil (Zuloaga et al., 2018).

La familia *Rutaceae* agrupa alrededor de 160 géneros y 1600 especies. Son plantas leñosas, raramente herbáceas, provistas de glándulas secretoras odoríferas. Dentro de esta familia, se encuentra el género *Citrus*, con numerosas especies de gran importancia económica por la producción de frutos muy valiosos utilizados en todo el mundo (Gómez Carrion, 2020).

En muchos casos, los aceites esenciales se almacenan en células no diferenciadas (*Lauraceae*) u órganos secretados, como pelos glandulares (*Lamiaceae* y *Asteraceae*), conductos secretores (esquizogénicos en *Myrtaceae* y esquizolisinos en *Rutaceae*), o cavidades (coníferas). A veces, el aceite esencial no se forma en la planta en sí, sino que se produce por hidrólisis de algunos compuestos presentes en la planta, como es el caso de la valeriana o el ajo (Ríos, 2016).

Con respecto a su localización, los aceites esenciales se pueden formar en todas las partes de la planta, incluidas las partes aéreas, generalmente compuestas de flores (jasmín, rosa, violeta y lavanda), hojas y tallos (manzanilla, menta, eucalipto, salvia); corteza (canela); frutas (anís); semillas (nuez moscada); así como en la raíz y los rizomas (cúrcuma y jengibre) (Ríos, 2016).

El papel de los aceites esenciales en una planta determinada varía: en algunos casos se usan para la polinización, en otros casos se emplean como mecanismo de defensa, a menudo como repelente o irritante (Ríos, 2016).

2.2.1 Composición química

Los aceites esenciales generalmente se forman como metabolitos secundarios, alcanzando un peso molecular menor a 300 (Ríos, 2016). Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas que, a diferencia de los primarios, no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos; y provienen todos de sustancias sintetizadas en el metabolismo primario, con algunas reacciones posteriores. Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los primarios, en que ciertos grupos presentan una distribución no uniforme en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Martín Gordo, 2018).

En las primeras definiciones de aceites esenciales, en cuanto a su composición, éstos se identificaron fuertemente con terpenos, principalmente mono y sesquiterpenos. Sin embargo, con la identificación de otros tipos de compuestos, específicamente alilo e isoalil fenoles, la definición original cambió. También se han encontrado diferentes terpenos con un mayor número de carbonos, principalmente diterpenos. Además, se han identificado otras sustancias en aceites volátiles obtenidos por destilación; lo que se debe al hecho de que muchos otros metabolitos de las plantas, como grasas, cumarinas, antraquinonas y ciertos alcaloides son destilables, mientras que algunos compuestos se derivan de glucósidos, que se transforman durante el proceso de destilación (Ríos, 2016).

Cabe mencionar que casi todos los terpenos, tienen esqueletos carbonados contruidos con unidades de isopreno unidas entre sí de un modo regular, de “pies a cabeza”. El reconocimiento de este hecho, la llamada regla isoprénica, ha sido de gran ayuda en la comprensión de las estructuras de los

terpenos (Morrison et al., 1990). En la figura 2.1. se puede apreciar la unidad de isopreno C₅.

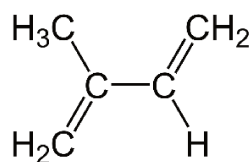


Fig. 2.1. Unidad de isopreno C₅.

Los aceites esenciales contienen entre 20 y 60 componentes (algunos llegan a tener más de 100) en concentraciones bastante diferentes. Se caracterizan por dos o tres componentes principales en concentraciones bastante altas (20 – 70%) en comparación con otros componentes presentes en cantidades traza. Sin embargo, se ha demostrado que los componentes menores juegan un papel crítico en las propiedades antimicrobianas del aceite esencial, posiblemente mostrando efectos sinérgicos junto con otros compuestos (Moreira et al., 2016).

En general, los componentes químicos de los aceites esenciales se pueden agrupar en terpenos y terpenoides, fenilpropanoides o compuestos que contienen azufre o nitrógeno. Estos grupos contienen compuestos cíclicos y acíclicos de diferentes clases, como alcoholes, ésteres, fenoles, cetonas, lactonas, aldehídos y óxidos. La tabla 2.1., cuya fuente es Current Opinion in Food Science, muestra ejemplos de compuestos en cada uno de los grupos mencionados (Dima y Dima, 2015).

Tabla 2.1. Los componentes químicos principales en aceites esenciales.

Terpenos y terpenoides

Carburos: limoneno, γ -terpineno, p-cimeno

Alcoholes: mentol, linalool, geraniol

Ésteres: geranilacetato

Fenoles: carvacrol, timol

Éteres: 1,8 cineol

Cetonas: carvona

Aldehídos: citral

Fenilpropanoides

Fenoles: eugenol, chavicol

Aldehídos: cinamaldehído

Alcohol: alcohol cinámico

Derivados metoxi: cinamato de metilo, metil eugenol, metil chavicol

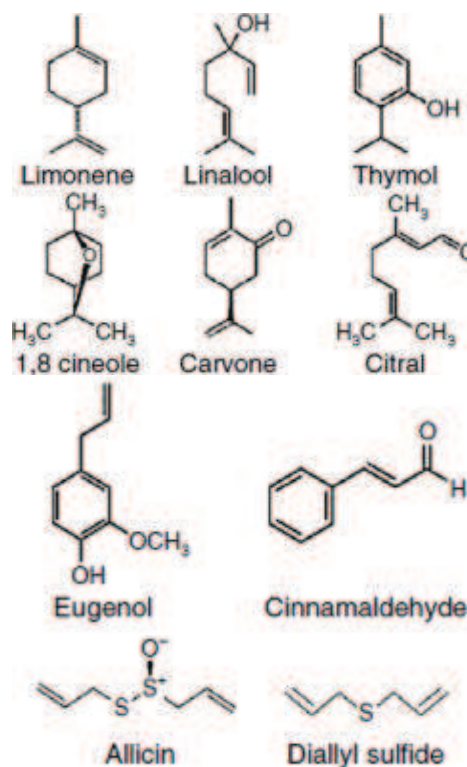
Compuestos con azufre y nitrógeno

Tiosulfatos: alicina

Sulfuros de alilo: sulfuro de dialilo, disulfuro de dialilo

Pirazinas

Isotiocianatos



Los componentes químicos de los aceites esenciales se producen a través de tres vías biosintéticas diferentes: la vía del acetato-malonato (polictétida), la vía del ácido mevalónico y la vía del ácido shikímico (Moreira et al., 2016). Sin embargo, no existe una nomenclatura química sistemática para compuestos químicos encontrados en AE. Sus nombres científicos se basan en sus propiedades o fuentes prominentes (por ejemplo, terpenos, limoneno, pineno, timol, entre otros) (Dima y Dima, 2015).

El esquema general de reacciones biosintéticas se muestra en la figura 2.2.

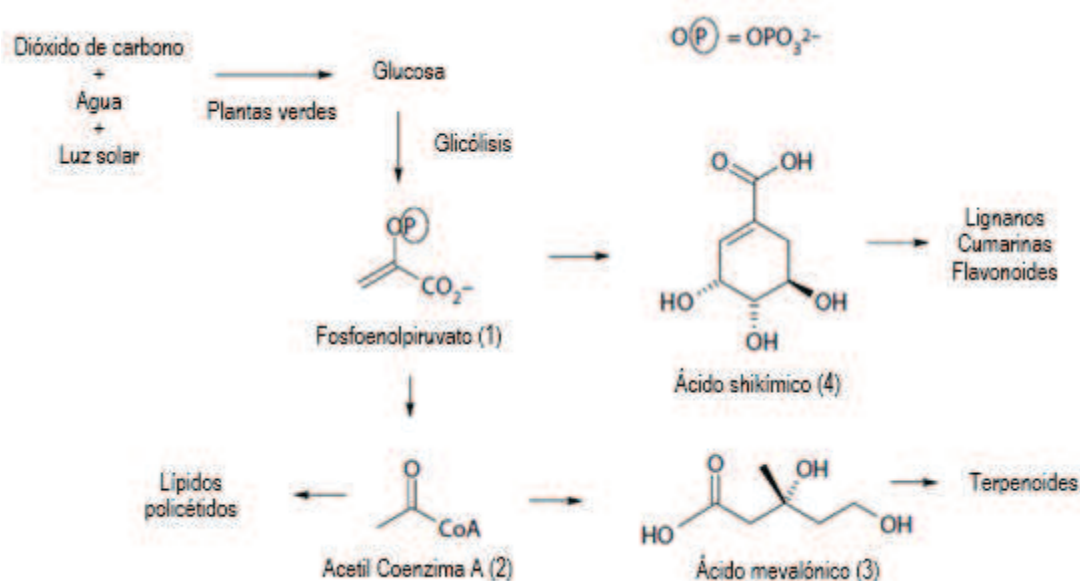


Fig. 2.2. Patrón general de biosíntesis de metabolitos secundarios.

A través de la fotosíntesis, las plantas verdes convierten el dióxido de carbono y el agua en glucosa. La escisión de la glucosa produce fosfoenolpiruvato (1), que es un componente clave para la familia de productos naturales shikimatos. La descarboxilación del fosfoenolpiruvato produce la unidad de dos carbonos del acetato y este se esterifica con la Coenzima A para dar acetil CoA (2). La autocondensación de esta especie da lugar a policétidos y lípidos. El acetil CoA también es un punto de partida para la síntesis de ácido mevalónico (3), que es el material de partida clave para los terpenoides. El ácido shikímico (4) es un intermediario sintético clave para las plantas, ya que es el precursor tanto de los flavonoides como de la lignina. Los flavonoides son importantes para las plantas como antioxidantes, colores, agentes protectores contra la luz ultravioleta y similares, y la lignina es un componente clave de los materiales estructurales de las plantas, especialmente los tejidos leñosos (Can Baser y Buchbauer, 2010).

Además, la composición de los AE depende de la especie y subespecie de la planta extraída, la ubicación geográfica de esta planta, el tiempo de cosecha, las técnicas de extracción y los métodos de procesamiento. Así, los AE ricos en terpenos se extraen de las familias *Apiaceae*, *Asteraceae* y *Lamiaceae*; los AE ricos en fenilpropanoides se extraen de las familias *Apiaceae* (*Umbelliferae*), *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Piperaceae* y *Rutaceae*; y los AE ricos en

compuestos que contienen azufre y nitrógeno se encuentran en familias de plantas como *Alliaceae*, *Rutaceae* y *Brassicaceae* (Dima y Dima, 2015).

2.2.1.1 Terpenos

Los aceites esenciales formados por derivados de terpeno generalmente están compuestos de mono y sesquiterpenos, que pueden ser hidrocarburos u oxigenados. Sin embargo, también pueden provenir de derivados alifáticos o alicíclicos y algunos pueden tener estructuras aromáticas. Ejemplos de aceites esenciales de este extenso grupo incluyen trementina (*Pinus spp.*) con α y β -pineno, geraniol de rosa de damasco (*Rosa damascena*), aceite de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) con terpinen-4-ol, cilantro (*Coriandrum sativum*) con linalool, menta (*Mentha piperita*) con mentol, limón (*Citrus lemon*) con limoneno, alcaravea (*Carum carvi*) con carvona, ajenjo (*Artemisia absinthium*) con tuyona, eucalipto (*Eucalyptus globulus*) con cineol, y quenopodio (*Chenopodium ambrosioides*) con ascaridol como ejemplos de monoterpenos. Ejemplos de sesquiterpenos incluyen sándalo (*Santalum album*) con santalol, manzanilla alemana (*Matricaria recutita*) con bisabolol, y jengibre (*Zingiber officinale*) con zingiberol.

2.2.1.2 Fenilpropanoides (Alil fenoles)

Algunas plantas aromáticas tienen un aceite esencial formado principalmente por derivados aromáticos de alilo o isoalilo fenol. Las plantas que contienen estos compuestos son más raras que las que contienen terpenos, pero eso solo sirve para hacer que este tipo de compuesto sea selectivo. Algunos ejemplos relevantes de aceites esenciales con este tipo de compuestos son los de anís (*Pimpinella anisum*), anís estrellado (*Illicium verum*) e hinojo (*Foeniculum vulgare*), todos con *trans*-anetol; canela (*Cinnamomum verum*) con *trans* aldehído cinámico; y clavo (*Syzygium aromaticum*) con eugenol.

Debido a la naturaleza de los fenoles, los aceites esenciales con alto contenido de fenol deben usarse en concentraciones bajas y por períodos cortos de tiempo, ya que pueden provocar toxicidad si se usan durante períodos prolongados. Las principales fuentes vegetales de estos compuestos son anís, canela, clavo, hinojo, nuez moscada, perejil, sasafrás, anís estrellado, estragón

y algunas familias botánicas (*Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*) (Moreira et al., 2016).

2.2.1.3 Otros componentes

Otros compuestos volátiles también pueden estar presentes en aceites esenciales. En el caso especial de aceites esenciales obtenidos de procedimientos distintos a la destilación, como “enfleurage”, extracción con solventes o prensado, pueden estar presentes compuestos no volátiles. En muchos casos, estos son precursores de derivados conocidos, como las lactonas sesquiterpénicas o los glucósidos, que en algunos casos se hidrolizan o transforman en compuestos volátiles durante el proceso de destilación, mientras que, en el caso de la extracción, pueden estar presentes en su forma original en el extracto. Otros compuestos que se encuentran en los aceites esenciales incluyen la ligustilida del apio de monte (*Ligusticum levisticum*) y las cumarinas, que, aunque están presentes en pequeñas cantidades se pueden detectar en algunas plantas o especies aromáticas relevantes, como la lavanda (*Lavandula* spp.) que puede contener hasta 0.3 % de cumarina. Otros ejemplos son furanocumarina en el aceite esencial de bergamota (*Citrus bergamia*), que a menudo contiene bergapteno; sinalbina (glucosinolato) de mostaza blanca (*Brassica alba*); y amígdala de almendra amarga (*Prunus communis* var. amara), que libera benzaldehído y cianuro de hidrógeno (Ríos, 2016).

Los componentes nitrogenados o sulfurados como los glucosinolatos o los derivados de isotiocianato (aceites de ajo y mostaza) también son característicos como metabolitos secundarios de diversas plantas (Bakkali et al., 2008).

Los componentes químicos de los AE explican sus diferentes propiedades biológicas, como las propiedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antivirales, antimutagénicas, antiprotozoarias, antiinflamatorias, antidiabéticas y antioxidantes. Estas características pueden ser aprovechadas para desarrollar productos alimenticios, farmacéuticos o funcionales innovadores que contribuyan a la salud del consumidor (Dima y Dima, 2015).

Determinar la composición de los "productos naturales" se ha vuelto más importante con la creciente demanda de los consumidores. Como resultado, la caracterización química y toxicológica de los AE utilizados en la industria

alimentaria se ha investigado cada vez más en los últimos tiempos. Organismos internacionales como FDA, Codex Alimentarius, Food Chemical Codex (FCC), la Asociación de Fabricantes de Sabores y Extractos (FEMA), la Organización Internacional de Industrias de Sabores (IOFI) y el Consejo de Europa (CoE) han establecido protocolos para productos químicos y análisis toxicológicos, guías de buenas prácticas para el procesamiento de plantas aromáticas y aceites esenciales, y los límites para las cantidades de componentes volátiles mínimos y máximos que se encuentran en aceites esenciales (Dima y Dima, 2015).

2.2.2 Variabilidad de los AE

La alta variabilidad en la composición química de las plantas aromáticas, que contienen aceites esenciales, presenta un problema potencialmente grave para la industria de fabricación de perfumes. Además de los factores estrictamente genéticos, el crecimiento y desarrollo de las plantas, y con ello, la naturaleza y cantidad de aceites esenciales, se ven influenciados por diversos factores: la temperatura, la lluvia, la duración del día, las características de radiación, la altitud, la ubicación geográfica, el tiempo de cosecha, las técnicas de extracción y los métodos de procesamiento.

Generalmente, la formación de aceites esenciales mejora a temperaturas más altas, aunque los días muy calurosos pueden provocar una pérdida física excesiva de aceite. La lluvia continua puede provocar la pérdida de aceites esenciales de hojas y raíces por lixiviación (Bhattacharya, 2016).

La temporada en la que se recolecta la planta aromática suele ser un tema de considerable importancia. En un estudio, se registró la influencia de la temporada de cosecha en el rendimiento y la composición, para el aceite esencial de *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (orégano griego) cosechado en dos temporadas consecutivas. La concentración de aceite esencial por planta aumentó significativamente de alrededor de 1.5 – 2.0 % en la estación cálida y seca a alrededor de 5.5 % en la siguiente estación fría y húmeda, siendo mayor en las inflorescencias en comparación con las hojas. El contenido de carvacrol, el componente principal del aceite esencial de orégano, fue mayor en la estación más seca y cálida (70.75 – 84.88 %), mientras que varios otros compuestos tendieron a acumularse en niveles más altos durante la estación más húmeda y

fría junto con niveles comparativamente más bajos de carvacrol (56.46 – 75.12 %) tanto en hojas como en inflorescencias (Bhattacharya, 2016).

La ubicación geográfica es una de las principales causas de variación en los aceites esenciales, ya que gobierna las condiciones ambientales. El aceite esencial de laurel muestra el mayor rendimiento en verano, a finales de agosto (Portugal) y julio (China); y en primavera (Israel), y contiene el nivel más alto de 1,8-cineol. La edad de la planta que se va a cosechar también es de considerable importancia y gobierna no solo la cantidad total de aceite esencial producido, sino también las proporciones relativas de los componentes del aceite esencial (Bhattacharya, 2016).

Los AE son sensibles a factores fisicoquímicos como el oxígeno, la luz, la temperatura y el pH. Por lo tanto, el oxígeno, en presencia de luz, conduce a la oxidación de los compuestos insaturados con la generación de radicales libres. Los AE pierden pequeñas cantidades de compuestos volátiles cuando se almacenan a altas temperaturas. Además, algunos componentes son altamente inestables con pH variable, por ejemplo, citral, que se descompone fácilmente en un ambiente ácido. Los AE se pueden proteger durante el almacenamiento, el transporte y el procesamiento mediante encapsulación. Esto no solo puede proteger a los AE de diversos factores fisicoquímicos, sino también preservar su sabor y su actividad biológica, enmascarar su olor u olor y sabor, y transformarlos en polvos solubles en agua (Dima y Dima, 2015).

2.2.3 Uso de aceites esenciales

A lo largo de la historia, los aceites esenciales han sido considerados de gran interés, aunque muchos de sus usos se han perdido con el tiempo. En general, se acepta que los seres humanos los han estado extrayendo de las plantas aromáticas desde los albores de la humanidad (Ríos, 2016).

Los aceites esenciales han ganado un interés renovado en varias áreas: presentan interesantes características fisicoquímicas, también tienen actividades biológicas diversas y relevantes. El uso de extractos de plantas en la industria farmacéutica y alimentaria implica la determinación de su composición y sus actividades, como la capacidad antioxidante para la prevención de la oxidación de lípidos que conduce a la rancidez y la actividad antibacteriana para la prevención de la proliferación de microorganismos (Si Said et al., 2016).

Las aplicaciones de aceites esenciales, para diferentes propósitos, son variadas y algunas de ellas se mencionan a continuación.

Alimentos y agroindustria. La industria alimenticia también presenta una demanda creciente de aceites esenciales por sus importantes aplicaciones como conservantes de alimentos, la innovación en el envasado de alimentos y la lucha contra patógenos generadores de intoxicaciones alimentarias peligrosas (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas putida* y *Staphylococcus aureus*) (Asbahani et al., 2015). Se ha sugerido su uso como antioxidantes y conservantes en los alimentos, ya sea incorporado en el material de envasado de alimentos o como planta y protectores de cultivos. Su aplicación como conservantes de alimentos requiere un buen conocimiento de sus propiedades, incluida la sensibilidad de los microorganismos objetivo, el modo específico de acción, su potencia antimicrobiana y el efecto de los componentes de la matriz alimentaria en sus propiedades antimicrobianas (Ríos, 2016). Además, la cantidad de extractos de plantas usados está limitada por la sensibilidad de los sensores olfativos y gustativos, del consumidor. En general, en base a dos aspectos, como son el uso seguro por un largo período de tiempo y el principio de autolimitación, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) decidió que 160 AE son "generalmente reconocidos como seguros" (GRAS) para su uso en la preparación de alimentos, medicamentos y cosméticos. La industria alimentaria utiliza principalmente aceites esenciales de canela, romero, clavo, limoncillo, cilantro, orégano, salvia, pimienta, tomillo y cítricos (Dima y Dima, 2015).

Cosmética. Los aceites esenciales tienen aplicaciones industriales comprobadas en la fabricación de perfumes, cosméticos, jabones, champús o geles de limpieza. La producción mundial de aceites esenciales para la preparación de perfumes ha aumentado, con grupos específicos de plantas aromáticas muy buscadas en el mercado. Los quimiotipos de salvia, lavanda y tomillo son utilizados para obtener perfumes finos y novedosos (Ríos, 2016).

Medicina. Numerosos estudios han destacado los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales contra bacterias multirresistentes, contra plagas, insectos, virus, mohos y bacterias. Por lo que representan una alternativa interesante debido a la resistencia emergente de los microorganismos contra los

agentes sintéticos. Es por eso que los AE a menudo logran inhibir el crecimiento microbiano de cepas de bacterias resistentes a los medicamentos, pero esto no implica que haya actividad antimicrobiana sin restricciones de los AE, ya que también existe resistencia contra los aceites esenciales (Lang y Buchbauer, 2012). Además, los mismos se han utilizado contra infecciones nosocomiales, como líquido limpiador para la desinfección de equipos médicos y superficies, o como aerosol en quirófanos y salas de espera para limpieza de aire, para limitar contaminaciones (Asbahani et al., 2015).

Industria farmacéutica. Se incluyen en la composición de muchas formas de dosificación (pomadas, cremas, jarabes, aerosoles). El número de preparaciones crece constantemente y están destinadas, principalmente, a aplicaciones locales como mezclas con aceites vegetales o inhalación (Asbahani et al., 2015). Este es especialmente el caso de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), menta (*Mentha piperita*), anís (*Pimpinella anisum*), salvia (*Salvia officinalis*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*). Estos aceites se usan como expectorantes para tratar la tos y la bronquitis (eucalipto), como agentes antimicrobianos (salvia, árbol de té y clavo), como descongestionantes del tracto respiratorio (menta) y como carminativo (anís), entre otros usos. Así, el aceite de clavo se usa en odontología por sus propiedades antisépticas y analgésicas, mientras que el aceite de árbol de té se usa en dermatología como agente antiacné debido a su actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas. Además, algunos aceites esenciales se utilizan en farmacia para aromatizar preparaciones farmacéuticas y mejorar su sabor. El método de aplicación más común de aceites esenciales es tópico en formas diluidas, a menudo junto con un aceite portador como parte de la terapia de masaje. También se pueden inhalar después de agregar unas gotas al agua humeante o por medio de un atomizador o humidificador. Además, se pueden aplicar como ungüentos, cremas y compresas. Sin embargo, la aplicación oral de aceites esenciales a través de la encapsulación u otros métodos de liberación programada se ha introducido como un método eficaz para obtener los efectos beneficiosos de estas sustancias. Se pueden beber en forma de té con azúcar o en cápsulas blandas, lo que permite una dosificación más precisa y evita varios efectos no deseados. Sin embargo, es posible que la

toxicidad de los aceites esenciales sea mayor cuando se administra de esta manera (Ríos, 2016).

Aromaterapia. Los aceites esenciales podrían proporcionar una agradable sensación de confort psíquico a los pacientes en los establecimientos sanitarios (Asbahani et al., 2015).

En el capítulo II, sección 2.3. (Aditivos en alimentos) de la presente tesis se estudian los desafíos para la aplicación de aceites esenciales como antimicrobianos y en el capítulo VIII se mencionan los métodos de aplicación de los AE en alimentos y se brindan ejemplos de aplicación industrial de los mismos en salchichas tipo Viena.

2.2.4 Métodos de obtención de aceites esenciales

Hoy en día está claro, como se mencionó anteriormente, que los aceites esenciales tienen una composición compleja y variable. Su aroma es el resultado de la combinación de los aromas de cada uno de sus componentes. Los oligoelementos también son importantes, ya que le dan al aceite un olor natural característico. Por tanto, es importante que la proporción natural de los componentes se mantenga durante la extracción de los aceites esenciales de las plantas mediante cualquier tecnología empleada. Se utilizan diferentes métodos para separar estos aceites de los diversos materiales vegetales. Aunque parece relativamente sencillo aislar dichos aceites, la composición del aceite puede variar en gran medida según el método de extracción utilizado, como mencionan los autores Dima y Dima (2015).

A continuación, se mencionan los métodos convencionales de extracción, y sus principales características, y los nuevos métodos “verdes”, explicados por Stratakos y Koidis (2016). En algunos casos, se complementan a estos autores con otros estudios realizados sobre estos métodos de extracción.

2.2.4.1 Métodos convencionales de extracción de aceite esencial

2.2.4.1.1 Expresión fría

La expresión o prensado en frío es el método de extracción más antiguo y se utiliza casi exclusivamente para la producción de aceites esenciales cítricos. Este método se refiere a cualquier proceso físico durante el cual las glándulas

de aceite esencial en la piel y las cutículas se rompen para que se libere el aceite. Este proceso da como resultado la producción de una emulsión acuosa, que posteriormente se centrifuga para separar el aceite esencial. La razón para extraer los aceites esenciales de cáscara de cítricos mediante métodos mecánicos es la inestabilidad térmica de los aldehídos presentes. Los aceites esenciales de frutas no cítricas, como las bayas, generalmente no se extraen con este método.

2.2.4.1.2 Extracción con solvente

La extracción con solvente puede usarse para extraer aceites esenciales que son térmicamente lábiles (por ejemplo, de flores). El material vegetal se coloca en un baño de disolvente que lo disuelve. Tras la extracción la mezcla líquida que contiene el aceite esencial (junto con otros compuestos) pasa por un proceso de filtración y posterior destilación. Los disolventes que se utilizan comúnmente para la extracción son hexano, etanol, éter de petróleo y metanol. La principal ventaja de la extracción sobre la destilación es que se utiliza una temperatura más baja durante el proceso, lo que reduce el riesgo de cambios químicos debido a las altas temperaturas que se utilizan durante la destilación. La extracción con solvente es económica y relativamente rápida y, debido a que las velocidades de difusión están influenciadas por la temperatura, es posible aumentar la velocidad del proceso usando solventes calientes. El aceite esencial producido contendrá una pequeña cantidad de disolvente como residuo y, por tanto, no es posible su uso para aplicaciones alimentarias. Sin embargo, si el disolvente utilizado es alcohol, es seguro para el consumo y se considera de "grado alimenticio". Este método es comúnmente utilizado por la industria del perfume.

2.2.4.1.3 Enfleurage

Enfleurage es otro método de extracción convencional que se remonta a la antigüedad. Se ha utilizado principalmente para la extracción de aceites esenciales de flores (por ejemplo, jazmín). Durante este método, se esparce una grasa fría inodora purificada sobre el material vegetal. Los olores se desprenden de las flores y, en consecuencia, se disuelven en la grasa. Las flores nuevas reemplazan a las viejas y el proceso se repite durante períodos muy largos hasta

que se alcanza la saturación de la grasa. Posteriormente se recoge la grasa y se extrae con alcohol. Según los estándares actuales, es un método costoso, laborioso y que requiere mucho tiempo. No parece tener ninguna aplicación para los aceites esenciales utilizados en la industria alimentaria y es prácticamente obsoleto en la actualidad.

2.2.4.1.4 Arrastre con vapor de agua e hidrodestilación

El método de extracción más comúnmente utilizado es el método de destilación al vapor o hidrodestilación. Este proceso de extracción puede durar entre 1 y 10 h. La cantidad de aceite producido depende del tiempo de destilación, la temperatura, la presión y el tipo de material vegetal. Durante la destilación, los materiales vegetales se exponen a agua hirviendo o vapor para liberar el aceite esencial que contienen, a través de la evaporación. A medida que se condensan el vapor de agua y los vapores de aceite esencial, se recogen y separan en un recipiente normalmente llamado "matraz florentino". Aunque la extracción de un aceite esencial por destilación parece ser un proceso sencillo, tiene muchos inconvenientes. Debido a que los aceites esenciales están expuestos al agua hirviendo durante largos períodos de tiempo, puede dar lugar a diferencias en la composición de los aceites volátiles que se extraen. Durante la destilación puede tener lugar la hidrólisis de ésteres a alcoholes y ácidos, lo que puede tener serias implicaciones en el caso de aceites con altas cantidades de ésteres. Además, algunos aceites esenciales requieren rectificación. Este proceso implica la redestilación del aceite para eliminar las impurezas indeseables (por ejemplo, ceras) así como los componentes que pueden impartir un olor inaceptable, y así obtener fracciones altamente puras de componentes bioactivos (Dima y Dima, 2015).

2.2.4.2 Nuevos métodos de extracción "verdes"

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías de extracción que eliminan algunas de las desventajas de los métodos clásicos. Algunos métodos, como la extracción asistida por microondas o la extracción asistida por ultrasonido emplean fuentes alternativas de energía, mientras que otros, como la extracción de fluido supercrítico o la extracción de agua subcrítica mejoran las características del disolvente (Dima y Dima, 2015).

2.2.4.2.1 Extracción asistida por microondas

Es una tecnología adicional que ha atraído especial atención, debido a su mecanismo de calentamiento único (basado en la fricción), costo razonable y buen desempeño en condiciones atmosféricas. En comparación con los métodos de extracción convencionales (por ejemplo, extracción Soxhlet), la extracción asistida por microondas conduce a mayores rendimientos de extracción, tiempos de extracción más cortos y una mayor selectividad. Además, esta clase de extracción puede considerarse superior a la extracción por fluido supercrítico en términos de simplicidad y costo de operación.

2.2.4.2.2 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido, en la tecnología de procesamiento de alimentos, es de interés porque puede facilitar la extracción de componentes (por ejemplo, aceites, proteínas, polisacáridos). Las principales ventajas de la aplicación de ultrasonido son los efectos mínimos sobre los compuestos extraíbles, la reducción o eliminación de uso de disolventes orgánicos (ya que es eficaz también con disolventes “generalmente reconocidos como seguros”) y una disminución del tiempo de extracción. Los efectos de los ultrasonidos se deben a los fenómenos de cavitación, es decir, producción y descomposición de burbujas microscópicas. Cuando las burbujas aumentan de tamaño, colapsan violentamente. Este colapso violento induce fuerzas mecánicas que conducen al daño de la membrana celular, lo que resulta en un alto rendimiento de materiales extraídos y una rápida tasa de extracción.

Existen numerosos estudios que ilustran las ventajas de la extracción asistida por ultrasonido. Shah et al. (2005) y Sharma et al. (2006) demostraron que el pretratamiento ultrasónico de semillas de *Jatropha curcas*, almendras y damascos produjo un mayor rendimiento y una reducción del tiempo de extracción del aceite en comparación con la extracción enzimática acuosa. Los beneficios del pretratamiento con ultrasonido, antes de la hidrodestilación, también fueron demostrados por otros autores (Assami et al., 2012). El tratamiento con ultrasonido de semillas de *Carum carvi* seguido de hidrodestilación dio como resultado una mayor recuperación de aceite esencial en un tiempo más corto (30 y 90 min para muestras tratadas y no tratadas,

respectivamente) sin afectar la composición del aceite. El pretratamiento con ultrasonido también se ha combinado con técnicas de extracción más nuevas, dando resultados muy prometedores (Stratakos y Koidis, 2016).

2.2.4.2.3 Extracción con fluido supercrítico

El CO₂ se usa principalmente en la extracción de fluidos supercríticos por sus propiedades únicas, como la disminución de los valores de los parámetros críticos ($T_{cr} = 31.1 \text{ °C}$ y $P_{cr} = 7.4 \text{ MPa}$), baja reactividad química, baja toxicidad y precio razonable. En la fase supercrítica (31 – 55 °C y 0.5 – 7.4 MPa), el CO₂ se comporta como un líquido no polar con alta difusividad, lo que permite la extracción de componentes no polares del material objetivo (Dima y Dima, 2015).

2.2.4.2.4 Extracción con agua subcrítica

La extracción con agua subcrítica, también conocida como extracción con agua caliente a presión o extracción con agua a baja polaridad a presión, es un método novedoso de extracción de AE. Aquí, el agua sobrecalentada se usa a temperaturas que oscilan entre 100 y 375 °C (temperatura crítica) a altas presiones (> 20 bar). En estas condiciones, la polaridad del agua disminuye con la disminución de la constante dieléctrica hasta 14.86 (350 °C y 250 bar), lo que garantiza que los componentes no polares se solubilicen y extraigan de los materiales vegetales (Dima y Dima, 2015).

2.2.4.2.5 Microextracción

Los métodos de microextracción también se están estudiando con el objetivo principal de analizar rápidamente los componentes extraídos. Estos métodos utilizan pequeñas cantidades de materia prima y permiten que todos los análisis se realicen inmediatamente después de la extracción (técnicas de espacio de cabeza y microextracción de fase sólida) (Dima y Dima, 2015).

Las tecnologías de extracción convencionales se caracterizan por varios inconvenientes y suelen consumir energía. El aumento del costo de la energía y el enfoque más respetuoso con el medio ambiente adoptado, es decir, la reducción de las emisiones de dióxido de carbono (CO₂), hicieron que las partes interesadas buscaran tecnologías alternativas que sean rentables, sostenibles y

capaces de obtener productos con las mismas características o mejoradas. Además del consumo reducido de energía, los nuevos métodos de extracción “verdes” brindan las siguientes ventajas: menor tiempo de extracción, obtención de un número mucho mayor de componentes en una cantidad mayor, sin degradación de los componentes sensibles a la temperatura y disminución de la contaminación ambiental (Stratakos y Koidis, 2016). Lo más importante es el aumento del rendimiento de la extracción y la mejora en la calidad del producto.

2.2.5 Preparación del material vegetal

El material cosechado con destino a la extracción de aceite esencial puede sufrir distintos tratamientos según la especie y el método de extracción utilizado. Cuando se trata de frutos o semillas secas (granos), éstos deben cosecharse con la humedad apropiada para una buena conservación (10 a 12 %) y luego deben almacenarse embolsados o a granel en lugares secos y protegidos de las altas temperaturas. Estos granos (coriandro, eneldo, anís, hinojo) pueden destilarse en cualquier momento del año y por arrastre con vapor de agua. Es conveniente su quebrado o molienda gruesa inmediatamente antes de la destilación, para facilitar la extracción de la esencia y, por lo tanto, aumentar el rendimiento. Cuando se cosecha material herbáceo o fresco en general (menta, eucalipto), se recomienda un oreado o deshidratado parcial antes de someterlo al proceso de destilación. Esta operación permite una más rápida extracción de la esencia y un mejor aprovechamiento del destilador. Al deshidratarse se pierde agua que ocuparía lugar en el extractor. No conviene llegar a un deshidratado total por las posibles pérdidas de material cuando se manipula. En algunas especies puede observarse también una pérdida de aceite esencial durante el secado, si éste es muy intenso o se lleva a cabo en malas condiciones. Esta pérdida es causada por evaporación, oxidación, resinificación, y otros cambios químicos (Bandoni et al., 2003).

Las cáscaras de cítricos tienen una permeabilidad de la estructura que impide una fácil extracción del aceite esencial. Para la extracción de AE de cítricos realizada por hidrodestilación, generalmente, el material debe triturarse de antemano. En el estudio realizado por Allaf et al. (2013), han comparado y modelado una hidrodestilación de 4 h en piel de naranja, molida y en trozos. Obtuvieron diferencias significativas en términos de rendimientos de extracción

de AE: 1.628 % para cáscara de naranja molida en comparación con 0.197 % para cáscaras de naranja dejadas en trozos. Allaf, Tomao, Besombes y Chemat, (2013) afirman que los procesos mecánicos y térmicos deben combinarse para este material en particular (Allaf et al., 2013).

En el caso de material vegetal (hojas, flores), generalmente, una vez recolectado, se lava y se seca a la sombra y a temperatura ambiente, hasta que el porcentaje de humedad ronde el 10 %. Además, los estudios realizados en cuanto a rendimiento de la extracción, aseguran que éste es mayor, al utilizar trozos pequeños del material vegetal seco. Como el vapor de agua penetra en los tejidos del material vegetal y vaporiza la mayoría de las sustancias volátiles, para asegurar una mayor superficie de contacto y exposición de las glándulas de aceite, se requiere picar y/o moler los vegetales según su consistencia, así: flores y hojas formadas por materiales no fibrosos se pueden destilar sin picado o molienda previa; flores, hojas, tallos y raíces de materiales fibrosos se deben picar y/o moler, teniendo en cuenta que en este proceso de molienda puede haber pérdidas ocasionadas por el calor producido debido a la forma y rotación del molino (Montoya, 2010).

En concordancia con Montoya (2010), existen otras investigaciones en la literatura, donde se concluye que las hojas secas del material vegetal, poseen mayor rendimiento en la extracción, que las hojas frescas. En este sentido, en el estudio realizado por Silva et al. (2011), llegaron a la conclusión de que las muestras de hojas frescas de *Eucalyptus cinerea* presentaron rendimientos de aceites más bajos que las correspondientes muestras de hojas secas, siendo el rendimiento promedio de aceite esencial de la muestra de verano de hojas secas 2.87 %, como se puede apreciar en la Tabla 4.1. (página 87) (Silva et al., 2011).

El corte de una planta interrumpe su suministro de agua y minerales. Sus procesos de mantenimiento de la vida se ralentizan y finalmente se detienen por completo. Se detiene la producción de enzimas, comienzan los procesos autooxidativos, incluido un aumento de la actividad bacteriana que conduce a la pudrición y el moho. El color y las propiedades organolépticas, como la fragancia, también cambiarán habitualmente en su detrimento. Como consecuencia de esto, a menos que el secado ó la preparación controlada sean opciones aceptables, el tratamiento de la biomasa debe ser rápido (Can Baser y Buchbauer, 2010).

2.2.6 Rendimiento de las extracciones

Este tema es un complemento de la variabilidad de los aceites esenciales, tratado en 2.2.2. Se cree que los AE son producidos por las plantas en respuesta a factores estresantes y, por lo tanto, las condiciones de crecimiento pueden afectar el rendimiento y el contenido de aceite esencial. Muchos parámetros afectan el rendimiento de AE y la composición química de las plantas aromáticas, como los métodos de secado o los procesos de extracción (Calo et al., 2015).

Cuando se hace uso de un AE se debe tener en cuenta que se trata de un producto extractivo (obtenido por extracción directa de la planta) cuya concentración rara vez supera el 1 % del peso de la planta seca. La mayoría de plantas contienen de 0.01 a 10 % de AE. La cantidad media que se encuentra en la mayoría de las plantas aromáticas es alrededor de 0.1 a 2 % (Montoya, 2010).

Son varios los factores agroclimáticos que inciden marcadamente en el desarrollo del cultivo de una especie vegetal, influyendo tanto en el rendimiento como en la calidad del producto obtenido (Bandoni et al., 2003). Entre estos factores, cabe mencionar, las condiciones climáticas, especialmente la duración del día, la heliofanía efectiva (*helio* = sol y *fanis* = resplandor; es decir el período de tiempo, expresado en horas, durante el cual la planta ha recibido radiación solar directa), la temperatura, el tipo de suelo, el suministro de agua, la influencia de la sequía, el estrés hídrico, el estrés causado por insectos y microorganismos, la propagación de la planta y el cultivo. Las especies tropicales siguen en su ciclo de vegetación la estación seca y lluviosa; las especies de las zonas templadas reaccionan más con la duración del día, cuanto más distantes del ecuador se encuentra su área de distribución natural. Otros factores importantes incluyen el conocimiento preciso sobre qué parte de la biomasa se utilizará, la ubicación de las células oleaginosas dentro de la planta, el momento de la cosecha, el método de cosecha, el almacenamiento y la preparación de la biomasa antes de la extracción del aceite esencial (Can Baser y Buchbauer, 2010).

Temperatura: juega un rol decisivo, por ejemplo, en la germinación de las semillas. La temperatura óptima para el crecimiento de las distintas hierbas aromáticas depende de la especie, del genotipo y del hábitat natural. La albahaca (*Ocimum basilicum*), nativa de climas cálidos, produce los mejores rendimientos bajo condiciones cálidas, mientras que el orégano (*Origanum* spp.),

naturalmente de climas templados, produce mejores rendimientos bajo temperaturas moderadas (Bandoni et al., 2003).

Humedad: durante la fase de crecimiento intenso que precede generalmente a la floración, las plantas tienen necesidad de más humedad. Si después de la aparición de los brotes, sigue un largo período de lluvias, ésta afecta a las plantas en las que se cosechan las hojas o las partes superiores (*Mentha* spp., *Thymus vulgaris*, *Pelargonium graveolens*, *Ocimum basilicum*, etc.). En este último caso, los principios activos no pueden acumularse y la calidad de la producción es inferior. Por el contrario, el tenor de los principios activos es más alto en la mayoría de las especies durante los años de leves precipitaciones (Bandoni et al., 2003).

La relación entre temperatura y humedad es un parámetro adicional importante. La humedad junto con las temperaturas elevadas produce condiciones favorables para la proliferación de insectos parásitos y, lo más importante, de microorganismos. Esto a veces hace que las plantas aumenten la producción de aceite esencial para su propia protección (Can Baser y Buchbauer, 2010).

Calidad y preparación del suelo: el pH del suelo afecta significativamente el rendimiento y la calidad del aceite, ya que el valor del pH influye fuertemente en la solubilidad de ciertos elementos en el suelo. El hierro, el zinc, el cobre y el manganeso son menos solubles en suelos alcalinos que en ácidos porque precipitan en forma de hidróxidos a valores de pH elevados. Es fundamental que los agricultores determinen los límites del perfil elemental del suelo. Además, el espaciamiento de las plantaciones debe garantizar un suministro adecuado de oligoelementos y nutrientes esenciales. La selección del sitio óptimo junto con un clima adecuado juega un papel importante, ya que proporcionarán una garantía para la calidad óptima del cultivo y del aceite esencial (Can Baser y Buchbauer, 2010).

Estrés hídrico y sequía: dado que el crecimiento de mohos es causado por el exceso de agua, la mayoría de las plantas requieren suelos bien drenados para evitar que sus raíces se pudran y la planta se dañe, lo que afecta negativamente la producción de aceite esencial. La falta de agua, por ejemplo, la sequedad, ejerce una influencia deletérea similar. Las flores son más pequeñas de lo normal y los rendimientos disminuyen. La sequía extrema puede

matar a toda la planta a medida que su follaje se seca cerrando todo su metabolismo (Can Baser y Buchbauer, 2010).

Estrés por insectos y microorganismos: las plantas son organismos vivos capaces de interactuar con las plantas vecinas y advertirles de cualquier peligro incipiente por el ataque de insectos. Estas señales de advertencia son el resultado de cambios rápidos que ocurren en la composición de su aceite esencial. De esta manera, el insecto entrará en contacto con un material vegetal modificado químicamente, que puede no adaptarse a sus hábitos de alimentación, lo que lo obligará a salir y buscar en otra parte. Los microorganismos, como se mencionó con exceso de agua, también pueden cambiar significativamente la composición del aceite esencial.

Tiempo de cosecha: el momento de la cosecha de hierbas es uno de los factores más importantes que afectan la calidad del aceite esencial. Es un hecho bien documentado que la composición química cambia a lo largo de la vida de la planta. Ocasionalmente, puede ser cuestión de días durante los cuales la calidad del aceite esencial alcance su punto óptimo. El conocimiento del momento preciso del inicio de la floración a menudo tiene una gran influencia en la composición del aceite. En el pasado, los productores sabían exactamente cuándo cosechar la biomasa. En estos días, el uso de una combinación de técnicas de microdestilación y cromatografía de gases permite realizar pruebas rápidas de la calidad del aceite y, por lo tanto, determinar el momento óptimo para comenzar la recolección. En algunos casos, los rendimientos del AE pueden verse influidos por el momento de la recolección. Uno de los mejores ejemplos es el aceite de rosas. Los pétalos deben recolectarse por la mañana entre las 6 a.m. y las 9 a.m. Con el aumento de la temperatura diurna, la producción de aceite disminuirá. En el caso de las glándulas sebáceas incrustadas en la estructura de la hoja, como en el caso de los eucaliptos y los pinos, el rendimiento y la calidad del aceite no se ven afectados en gran medida por el momento de la cosecha (Can Baser y Buchbauer, 2010).

2.2.7 Determinación de la composición química de los aceites esenciales

Si bien es conveniente estudiar la efectividad de un aceite esencial como aditivo antimicrobiano natural considerándolo como un ingrediente entero, en

lugar de una mezcla de componentes (Militello et al., 2011), también es importante conocer cuáles son sus compuestos constituyentes.

Los productos de extracción de las especies naturales pueden estar constituidos por centenares de distintos compuestos químicos y, a veces, los principios activos están dados por los componentes minoritarios y no por los mayoritarios. Lo realmente importante es identificar cuál o cuáles de los constituyentes presentes son los responsables de la actividad deseada del producto.

Se han utilizado diferentes métodos para controlar y analizar los aceites esenciales. Actualmente, sin embargo, la identificación de los componentes del aceite esencial se lleva a cabo con la ayuda de cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas (GC-MS), equipada con un detector de ionización de llama (FID) y detectores de MS, una columna capilar (30 m × 0.25 mm, espesor de película 0,25 µm), y una división. Las condiciones de la prueba pueden variar según la columna y la muestra. Por ejemplo, los experimentos GC-MS a menudo se realizan con temperaturas de inyector y detector de 250 y 270 °C, respectivamente, con el horno inicialmente a 50 °C durante 2-3 min y luego aumentando en 3-10 °C / min hasta que alcanza 200-240 °C, con un flujo de 0.7-1.0 µL / min.

Normalmente, el helio se usa como gas portador a una velocidad de flujo de 0.7-1.0 mL / min, las muestras se diluyen (1/10, v / v), y el volumen inyectado es 0.2 µL en el modo dividido (relación de división 1:44). Los resultados generalmente se procesan con un programa de búsqueda espectral de masas de la biblioteca (Ríos, 2016).

El acoplamiento de un cromatógrafo de gases con un espectrómetro de masas es la técnica más utilizada y bien establecida para el análisis de aceites esenciales, debido al desarrollo de sistemas potentes y fáciles de manejar con respecto a la sensibilidad, la adquisición y el procesamiento de datos, y sobre todo su costo relativamente bajo (Can Baser y Buchbauer, 2010). Además, las mezclas complejas se pueden analizar en detalle mediante la interpretación espectral de los componentes individuales separados.

2.3 Aditivos en alimentos

A mediados del siglo XIX, Louis Pasteur y los primeros microbiólogos comenzaron a comprender y controlar las causas microbiológicas de enfermedades transmitidas por alimentos y el deterioro de los mismos (W. Sperber et al., 2009).

Los avances más significativos, después de 1945, fueron el desarrollo de sistemas confiables de refrigeración mecánica, sistemas logísticos para el transporte refrigerado, la distribución de alimentos, refrigeradores y congeladores domésticos ampliamente disponibles. Numerosos refinamientos continúan mejorando la calidad microbiológica de nuestro suministro de alimentos en la actualidad. Sin duda se realizarán mejoras adicionales en el futuro (Sperber et al., 2009).

En todo el mundo, la industria alimentaria se basa en compuestos sintéticos, que se utilizan como aditivos, para mejorar o mantener el valor nutricional, la calidad, la seguridad y la frescura, para ayudar en el procesamiento y la preparación de alimentos y para hacer que los productos alimenticios sean más atractivos. Los conservantes, colorantes y saborizantes son los aditivos alimentarios más comunes; cada grupo está diseñado para un propósito específico, como potenciadores de aroma, emulsionantes, agentes gelificantes, edulcorantes, antiaglomerantes, antioxidantes y acidulantes. Dentro de la categoría de conservantes, se agregan agentes antimicrobianos para prevenir la contaminación bacteriana de los alimentos, evitando así procesos de deterioro y/o intoxicación por patógenos o sus toxinas.

La utilización directa de antimicrobianos naturales en los alimentos incluye: aplicaciones físicas (como ser, agua y lavado, embalaje, temperatura, luz UV, alta presión), químicas (como ser, hierbas, especias y sus aceites, ahumado, nitrato natural, películas y revestimientos comestibles, ácidos orgánicos, ozono) y biológicas (bacteriocinas, bacteriofagos, cultivos protectores, fermentación). Ninguno de los tratamientos químicos actualmente disponible puede lograr más de dos o tres reducciones de unidades logarítmicas en el número de microorganismos potencialmente patógenos presentes en los productos. La combinación de tecnologías ha tenido éxito en el control de patógenos y en el mantenimiento de la calidad de los alimentos durante el

almacenamiento, pero persisten los problemas de seguridad alimentaria. La aplicación de una combinación de dos o más tratamientos químicos y / o físicos puede aumentar la eficacia de su función antimicrobiana a través de interacciones sinérgicas entre ellos. Cualquiera que sea el método antimicrobiano natural elegido, la selección debe basarse en la compatibilidad sensorial y química con el alimento de destino, su estabilidad dado el tipo de sistema de conservación primario utilizado, su eficacia contra los microorganismos indeseables esperados, su seguridad y su rentabilidad (Barry-Ryan, 2014).

Según Davidson et al. (2014), un antimicrobiano natural ideal debería (1) ser eficaz en concentraciones bajas en su forma natural, (2) ser económico, (3) no provocar cambios sensoriales en el producto, (4) inhibir una amplia gama de microorganismos patógenos y de descomposición, y (5) no ser tóxico (Davidson et al., 2014).

El aumento relativamente reciente del interés por el consumismo verde ha propiciado un renovado interés científico en enfoques naturales, como la adición de cultivos bioprotectores y compuestos antimicrobianos naturales (aceites esenciales, enzimas, bacteriocinas) a los productos cárnicos, con el fin de retrasar el crecimiento de microorganismos de deterioro sin interferir con las características típicas del producto. Los aceites esenciales de origen vegetal han mostrado una notable actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos y causantes de deterioro, en carne y productos cárnicos. (Hammer et al., 1999; Lulietto et al., 2015).

Para aplicaciones alimentarias, es conveniente estudiar la efectividad de un aceite esencial como aditivo antimicrobiano natural considerándolo como un ingrediente entero, en lugar de una mezcla de componentes (Militello et al., 2011). Cabe mencionar que muchos factores afectan la composición química de los aceites esenciales y sus propiedades antimicrobianas (Burt, 2004; Settanni et al., 2014). Sin embargo, la actividad biológica de los aceites esenciales debe ser considerada como el resultado de la ocurrencia de efectos de sinergismo o antagonismo entre sus diversos componentes. Los extractos de plantas, tienen un espectro de actividad antimicrobiana contra muchos géneros de bacterias y mohos (Aiyegoro, 2014).

2.3.1 Desafíos para la aplicación de antimicrobianos naturales

Los desafíos adicionales para la industria cárnica son abordar la demanda de los consumidores de productos cárnicos más saludables (bajos en sodio) y cumplir con la tendencia de etiqueta limpia (libres de aditivos sintéticos, alérgenos y organismos genéticamente modificados - OGM) (Davidson et al., 2014). En este contexto inestable, sin embargo, el conocimiento sobre la matriz de la carne y el mecanismo de acción de los ingredientes individuales es aún más crucial (Balestra y Petracci, 2019).

Antes de aplicar realmente antimicrobianos naturales a un producto alimenticio comercial, se deben abordar una serie de problemas potenciales, incluido su estado reglamentario, efectos toxicológicos y alérgicos, costo, efectos sensoriales, influencia de los componentes de los alimentos en la actividad. Estos desafíos se analizan a continuación.

2.3.1.1 Situación regulatoria

La comercialización de alimentos con antimicrobianos naturales requiere la aprobación de las agencias reguladoras en la mayoría de los países. La legislación general sobre seguridad alimentaria y / o los límites máximos y otras restricciones (por ejemplo, ingesta diaria aceptable y nivel sin efectos adversos observados) de uso para aditivos específicos se establecen en función de su información toxicológica. Sin embargo, es difícil establecer una ingesta diaria aceptable específica o un nivel de efecto adverso no observado para los compuestos naturales debido a la variación de los componentes entre los lotes.

En el capítulo XVI (Correctivos y Coadyuvantes), artículos 1199 y 1200 del CAA se establece que “con la denominación genérica de especias o condimentos vegetales, se entiende los aditivos provenientes de ciertas plantas, partes de ellas o sus esencias que por contener sustancias aromáticas rápidas o excitantes, con o sin valor alimenticio, se emplean para aderezar, aliñar y mejorar el aroma y el sabor de los alimentos. Deben ser genuinas, sanas y responder a sus características normales y estar exentas de sustancias extrañas y de partes de la planta de origen que no posean las cualidades de las especias o condimentos”. En el mismo capítulo, se establecen las especias o condimentos vegetales de uso permitido. Los aceites esenciales o esencias naturales autorizadas para su empleo en la industria alimentaria y las características que

deben cumplir cada uno de ellos, se listan en el art. 1300. En este artículo están contempladas la Esencia de Laurel (*Laurus nobilis*), Esencia de Limón (*Citrus limonum L Burhmann*) y Esencia de Eucalipto (Farmacopea Nacional Argentina).

En el art. 1309 del capítulo XVI del CAA, Correctivos y Coadyuvantes, “se entiende por compuestos químicos aislados de aceites esenciales o de extractos, los productos químicamente definidos que se obtienen por procedimientos físicos (destilación fraccionada, congelación, etc.)” En este artículo se encuentran los compuestos puros L-carvona y eugenol, utilizados en esta investigación.

La Comisión Europea registró AE de carvacrol, carvona, cinamaldehído, citral, p-cimeno, eugenol, limoneno, mentol y timol para su uso como aromas alimentarios sin ningún riesgo para la salud del consumidor (Mariod, 2016).

Por su parte, los extractos de hojas de eucalipto están aprobados como aditivos alimentarios. El aceite esencial de eucalipto es considerado seguro y no tóxico por la Autoridad de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). Mientras tanto, en Europa también ha recibido aprobación el uso de esencias de eucalipto como aromatizantes en alimentos. En Japón, el extracto de hojas de eucalipto aparece en la lista de aditivos alimentarios como antioxidante (Silva et al., 2011).

2.3.1.2 Efectos toxicológicos y alergénicos

La seguridad toxicológica y alergénica de los aditivos alimentarios es una prioridad y uno de los aspectos más importantes para determinar si cada compuesto es apto para el consumo. Los compuestos de origen natural y derivados naturales no son una excepción porque "natural" no significa necesariamente "seguro". La seguridad de los productos químicos, tanto naturales como sintéticos, siempre debe estudiarse en detalle para asegurarse de que los consumidores estén seguros (Marques et al., 2015). Es fundamental estudiar las características toxicológicas de los antimicrobianos naturales y sus metabolitos biológicos, la posible toxicidad causada por la interacción con los componentes de los alimentos y la alergia en personas sensibles. El consumo de compuestos particulares, como los contenidos en las especias, puede no causar ningún efecto adverso a los niveles presentes en la naturaleza, pero pueden ser tóxicos una vez que se usa una elevada concentración para lograr la

actividad antimicrobiana o cuando se consumen continuamente durante un largo período de tiempo.

Los AE se están volviendo más populares porque muchas drogas sintéticas están relacionadas con efectos secundarios desagradables, como la nefrotoxicidad u ototoxicidad. Los mencionados deben aplicarse con cuidado porque su uso también puede provocar efectos secundarios físicos indeseables, como reacciones alérgicas relacionadas con la aplicación dérmica (Lang, 2012).

2.3.1.3 Costos

Además de una actividad eficaz de inhibición e inactivación del crecimiento microbiano, un antimicrobiano exitoso debe tener un "costo de uso" razonable. Debido a que la adición de antimicrobianos aumenta el costo por unidad de un producto terminado, los gastos en un antimicrobiano en su nivel requerido, vehículos inactivos (ingredientes inertes como glicerol y maltodextrina) y habilitadores (como tensioactivos y emulsionantes) tienen que justificar la mejora, estabilidad microbiológica y calidad de los productos. Teniendo en cuenta la economía general en muchos casos, una vida útil prolongada de al menos 2 – 3 días podría compensar el costo de un antimicrobiano, según el tipo de alimento. Aunque los antimicrobianos naturales son a menudo más caros que los productos químicos sintéticos debido a los procesos de producción y refinamiento y su menor estabilidad.

2.3.1.4 Efectos sensoriales

La influencia de los antimicrobianos en las características sensoriales (olor, sabor, textura, color) y la palatabilidad de un alimento es un factor principal para la aplicación de antimicrobianos naturales. Los sabores u olores de compuestos naturales podrían contribuir a los sabores y olores generales de los alimentos, que pueden ser deseables o indeseables. Se debe considerar cuidadosamente la compatibilidad sensorial de antimicrobianos seleccionados, especialmente aquellos con un aroma intenso, y el tipo de alimento (por ejemplo, un extracto de ajo probablemente no sea un antimicrobiano compatible para la leche, mientras que puede ser bueno para los productos cárnicos). Normalmente, se requiere una alta concentración de muchos compuestos de

origen natural, como los AE de plantas, para lograr una actividad antimicrobiana significativa en los alimentos, lo que provoca malos olores o sabores potencialmente inaceptables. El uso de múltiples antimicrobianos no solo podría afectar positivamente la actividad antimicrobiana, sino también podría ser beneficioso para reducir el impacto sensorial al reducir los niveles de uso por debajo de umbrales sensoriales inaceptables.

La elección del AE y su concentración, en un alimento en particular, es importante porque una pequeña cantidad puede provocar alteraciones sensoriales. El fuerte aroma de los AE puede afectar las propiedades organolépticas de los alimentos, pero las combinaciones sinérgicas de los AE entre sí o con otras técnicas de barrera pueden reducir este efecto (Mariod, 2016).

Un gran número de estudios ha demostrado sinergismo y antagonismo entre los AE o sus componentes y los conservantes o métodos de conservación de alimentos. Por ejemplo, la presencia de aditivos alimentarios como cloruro de sodio, nitrito de sodio y nisina y la aplicación de tratamientos térmicos, alta presión hidrostática y envases anaeróbicos deben considerarse cuidadosamente. Dadas las propiedades organolépticas del AE, su aplicación requiere una cuidadosa selección según el tipo de carne. En general, podrían incorporarse en productos cárnicos elaborados que están asociados con hierbas por tradición (Marques et al., 2015).

2.3.1.5 Interacciones de los componentes alimentarios

Las sustancias de origen natural que han demostrado tener una alta actividad antimicrobiana *in vitro* a menudo tienen poco o ningún efecto contra los objetivos microbianos en concentraciones similares cuando se incorporan a un sistema alimentario. Esto se debe a las interacciones con los componentes de los alimentos.

La carne representa un ecosistema natural en el que las condiciones ventajosas o desventajosas determinan la supervivencia y el crecimiento de algunas cepas específicas. Los microorganismos necesitan energía para su metabolismo, sustancias esenciales que no pueden sintetizar y componentes para la constitución de las células. Todos estos elementos necesarios se obtienen del entorno alimentario circundante y su presencia permite la

supervivencia efectiva de las cepas transmitidas por los alimentos durante la fase de latencia. En general, la carne es rica en proteínas, lípidos, minerales y vitaminas, pero pobre en carbohidratos; esta composición brinda una oportunidad para algunas especies en lugar de otras con diferentes necesidades de nutrientes. Después de la muerte microbiana, las enzimas intracelulares pueden catalizar la transformación de algunos nutrientes alimentarios a formas más simples, que pueden ser explotadas por otras especies. La presencia de factores de crecimiento e inhibidores naturales o químicos (aditivos como el nitrito) selecciona además cepas específicas (Lulietto et al., 2015).

Los productos de carne, aves y mariscos son probablemente los sistemas alimentarios más desafiantes para la aplicación de antimicrobianos porque no son homogéneos, tienen un pH alto y un alto contenido de proteínas y grasas. Estos factores intrínsecos son desfavorables para la mayoría de los antimicrobianos, especialmente los compuestos naturales, pero favorables para los microorganismos. Aunque la contaminación microbiana ocurre típicamente en la superficie de la carne y las aves de corral, el corte y la trituración dan como resultado cambios físicos de las matrices y esparcen los contaminantes por todos los productos. Esto afecta negativamente al rendimiento de los antimicrobianos naturales al obstaculizar aún más la interacción con los objetivos microbianos en comparación con los cortes grandes (Blaszyk y Holley, 1998; Buelvas Salgado, 2013).

2.4 Conclusiones

Como se pudo ver en el desarrollo de este capítulo, los aceites esenciales son mezclas complejas, poseen aroma y sabor característico, además tienen efectos antimicrobianos bien documentados, contra diferentes microorganismos y en muchos alimentos. Se conoce que la variabilidad de los aceites esenciales y sus rendimientos son diversos, que dependen de varios factores agroambientales, de los tratamientos efectuados sobre el material vegetal, de los métodos de extracción, entre otros.

Además, se dieron a conocer los desafíos de la aplicación de aceites esenciales en alimentos: la situación regulatoria argentina, mencionando el capítulo y los artículos del CAA en los que se contemplan aditivos; efectos

toxicológicos y alergénicos; costos; efectos sensoriales, ya que los sabores y aromas generales de los AE pueden ser deseables o indeseables para los consumidores; e interacciones de los componentes con la matriz alimentaria, que produce efectos diferentes respecto a los estudios realizados en los medios de cultivo.

Capítulo III

3. Marco teórico de salchichas tipo Viena

3.1 Introducción

En este capítulo se menciona la definición de salchichas tipo Viena, según el CAA, además se explica brevemente el proceso de elaboración, las especificaciones y requisitos que debe cumplir el producto, según el marco regulatorio, tanto en su composición como en los aditivos que se pueden adicionar a este alimento. También se contempla la microbiota natural existente en salchichas tipo Viena y se brindan algunas características particulares de las bacterias ácido lácticas, *Leuconostocaceae*, el género *Leuconostoc* y la especie *Leuconostoc mesenteroides*.

3.2 Salchichas tipo Viena

La inocuidad de los alimentos de origen animal para el consumo humano se ha convertido en un componente esencial de los debates de salud pública. La ecología microbiológica de los productos cárnicos depende, principalmente, del medio ambiente, del tipo de carne y materia prima, del equipo, de las prácticas de manipulación, del procesamiento, del embalaje y de la temperatura de almacenamiento.

La vida útil de un producto es el período de tiempo durante el cual el alimento conserva sus características cualitativas. Las bacterias asociadas con el deterioro de la carne producen olores y sabores poco atractivos, decoloración, gases y limo. El limo viscoso es una alteración típica de la superficie de los productos cárnicos cocidos envasados al vacío y en atmósfera modificada, que provoca importantes pérdidas económicas debido a los cada vez más sofisticados requisitos del consumidor (Lulietto et al., 2015).

Tradicionalmente, el control de microorganismos en los alimentos se ha demostrado mediante pruebas microbiológicas de muestras en varias etapas de producción, incluido el producto final. El potencial de crecimiento y / o producción de toxinas de la población microbiana residual en productos terminados depende del tipo de organismos presentes y su capacidad de crecer hasta un nivel de

preocupación, bajo las condiciones de almacenamiento aplicadas durante la vida útil del producto (Aiyegoro, 2014).

Las condiciones ambientales de la carne durante las diferentes etapas de su producción y comercialización crean un nicho ecológico específico, que favorece algunas cepas microbianas inicialmente presentes en la carne o introducidas por contaminación cruzada, mientras que otras cepas se encuentran en desventaja. La prevalencia de una cepa microbiana particular depende de factores que persisten durante el procesamiento, transporte y almacenamiento. El almacenamiento a temperaturas de refrigeración limita el crecimiento de solo el 10 % de la microbiota total y, cuando corresponde, los tratamientos térmicos eliminan la mayoría de las células vegetativas. Por lo tanto, la vida útil puede variar de días a varios meses y está estrictamente vinculada a la recontaminación posterior al procesamiento. Durante el almacenamiento, la microbiota dominante puede provocar el deterioro y liberación de compuestos volátiles o formación de limo; como consecuencia, el producto se vuelve inaceptable para el consumo humano (Lulietto et al., 2015).

En la bibliografía se ha documentado la presencia de bacterias del género *Leuconostoc* en salchichas cocidas envasadas al vacío. En la materia prima (carne cruda) y en las superficies de la planta procesadora se encontró una baja concentración de dicho género, pero en las salchichas cocidas la concentración aumentó en casi un 98 % (Hultman et al., 2015). Los microorganismos frecuentemente relacionados con el deterioro de la salchicha envasada al vacío son las bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente algunas especies de bacilos lácticos y los géneros *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Ceja Farias et al., 2018). Justamente, el aumento en la concentración de CO₂ que se encuentra en los paquetes durante el almacenamiento puede atribuirse a los subproductos metabólicos de bacilos lácticos heterofermentativos y diversas especies de *Leuconostoc*. La hibridización ADN-ADN ha mostrado que cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subespecie *mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides* y *Leuconostoc gelidum* son causantes de deterioro (Korkeala et al., 1997).

Padilla-Frausto et al. (2015) identificaron las fuentes de contaminación con cepas de *Leuconostoc* en una planta de procesamiento de salchichas tipo Viena, evaluando, además, la diversidad genética de las cepas aisladas.

Muestras tomadas de diferentes superficies de equipos, de las materias primas y del producto elaborado, mostraron el mismo género y la misma especie. Posiblemente las mismas cepas están presentes en diferentes lugares, equipos, cintas transportadoras y etapas del procesamiento, en la planta industrial (Padilla-Frausto et al., 2015).

Según estudios realizados por Diez et al., (2009), en general, las especies del género *Leuconostoc* crecen más rápidamente, debido a que su metabolismo es más eficiente energéticamente, lo que influye de manera significativa en la caída de pH, producción de exudado lechoso y aroma agrio y/o ácido. El crecimiento de estas bacterias está asociado con la aparición de ciertos compuestos volátiles tales como aldehídos y ácidos orgánicos.

Se sabe, en general, que las bacterias ácido lácticas pueden producir cambios sensoriales tanto como en la apariencia física en las salchichas envasadas al vacío que presentan deterioro. Korkeala y Björkrot (1997) han estudiado los mecanismos de deterioro sensorial en el producto mencionado. Los cambios sensoriales son producidos por el crecimiento de bacterias ácido lácticas en la superficie de las salchichas. Además de estos cambios, fue observado un exudado viscoso dentro de los paquetes durante el almacenamiento. Las formas especiales de deterioro que afectan negativamente la apariencia de las salchichas son la formación de limo o limo viscoso en las superficies de la salchicha (Korkeala y Björkrot, 1997).

Los cambios sensoriales producidos por las BAL aparecen mucho más tarde que cuando las bacterias alcanzan la fase de crecimiento estacionaria. El período de tiempo antes de que los cambios de deterioro se vuelvan detectables aumenta a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento. Es importante conocer las fuentes y los tipos de microbiota normal y sus niveles iniciales en un producto alimenticio para que la selección del tipo de antimicrobiano y la dosis sean adecuados (Korkeala y Björkrot, 1997).

Las cepas de bacterias productoras de limo viscoso pueden sobrevivir en el agar de MRS (el nombre MRS se origina en la fórmula de Man, Rogosa y Sharpe (1960) (Carr et al., 2008)) a temperaturas inferiores a 0 °C: la temperatura mínima de crecimiento es inferior a -1 °C para algunos bacilos lácticos y 4 °C para *Leuconostoc* spp., la temperatura máxima de crecimiento fluctúa entre 36.6 °C y 39.8 °C. Esta temperatura de crecimiento mínima y baja

permite que estas bacterias sobrevivan y compitan con otras bacterias en productos cárnicos y plantas procesadoras de carne. En consecuencia, el uso de bajas temperaturas en la preparación y almacenamiento de productos cárnicos no evita la formación de limo viscoso, aunque la temperatura de almacenamiento en refrigeración determina una vida útil más larga del producto. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C y normalmente no se alcanzan temperaturas tan elevadas durante el almacenamiento de productos cárnicos, a pesar de los abusos de temperatura (Lulietto et al., 2015).

3.2.1 Definición

“Se entiende por salchicha tipo Viena, al embutido cocido, elaborado sobre la base de carne de cerdo y vacuno, con el agregado de tocino, sal y especias, escaldadas y luego ahumadas hasta obtención de color moreno claro superficial con un contenido máximo de 1196 mg de sodio/100 g de producto”, según el artículo 349 (Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 1 - E/2017), del capítulo VI del CAA.

3.2.2 Proceso de elaboración de salchichas

Como se mencionó, previamente, las salchichas se clasifican como embutidos cocidos.

La salchicha es un producto cárnico cuya elaboración pasa por varias etapas: desde el picado de los ingredientes hasta la obtención de una masa (es indispensable un mezclador para formar una emulsión) a la cual se añade agua o hielo y aditivos (como los fosfatos y nitritos para favorecer la fijación del agua y dar estabilidad a la masa), hasta ser embutido en tripa natural o sintética (como el celofán).

Después del relleno, las salchichas reciben un tratamiento térmico que coagula las proteínas y le dan una estructura firme y elástica; posteriormente se ahúman para darles un sabor específico (FAO et al., 2014). Las salchichas se enfrían, y algunos tipos se pelan y / o se cortan en rodajas antes del envasado. El envasado al vacío de salchichas se ha vuelto muy popular. Las ventajas de los envases al vacío son el manejo higiénico de las salchichas, una mayor vida

útil, buenas posibilidades de etiquetado y mejores posibilidades de descontaminación (Korkeala y Björkrot, 1997).

Su composición varía de marca a marca: mientras unas contienen carne de cerdo, otras llevan res, pavo, pollo o alguna mezcla de éstos. Con respecto a sus ingredientes, el principal es el agua (que varía del 46 % al 70 % entre las diferentes marcas del mercado), además de la carne y los aditivos, a los que pueden adicionarse otros ingredientes como proteína no cárnica (soja o proteína de leche), almidones y grasas (casi siempre de cerdo). Pero la incorporación de estos ingredientes se hace a costa del contenido de carne, con lo cual se abarata el producto (FAO et al., 2014). Tanto ingredientes como aditivos, se utilizan para retener la humedad y modificar la textura. Los ingredientes tecnofuncionales que mejoran la funcionalidad de la proteína de la carne consisten en cloruro de sodio, fosfatos, carbonatos y citratos; mientras que los que se agregan para ayudar en la retención de humedad y grasa, así como en la modulación de la textura, incluyen almidones, harinas, hidrocoloides, fibras vegetales y proteínas vegetales y animales (Balestra y Petracci, 2019). Los aditivos permitidos, como los nitratos y nitritos (con función conservante), retrasan o previenen el crecimiento de algunos microorganismos resistentes al tratamiento térmico al que se someten las salchichas (INTI, 2010).

Luego del envasado al vacío se almacenan y se distribuyen (INTI, 2010).

En la figura 3.1. se muestra un esquema general del proceso de elaboración de salchichas tipo Viena.

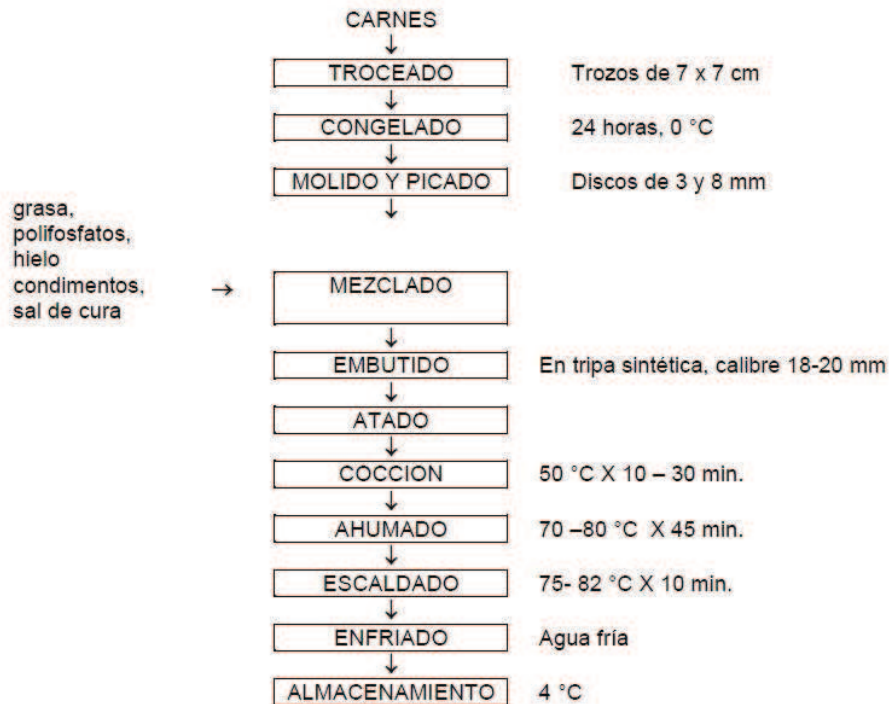


Fig. 3.1. Esquema general del proceso de elaboración de salchichas tipo Viena.

3.2.3 Marco regulatorio

El ente nacional regulador de alimentos es el ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). La Ley 18284 declara vigente en todo el territorio de la República Argentina, con la denominación de Código Alimentario Argentino (CAA), las disposiciones higiénico-sanitarias, bromatológicas y de identificación comercial del Reglamento Alimentario aprobado por Decreto 141/1953. En el capítulo VI “Alimentos Cárneos y afines”, de dicho código se establece la definición, el agregado o no de aditivos y en qué proporción se pueden adicionar, y todo lo concerniente a parámetros químicos y microbiológicos para que las salchichas tipo Viena sean aptas para consumo humano.

En el artículo 322, del mencionado capítulo del CAA, se menciona que el porcentaje de agua o hielo adicionado no podrá exceder el 25 % del peso total de la masa; siendo que el producto terminado no podrá contener más del 78 % de agua.

Según el Decreto 4238/68 de SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) en el capítulo XVI se establece que son embutidos cocidos, de acuerdo con la definición de los apartados 16.1.1 y 16.1.5, los

siguientes chacinados entre otros: burzot, morcilla, mortadela, salchicha tipo Frankfurt, salchicha tipo Viena, salchichón con jamón (Decreto PEN N° 6326 del 18/09/1972). Específicamente en el inciso 16.8.8 con el nombre de *salchicha tipo Frankfurt o tipo Viena*, se entiende el embutido cocido, elaborado sobre la base de carne de cerdo o carne de cerdo y vacuno con el agregado de tocino, sal y especias. Al finalizar el proceso se escaldan y se someten al ahumado hasta la obtención del color moreno claro. Como también se menciona en el CAA, en el inciso 16.5.11 se establece que en el caso de chacinados cocidos (salchicha tipo Viena, Frankfurt), el porcentaje de agua o hielo adicionado no podrá exceder el veinticinco (25) por ciento del peso total de la masa. El producto terminado no podrá contener más de setenta y ocho (78) por ciento de agua.

Cabe mencionar que el organismo de control para que se cumpla el CAA en nuestro país, es el SENASA, el cual se encarga de ejecutar políticas nacionales en materia de sanidad y calidad animal, vegetal e inocuidad de los alimentos. En el Decreto 4238/68, mencionado en el párrafo anterior, se contempla todo lo referido a la industria cárnica, desde habilitaciones, construcción, normas higiénico – sanitarias, cámaras frigoríficas; hasta salazones, chacinados, conservas, aditivos, productos de pesca, aves, huevos, y lo concerniente a transporte, embalaje y rotulado.

En el artículo 302 (Resolución Conjunta SPRel N° 179/2012 y SAGyP N° 715/2012) del capítulo VI del CAA, se entiende por chacinados, los productos preparados sobre la base de carne y/o sangre, vísceras u otros subproductos animales que hayan sido autorizados para el consumo humano, adicionados o no con substancias aprobadas a tal fin. Los chacinados clasificados en embutidos (frescos, secos y cocidos) y no embutidos (frescos y cocidos) deberán cumplir con las siguientes especificaciones microbiológicas de acuerdo a su clasificación. En la tabla 3.1. se muestran los criterios de aceptación microbiológica de los chacinados embutidos cocidos que incluyen a las salchichas tipo Viena.

Tabla 3.1. Criterios de aceptación microbiológica de los chacinados embutidos cocidos.

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología (1)
Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	n=5, c=2, m=10 ⁴ , M=10 ⁵	ISO 4833:2003 BAM-FDA:2001
Recuento de <i>Escherichia coli</i> (NMP/g) (2)	n=5, c=0, m<3	ISO 16649-3:2005 ICMSF (método1) BAM-FDA:2002 (método 1)
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 6888-1:1999 ICMSF
Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	ISO 21527-2:2008; BAMFDA:2001, APHA:2001
Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 15213:2003
<i>E. coli</i> O157:H7/NM	n=5, c=0 ausencia en 65 g	USDA-FSIS:2010 ISO 16654:2001 BAM-FDA:2011
<i>Salmonella</i> spp.	n=5, c=0 ausencia en 25 g	ISO 6579:2002; Co: 2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS: 2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	n= 5, c=0, ausencia en 25 g	ISO:11290-1:1996 Amd: 2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS: 2009

Donde:

n: número de muestras examinadas de un lote.

c: número máximo permitido de unidades de muestra defectuosas (plan de dos clases) o marginalmente aceptables (plan de 3 clases).

m: límite microbiológico (concentración máxima permitida de un microorganismo) que, en un plan de dos clases, separa la calidad aceptable de la rechazable y en un plan de tres clases separa la calidad aceptable de la marginalmente aceptable.

M: límite microbiológico que en un plan de tres clases separa la calidad marginalmente aceptable de la rechazable.

(1) o su versión más actualizada

(2) para chacinados frescos, embutidos y no embutidos, se puede utilizar técnica de recuento en placa según ISO 16649-2, expresando el resultado UFC/g.

Cabe mencionar que *Escherichia coli* O157:H7/NM es el serotipo prevalente asociado al síndrome urémico hemolítico.

El CAA aplica los criterios de la ICMSF para los planes de muestreo por atributos; considerando planes por atributos de dos o tres clases, para evaluaciones microbiológicas.

Un plan de muestreo de dos clases es un plan de muestreo por atributo donde la calidad de un producto puede dividirse en 2 grados de calidad (aceptable o rechazable). Se define mediante los valores n , c y m . Se considera no conforme todo elemento contaminado que presente una concentración superior a m .

Un plan de muestreo por atributos de tres clases se define mediante los valores n , c , m y M y se aplican en casos en los que la unidad de muestra puede dividirse en tres clases de atributos dependiendo de la concentración de microorganismos: calidad inaceptable (con un valor $> M$), calidad aceptable (con un valor $\leq m$) o calidad marginalmente aceptable (con un valor $> m$ pero $\leq M$) (esas concentraciones no son deseables, aunque pueden admitirse en algunas unidades).

En el año 2010 el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) llevó a cabo la evaluación del producto “salchichas tipo Viena”, encuadrada en el Programa Pruebas de desempeño de productos (PDP). El objetivo principal de este programa es mostrar una situación del mercado en el período de realización de los análisis. El producto “salchicha tipo Viena” fue seleccionado para estas pruebas por tratarse de un producto de consumo masivo, con una gran proporción de niños entre los consumidores habituales (INTI, 2010).

El producto utilizado en la presente tesis, se evaluó en esta prueba de desempeño. Se realizaron ensayos microbiológicos y fisicoquímicos. Los resultados de los ensayos microbiológicos se pueden apreciar en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Resultados de los ensayos microbiológicos de salchichas tipo Viena.

Marca	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Clostridios sulfito reductores (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Salchicha tipo Viena sin piel	<10	<100	20	<10	<10	Ausencia	Ausencia

Cabe aclarar que las expresiones < 10 y < 100 representan los límites de detección de los métodos utilizados. En este punto, la marca en estudio cumple con los requisitos establecidos por el CAA.

En la tabla 3.3. se pueden ver los resultados de los ensayos fisicoquímicos realizados a nuestro producto en estudio.

Tabla 3.3. Resultados de los análisis fisicoquímicos a salchichas tipo Viena.

Marca	Grasa total (%)	Humedad (%)	Almidón (%)	Nitrito de sodio (g/100g)	Nitrato de sodio (g/100g)	Contenido de soja (g/100g)	Presencia de carne de ave	Proteínas (g/porción)	Grasas totales (g/porción)	Sodio (mg/porción)
Salchichas tipo Viena sin piel	14	56	5.1	0.006	0.01	3.9	Ausencia	5.1	5.5	328

Se puede concluir que la muestra analizada cumple con las especificaciones del CAA. En cuanto al contenido de soja en la muestra, no está

en la lista de ingredientes y no se menciona en la denominación del producto, pero lo contiene en un porcentaje mayor al establecido por el CAA. En la sección 7.2.1.1 (Emulsión del aceite esencial con agua), se menciona el artículo en el cual se contempla la adición de soja a los productos cárnicos. El valor de sodio medido no coincide con el especificado en el rótulo nutricional del producto en estudio, ya que menciona que contiene 165 mg/porción, cuando en realidad contiene 328 mg/porción.

Además, se evaluaron las características de las salchichas tipo Viena en envase cerrado y se concluyó que el aspecto general, tanto integridad como limpieza del envase, era correcto; la condición de vacío también era correcta, y la presencia y características del exudado también eran correctas en la muestra analizada.

3.2.4 Microbiota natural

Como hemos comentado previamente, las bacterias ácido lácticas son consideradas como los principales microorganismos responsables de los procesos de alteración de productos cárnicos. Para los productos cárnicos, la microbiota total inicial es de aproximadamente $10^2 - 10^3$ UFC/g, que consta de una gran variedad de especies (Lulietto et al., 2015). Los límites de calidad aceptables de los recuentos de BAL que se encuentran en la literatura para productos cárnicos cocidos oscilan entre 10^6 y 10^8 UFC/g (Badia et al., 2019).

En ciertas ocasiones puede ocurrir que algunos de estos microorganismos inicialmente tengan una función protectora, debido a que tienen la capacidad de controlar microorganismos patógenos y alterantes; pero secundariamente éstos mismos degradan los carbohidratos y producen metabolitos finales que son organolépticamente indeseables, atentando contra la vida útil del producto (Buelvas Salgado, 2013).

Algunos investigadores (Borch et al., 1996; Lulietto et al., 2015) han encontrado que las bacterias asociadas con el deterioro de los productos cárnicos refrigerados, que causan defectos como sabores agrios, decoloración, producción de gas, producción de limo y disminución del pH, consisten en *Brochotrix thermosphacta*, *Carnobacterium* spp., diversas especies de bacilos lácticos, *Leuconostoc* spp. y *Weissella* spp. Además, (Padilla-Frausto et al., 2015) han encontrado que, con frecuencia, cepas de *Leuconostoc* spp. han

estado implicadas en el deterioro de los productos cárnicos listos para consumir. En concordancia, Khorsandi et al. (2018) aislaron e identificaron (16S rARN), a *Leuconostoc mesenteroides* como una de las principales BAL de deterioro en salchichas cocidas envasadas al vacío. El deterioro de las salchichas envasadas al vacío causadas por cepas de *Leuconostoc* se caracteriza por la producción de limo y gas. El crecimiento de BAL reduce la calidad de productos como las salchichas tipo Viena durante condiciones de almacenamiento prolongadas a baja temperatura. Estas bacterias producen sabores agrios, decoloración, gases, limo y exudados lechosos (Dykes et al., 1991).

Dykes et al. (1991) examinaron las fuentes de contaminación de las salchichas tipo Viena envasadas al vacío por microorganismos de descomposición, en una planta procesadora de carne. En concordancia con los autores mencionados anteriormente, encontraron que las bacterias ácido lácticas, contaminan las superficies de las salchichas tipo Viena, como resultado de los procesos de fabricación y manipulación. Confirmaron, además, la eficacia del procedimiento de cocción para destruir la alta carga microbiana de la emulsión cruda; no detectándose bacterias ácido lácticas después del mismo. Observaron una acumulación de todos los grupos de microorganismos en las superficies del producto después del pelado y después del contacto con la mesa de empaque y las manos de los empacadores. En la emulsión encontraron una concentración de bacterias ácido lácticas de 10^5 UFC/g y luego del pelado una concentración de 10^3 UFC/g.

Por su parte, von Holy et al. (1990) encontraron, en muestras de salchichas tipo Viena ahumadas envasadas al vacío con deterioro, que las bacterias ácido lácticas predominaron a niveles de $10^7 - 10^8$ UFC/g de producto (aproximadamente 10^9 UFC/g en muestras de exudado), mientras que en muestras sin deterioro fueron sólo $10^3 - 10^4$ UFC/g. La caracterización de los organismos predominantes indicó que las poblaciones en muestras dañadas estaban dominadas por cepas de bacilos lácticos homofermentativos (58.0 %) y leuconostoc (36.3 %).; mientras que los bacilos lácticos heterofermentativos y los pediococos predominaron en las muestras no deterioradas (von Holy et al., 1990). En concordancia, (Nychas et al., 2008) caracterizaron la microbiota causante de la pérdida de calidad de los productos cárnicos durante la distribución, atribuyendo su deterioro a las bacterias ácido lácticas, dentro de las

cuales el género *Leuconostoc* y diversas especies de bacilos lácticos se encuentran presentes con alta frecuencia en los productos cárnicos.

En un estudio realizado por Hultman et al. (2015) se caracterizó el tipo de microbiota y se estudió el vínculo entre la planta de procesamiento y los microbiomas del producto, comparando la microbiota asociada con las materias primas y las etapas de procesamiento de un producto de salchicha cocido, envasado al vacío, afectado por una fluctuación de calidad prolongada, con manifestaciones ocasionales de deterioro durante la vida útil. La microbiota en esta planta procesadora de alimentos tenía un microbioma característico, diferente al de las salchichas cocidas durante la vida útil del producto. Se detectó *Yersinia* spp. en las superficies, pero no en las salchichas cocidas; en tanto que, en las materias primas, *Brochothrix* fue uno de los géneros más abundantes, mientras que el género *Leuconostoc* apenas estuvo presente en las superficies y las materias primas. Con base en los patrones de abundancia observados, *Leuconostoc* spp. no causa el deterioro de los productos debido a los altos niveles de contaminación inicial ya que no eran abundantes en las materias primas o superficies, pero evidentemente pueden crecer durante la sucesión microbiana en las condiciones de empaque y almacenamiento utilizadas. Por lo tanto, la gran abundancia de *Leuconostoc* spp. en la vida útil del producto puede considerarse debido a la capacidad de crecimiento eficiente que esta especie tiene en salchichas envasadas al vacío (Hultman et al., 2015).

En una investigación realizada por otros autores (Padilla-Frausto et al., 2015) se identificaron las fuentes de deterioro en una planta procesadora de salchichas y se evaluó la diversidad genética de las cepas aisladas de *Leuconostoc*. La concentración de BAL en la emulsión de salchichas fue de 10^7 UFC/g, en la salchicha cocida y envasada de 10^2 UFC/g, en salchichas en mal estado de 10^8 UFC/g, con una incidencia de *Leuconostoc* spp. de 100 %, de 30 %, y 100 %, respectivamente. La presencia de *Leuconostoc* spp. en salchichas envasadas observadas en el estudio, constituye un riesgo potencial de deterioro de los alimentos; con lo cual este riesgo podría ocurrir si el control de la temperatura de almacenamiento es deficiente. Realizaron el genotipado de las cepas de *Leuconostoc*, encontrándose que *Leuconostoc mesenteroides* es la especie más comúnmente asociada con productos cárnicos cocidos en mal estado.

3.2.4.1 *Leuconostoc mesenteroides*

Como se menciona en el Manual de Bergey (Bergey, 2009), el género *Leuconostoc* está dentro de la familia V *Leuconostocaceae*, que comúnmente se llaman bacterias ácido lácticas, de la clase I *Bacilli* y el phylum XIII *Firmicutes*. Recientemente (Zheng et al., 2020), se estableció que la familia *Lactobacillaceae* incluye todos los géneros previamente contenidos en las familias *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae*, es decir, *Convivina*, *Fructobacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus* y *Weissella*.

A continuación, daremos algunas características particulares de las bacterias ácido lácticas, *Leuconostocaceae*, el género *Leuconostoc* y la especie *Leuconostoc mesenteroides*.

3.2.4.1.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas, se agrupan como homofermentativas o heterofermentativas en función del producto final de su fermentación.

- Las bacterias homofermentativas: producen ácido láctico como principal producto de la fermentación de la glucosa; poseen la enzima aldolasa y son capaces de fermentar glucosa más directamente a ácido láctico que los heterofermentativas.
- Las bacterias heterofermentativas producen una serie de productos además del ácido láctico, que incluyen dióxido de carbono, ácido acético y etanol a partir de la fermentación de glucosa; utilizan la vía alternativa de pentosa monofosfato, convirtiendo azúcares de seis carbonos (hexosas) en azúcares de cinco carbonos (pentosas) mediante la enzima fosfocetolasa, produciendo en el proceso tanto aldehído como diacetilo, sustancias aromáticas y potenciadoras del sabor muy deseables (Carr, 2008).

Las bacterias lácticas se han caracterizado, principalmente, por su capacidad para formar varios isómeros de ácido láctico a partir de la fermentación de glucosa. El tipo y la cantidad de ácido láctico que se forma durante la fermentación es fundamental en la fabricación de alimentos y juega un papel destacado en la clasificación taxonómica. El ácido láctico se puede extraer del producto de fermentación y se puede determinar la capacidad de rotar

ópticamente la luz. Si la rotación es hacia la derecha, se denomina Dextrógiro (D); si la rotación es hacia la izquierda, se denomina Levógiro (L), o, si hay una mezcla de D y L, se denomina racémico (DL) (Carr et al., 2002).

3.2.4.1.2 *Leuconostocaceae*

La principal característica del grupo *Leuconostocaceae* es la producción, exclusiva o no, de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. Hasta la fecha, comprende cinco géneros: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Convivina* y *Fructobacillus*.

Todos los miembros del grupo *Leuconostocaceae* son bacterias Gram positivas, no esporuladas, que presentan un contenido de GC en su ADN inferior al 50 %. Se desarrollan en condiciones anaeróbicas o aeróbicas y, por lo general, no poseen catalasa. Son anaerobios tolerantes y en los medios de cultivos sólidos forman colonias en presencia de aire (Parra Huertas, 2010). Suelen ser mesófilos, cultivados a temperaturas en torno a los 30 °C. El rango de pH óptimo para su multiplicación varía según el género, la especie e incluso la cepa, pero sobre todo es de 6 o superior. Al igual que los otros grupos de bacterias ácido lácticas, necesitan medios complejos para su crecimiento, debido a su necesidad de aminoácidos, péptidos, carbohidratos, vitaminas e iones metálicos. La mayoría de las cepas tipo descritas se han aislado en agar de MRS. Son bacterias quimioorganotróficas exigentes; por lo que, los medios de cultivo son ricos en nutrientes, tienen compuestos esenciales en común, como glucosa, peptona, extracto de carne o levadura, fosfato de potasio (o sodio), manganeso y sulfato de magnesio. La adición de fructosa suele ser beneficiosa, pero para algunas especies es indispensable. Se pueden agregar otros ingredientes, como Tween 80, que generalmente aumenta el crecimiento de *Leuconostoc* al proporcionar ácido oleico incorporado en la membrana celular. El jugo de tomate también es reconocido como un proveedor de factores de crecimiento para algunos de ellos (Lonvaud-Funel, 2014).

El grupo *Leuconostocaceae* comparte principalmente su hábitat con otras bacterias ácido lácticas, especialmente en material vegetal. Muchos están aislados de la superficie de una gran diversidad de verduras y frutas, de carnes en mal estado refrigeradas y envasadas al vacío, y de productos pesqueros y lácteos. Se consideran no patógenos excepto algunas cepas de fuentes clínicas

que son resistentes a la vancomicina, las cuales han sido calificadas como patógenos oportunistas, relacionados a casos de infecciones en humanos (Lonvaud-Funel, 2014).

3.2.4.1.3 Género *Leuconostoc*

Las bacterias del género *Leuconostoc* se pueden encontrar en la leche y los productos lácteos. Además, se encuentran comúnmente en la superficie y el interior de frutas y verduras, jugando un papel destacado en la fermentación durante la producción de chucrut, encurtidos y diversas carnes (Carr, 2008). Tienen un papel tecnológico importante en la fabricación de los productos lácteos, más particularmente, para la producción de aromas y textura del queso francés. Debido a que varios aislamientos de *Leuconostoc* también se asociaron con el deterioro de carnes envasadas al vacío, crudas o cocidas, almacenadas en frío o con infecciones generalizadas de adultos inmunodeprimidos, existe la necesidad de una identificación precisa tanto a nivel de cepa como de especie (Cibik et al., 2000).

Además, las bacterias de este género son heterofermentativas y tienen requisitos nutricionales complejos (Carr et al., 2008). En el trabajo de este último autor se menciona que el género *Leuconostoc* crece a 10 °C y a 45 °C, no crece en NaCl al 6.5 % y presenta formación de gas a través de la fermentación de la glucosa, en concordancia con otros estudios (Cuervo Mulet et al., 2010).

3.2.4.1.4 Especie: *Leuconostoc mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides ha sido aislada de diferentes fuentes. Algunas de sus cepas son capaces de producir bacteriocinas, y la mayoría muestran actividad anti-*Listeria*. Además, la especie *Leuconostoc mesenteroides* puede ser un candidato probiótico; estudios prometedores han demostrado el potencial de esta especie para sobrevivir y crecer bajo diversas condiciones de estrés presentes en el tracto gastrointestinal. Por otro lado, este microorganismo puede causar deterioro en algunos tipos de matrices alimentarias y escasos informes han demostrado el potencial patógeno de esta especie (De Paula et al., 2014). En concordancia, el biólogo Edgar Zárate Sarapura, menciona que *Leuconostoc mesenteroides* es considerada como la especie bacteriana alterante con mayor actividad de putrefacción de salchichas y emulsiones

cárnicas envasadas al vacío y otras carnes procesadas que se almacenan bajo temperaturas de refrigeración (Zarate Sarapura, 2007).

Esta especie está formada por células Gram positivas, catalasa negativas, no móviles, no formadoras de esporas, esféricas o lenticulares (especialmente cuando se cultivan en agar), dispuestas en pares o cadenas. Las colonias son pequeñas (menos de 1.0 mm de diámetro), lisas y de color blanco grisáceo. El crecimiento es facultativamente anaeróbico, con sedimentación cuando se forman largas cadenas de células. El crecimiento ocurre entre 5 °C y 30 °C, con un crecimiento óptimo entre 20 °C y 30 °C. No hidrolizan la arginina y la leche rara vez se acidifica y cuaja. No son proteolíticas, no forman indol y no reducen los nitratos. No fermentan el acetato y el tartrato. Su crecimiento es a pH 6.5, pero no a pH 4.8 y no en presencia de etanol al 10 % (v/v). Son bacterias no hemolíticas. Forman ácido láctico D (-) y dióxido de carbono a partir de la fermentación de glucosa. Hasta el momento se conocen tres subespecies que incluyen *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Bergey, 2009).

3.2.4.2 Aislamiento, purificación y tipificación

La identificación de microorganismos de descomposición muestra dos enfoques diferentes: métodos dependientes del cultivo e independientes del cultivo. El primer procedimiento consiste en el aislamiento preliminar y el cultivo de microorganismos aislados de una muestra de alimento y la posterior identificación de una única unidad formadora de colonia en medios nutritivos y selectivos. Los enfoques independientes del cultivo, por otro lado, no necesitan un cultivo preliminar, sino que las cepas se pueden detectar directamente en la muestra de alimento mediante un análisis de ADN y ARN, que también es eficaz para cepas en una concentración baja.

A partir de los años 80 se identificaron bacterias productoras de limo viscoso mediante medios selectivos y se investigó la fermentación del azúcar con API 50 CH y la secuenciación del ARN ribosómico 16S (Korkeala et al., 1988). Cabe aclarar que API 50 CH es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los carbohidratos en los microorganismos. En las plantas de producción industrial,

los métodos de recuento en placa en MRS agar se utilizan en la evaluación de la calidad microbiana de los productos cárnicos envasados en atmósfera modificada (MAP: Modified Atmosphere Packaging) en toda la planta de procesamiento, con el fin de aislar cepas de BAL. Para obtener información detallada de la composición o el origen de la microbiota, se realiza la identificación fenotípica y/o molecular y la tipificación de colonias purificadas. Las técnicas moleculares en ecología microbiana han cambiado la forma de estudiar la diversidad microbiana. De hecho, permiten la identificación y tipificación rápida y fiable de microorganismos, normalmente mediante la detección de polimorfismos de ADN entre especies o cepas (Lulietto et al., 2015).

3.2.5 Industria frigorífica

Un dato complementario a tener en cuenta, es que, la industria de chacinados en Argentina elabora una amplia gama de productos, los cuáles se agrupan en dos grandes segmentos: chacinados (embutidos y no embutidos) y salazones (jamón crudo y cocido). La producción argentina de chacinados se compone principalmente por fiambres cocidos (22 %), salchichas tipo Viena (20 %), embutidos frescos (chorizos) (14 %) y embutidos cocidos (otras salchichas) (16 %). La industria de fiambres y chacinados se abastece (entre otras materias primas) de cerdos en pie que compra directamente a los productores de porcinos, y de canales y cortes frescos que adquiere de mataderos y/o despostaderos (OBRA, 2017).

Más del 99.5 % de la producción de chacinados se destina a consumo interno. Mayoritariamente, los productos llegan a la boca de expendio a través de distribuidores y, en menor medida, la distribución la realiza la misma fábrica. Los puntos de venta más importantes, por el volumen comercializado, son los minoristas y mayoristas (70 %) en relación con las grandes superficies. La comercialización también tiene una particularidad en la que se asocia el tipo de producto con la boca de expendio: a) mayoristas y minoristas: se destaca la venta de embutidos secos y salazones secas; b) supermercados: fiambres; c) mercado caliente: salchichas tipo Viena y hamburguesas (CAICHA, 2017).

3.3 Conclusiones

Como se pudo ver a través del desarrollo del capítulo, en el CAA están contempladas las especificaciones fisicoquímicas y los parámetros microbiológicos que deben cumplir las salchichas tipo Viena. Además, se explica brevemente el proceso de elaboración del producto mencionado y se indican datos de producción y consumo interno de la industria de chacinados en Argentina.

También se realizó un estudio del arte de la microbiota de las salchichas tipo Viena, en muestras con y sin deterioro. Se concluye que una de las principales especies bacterianas causante de deterioro en salchichas tipo Viena es *Leuconostoc mesenteroides*. Los recuentos iniciales de bacterias ácido lácticas en productos con deterioro rondan $10^7 - 10^8$ UFC/g, mientras que la concentración inicial del producto sin deterioro está entre 10^2 y 10^3 UFC/g.

Al final de este capítulo se describe la taxonomía de *Leuconostoc mesenteroides*, mencionando las características principales del género y la especie.

Capítulo IV

4. Obtención de extractos naturales

4.1 Introducción

En el presente capítulo se explican las condiciones utilizadas para la obtención de extractos naturales (aceites esenciales y oleorresinas), llevadas a cabo en nuestro laboratorio. Se explicita la preparación del material vegetal usado y el origen del mismo.

Además, se muestran los rendimientos de las extracciones de algunos de los AE obtenidos, comparados con otros autores.

Al mismo tiempo, se explica la técnica utilizada para determinar el contenido total de polifenoles en extractos de semillas, obtenidos tanto por extracción asistida por microondas, como por extracción asistida por ultrasonido.

También se mencionan las características de los aceites esenciales comerciales, brindadas por los fabricantes.

4.2 Preparación del material vegetal

Para nuestro caso, el material se lavó y se dispuso a secar a temperatura ambiente y dentro de las instalaciones del laboratorio. Luego de que el material tuviera alrededor del 10 % de humedad se procedió a molerlo para realizar la posterior extracción. El tiempo de secado, dependiendo del material, puede ser desde tres días (en el caso de *Aloysia polystachya*) hasta 10 días (*Laurus nobilis*). Las semillas tienen un período de secado entre 7 y 10 días.

Las cáscaras de cítricos se utilizaron frescas. A continuación, se explica el procedimiento llevado a cabo para realizar la extracción.

4.3 Obtención de extractos naturales

Se obtienen extractos naturales (aceites esenciales y oleorresinas) utilizando diferentes técnicas de extracción como ser arrastre con vapor de agua, extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas.

Como complemento a lo explicado en la sección 2.2.5 (Preparación del material vegetal) las hojas y flores se lavaron y se dispusieron a secar, a

temperatura ambiente, dentro de las instalaciones del laboratorio. Luego de que el material tuviera un porcentaje de humedad alrededor del 10 % se procedió a molerlo para realizar la posterior extracción. El material vegetal seco se molió con un picador doméstico a máxima velocidad (Moulinex, 750W) por el término de 2 minutos. En la figura 4.1. se muestra el material seco antes de picar y posterior al picado, en este caso, como ejemplo, de *Eucalyptus tereticornis*.

Las cáscaras de cítricos se lavaron y se procedió a picarlas, sin secarlas, hasta el tamaño que se ve en la figura 4.2. En esta figura se aprecia cáscara de *Citrus lemon* picada para su posterior extracción.



Fig. 4.1. Imagen de hojas de *Eucalyptus tereticornis*, antes y después del picado.



Fig. 4.2. Recipiente con cáscara de limón (*Citrus lemon*) picada para proceder a la extracción de AE.

Los materiales vegetales que se utilizaron, para la obtención de extractos naturales fueron los siguientes:

- hojas secas de: laurel (*Laurus nobilis*), eucalipto (*Eucalyptus cinerea* y *Eucalyptus tereticornis*), menta (*Mentha piperita L.*),

peperina (*Minthostachys verticillata*), romero (*Rosmarinus officinalis*), cedrón (*Aloysia citrodora*), poleo (*Mentha pulegium*) y burro (*Aloysia polystachya*);

- cáscaras frescas de: lima (*Citrus aurantifolia*), limón (*Citrus lemon*), mandarina (*Citrus reticulata*), naranja (*Citrus sinensis*) y pomelo amarillo (*Citrus paradisi*);
- flores secas de lavanda (*Lavandula angustifolia*);
- semillas secas de: girasol (*Helianthus annuus*), limón, naranja, sandía (*Citrullus lanatus*), uva (*Vitis vinífera Tannat*), melón (*Cucumis melo*) y manzana (*Malus domestica*).

Citrus aurantifolia, *Citrus lemon*, *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*, *Citrullus lanatus*, *Vitis vinífera Tannat*, *Cucumis melo* y *Malus domestica* fueron adquiridos en centros comerciales del departamento San Justo de la Provincia de Córdoba. Por su parte, las hojas de *Laurus nobilis*, *Eucaliptus cinerea*, *Eucaliptus tereticornis*, *Mentha piperita*, *Minthostachys verticillata*, *Rosmarinus officinalis*, *Aloysia citrodora*, *Mentha pulegium*, *Aloysia polystachya* y las flores de *Lavandula angustifolia* fueron recolectadas de plantas de la misma zona geográfica, en la ciudad de San Francisco. Las hojas deshidratadas de poleo fueron comercialmente adquiridas con el nombre de *hierbas y especias Suquía* mientras que las semillas de girasol como *Sturla*.

En primer lugar, se realizaron extracciones por destilación por arrastre con vapor de agua y, posteriormente, con nuevas tecnologías como el uso de microondas y ultrasonido. El único solvente utilizado fue agua potable. A continuación, se detallan las metodologías de las extracciones.

4.3.1 Arrastre con vapor de agua

Se utilizó, primeramente, un equipo de arrastre con vapor de agua y, luego, un equipo de extracción marca Figmay de escala laboratorio.

En el primer equipo, que se muestra en la figura 4.3., se pesaron entre 20 y 35 g de material seco triturado, que se colocó en un cartucho de tela metálica, dentro del equipo. Para el caso de las cáscaras de cítricos, se pesaron entre 50 y 75 g. Se conectó con un balón de fondo redondo de 500 mL que está colocado sobre un manto calefactor con regulación de calentamiento. El aceite esencial

condensa, en el mismo equipo y se recolecta en una parte del mismo, que posee un robinete, para luego separar la fase de aceite esencial de la acuosa. La temperatura de extracción fue de 100 °C, la presión de operación de 1 atm y se llevó a cabo la extracción durante 120 minutos (Andreatta et al., 2009).

Cabe mencionar que los extractos obtenidos por este método son de hojas secas de: laurel (*Laurus nobilis*), eucalipto (*Eucalyptus cinerea* y *Eucalyptus tereticornis*), menta (*Mentha piperita* L.), peperina (*Minthostachys verticillata*), romero (*Rosmarinus officinalis*), cedrón (*Aloysia citrodora*), poleo (*Mentha pulegium*) y burro (*Aloysia polystachya*); cáscaras frescas de: lima (*Citrus aurantifolia*), limón (*Citrus lemon*), mandarina (*Citrus reticulata*), naranja (*Citrus sinensis*) y pomelo amarillo (*Citrus paradisi*); flores secas de lavanda (*Lavandula angustifolia*).



Fig. 4.3. Equipo de arrastre con vapor de agua, para extracción de AE.

En el extractor de aceites esenciales por arrastre con vapor, escala laboratorio, que se muestra en la figura 4.4., se pesaron entre 100 – 120 g de hojas secas picadas o entre 250 – 300 g de cítricos frescos picados. Luego se coloca el material dentro de los dos canastos de acero inoxidable del equipo. Se

debe tener la precaución de distribuir uniformemente el material vegetal, sin compactar, para permitir el paso del vapor de agua entre todo el material, así el rendimiento de la extracción es el óptimo. Se tapa el equipo y se enciende. El vapor se genera en la caldera, que está en la parte inferior del equipo, debajo de los canastos de acero inoxidable, cuyo volumen es 2000 cm³. El volumen de agua en la caldera es de 5.6 litros. El material de vidrio con el que está construido el equipo es de borosilicato 3.3, además posee un sistema de seguridad de nivel constante, para el volumen de la caldera, también cuenta con entrada para tomar muestras. Este procedimiento se lleva a cabo a 100 °C y presión atmosférica, durante 120 minutos desde que comienza la condensación.

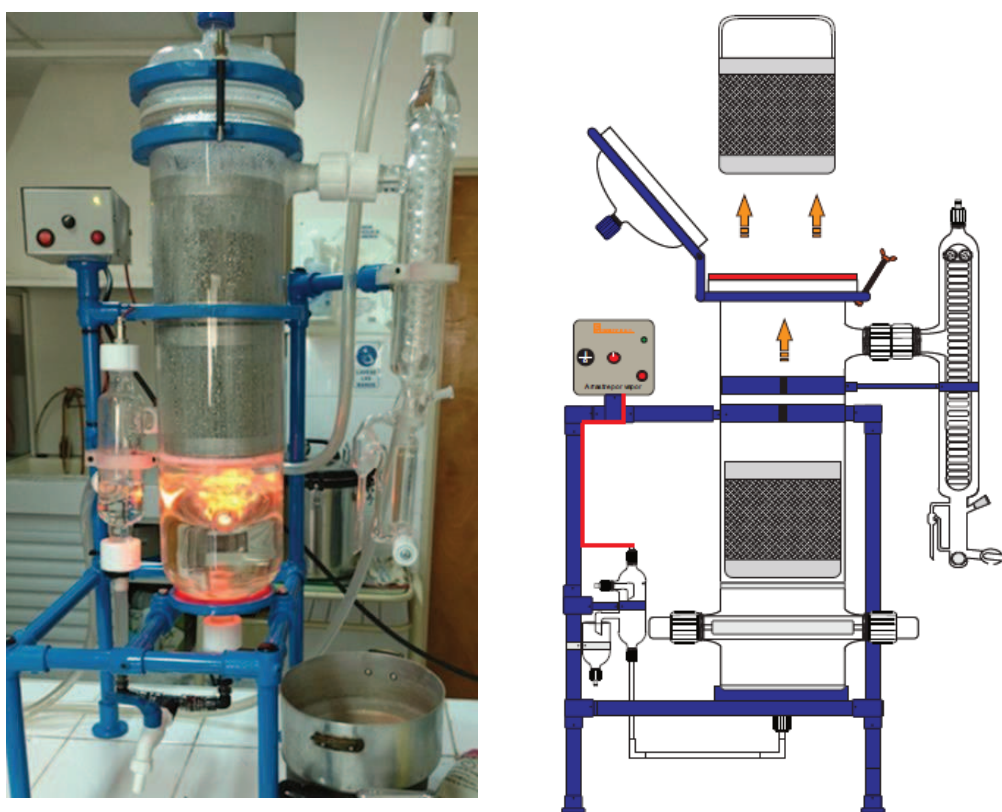


Fig. 4.4. Equipo de extracción de AE marca Figmay. La imagen de la izquierda muestra el extractor en funcionamiento en el laboratorio. En la imagen de la derecha se aprecia el esquema del equipo, del manual de usuario.

En la figura 4.5. se puede apreciar, en los dos equipos utilizados para la extracción por arrastre con vapor de agua, la parte del mismo donde se logra la separación entre el aceite esencial y el agua.

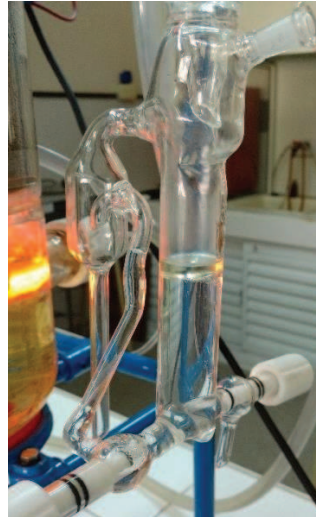


Fig. 4.5. Recolección de AE obtenido en equipo de arrastre con vapor (imagen izquierda) y en equipo marca Figmay (imagen derecha).

4.3.2 Extracción asistida por microondas

El equipo que se utilizó fue un horno microondas doméstico Whirpool (modelo: WMD 25 GS), en el cual 2 g de material triturado junto con 5 mL de agua destilada fueron sometidos a una potencia de 80 % por el tiempo de 4 min. Posteriormente, los extractos se filtraron al igual que en la extracción asistida por ultrasonido, utilizando como referencia Barbosa Canovas (2013), pero con modificaciones.

Los extractos obtenidos con este método y el siguiente, son de semillas secas de: girasol (*Helianthus annuus*), limón (*Citrus lemon*), naranja (*Citrus sinensis*), sandía (*Citrullus lanatus*), uva (*Vitis vinífera Tannat*), melón (*Cucumis melo*) y manzana (*Malus domestica*).

4.3.3 Extracción asistida por ultrasonido

Se utilizó un equipo de ultrasonido (Ultrasonic Cleaner Model PS-10 A), en el cual 2 g de material triturado, en 5 mL de agua destilada, se sometieron a 50 °C por el término de 30 min. Posteriormente, el extracto se filtró con papel de filtro (banda negra, 125 mm, Munktell), se utilizó como referencia (Pingret et al., 2013), con algunas modificaciones.

Para todas las extracciones mencionadas anteriormente, los extractos se conservaron en viales color ámbar, por las razones expuestas en el capítulo II, cerrados herméticamente con tapa a rosca. Se guardaron en heladera, a 7 °C, hasta su uso. En la figura 4.6. se puede apreciar el recipiente utilizado para conservar los AE, con el rótulo correspondiente.



Fig. 4.6. Recipiente para conservar los AE, con el rótulo del grupo de investigación.

4.4 Rendimiento de las extracciones

Para nuestro estudio, el rendimiento de las extracciones, fue calculado a través de la siguiente fórmula, teniendo en cuenta que pesamos tanto la masa de la materia prima inicial, como la masa de aceite esencial obtenido, luego de la extracción.

$$\text{Rendimiento} = \frac{m_{AE}}{m_s} \times 100$$

Donde:

Rendimiento de la extracción (en %)

m_{AE} : g de AE obtenido

m_s : g de material seco inicial

En la tabla 4.1. mencionamos los valores de rendimientos de aceites esenciales obtenidos, en este trabajo, a través del método de arrastre con vapor de agua, y mostramos los rendimientos alcanzados por otros autores.

Tabla 4.1. Ejemplos del rango de rendimientos de diversos aceites esenciales obtenidos y comparados con diferentes autores.

Especie	Rango de rendimientos (%)	Cantidad de extracciones	Época de cosecha	Rendimientos de otros autores
<i>Aloysia polystachya</i>	0.70 – 1.52	11	Entre septiembre y marzo	0.7 – 1.2 % (Pérez Zamora et al., 2016).
<i>Eucaliptus cinerea</i>	0.68 – 2.74	7	Durante todo el año	2.87 % (Silva et al., 2011)
<i>Laurus nobilis</i>	0.61 – 1.34	10	Durante todo el año	0.3 – 1.3 %, según la época del año en que se recolecta de la planta (Di Leo Lira et al., 2009)
<i>Citrus lemon</i>	0.5 – 1.14	13	Durante todo el año	3 – 4 %. (Figmay, 2017)

4.5 Contenido de polifenoles

La cantidad de compuestos polifenólicos y tipos presentes en un alimento varía en función de la especie vegetal, variedad y parte del vegetal considerada (fruto, semillas, brotes, hojas), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado, condiciones de almacenamiento, etc. Los compuestos polifenólicos presentan en su estructura química uno o más anillos de benceno y uno o más grupos hidroxilados con algún elemento común, como los grupos funcionales de ésteres, ésteres de metilo, glicósidos, entre otros. Se trata de moléculas muy reactivas que normalmente se encuentran combinadas con azúcares, como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramosa, xilosa o los ácidos glucorónicos y galacturónicos. También pueden unirse con ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminoácidos y lípidos (García Martínez et al., 2015).

A los extractos obtenidos por las técnicas mencionadas en 4.2.2 (Extracción asistida por microondas) y 4.2.3 (Extracción asistida por ultrasonido) se les determina el contenido de polifenoles totales, mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Ivanova et al., 2011). Cabe aclarar que hemos determinado el contenido de polifenoles totales solo a extractos obtenidos de semillas secas, ya que son extractos acuosos compatibles con los reactivos utilizados en el método mencionado.

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúnstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido de polifenoles (García Martínez, 2015).

En esta técnica, se mezcla una alícuota de 1 mL de extracto con 5 mL de agua destilada y 0.2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu en un tubo de ensayo y se deja reposar durante 3 min. Transcurrido ese período de tiempo, se agregan 1.5 mL de solución de carbonato de sodio y se lleva a un volumen final de 10 mL con agua destilada. La mezcla se lleva a un baño de ultrasonido a 50 °C durante 20 minutos. La absorbancia de la mezcla se mide a 765 nm usando el espectrofotómetro UV visible marca HACH, modelo DR2800. Los compuestos fenólicos totales presentes en el extracto se expresan como mg equivalente de ácido gálico por g de muestra y se calculan a partir de una curva de calibración de diferentes soluciones de ácido gálico.

4.6 Aceites esenciales comerciales

En las pruebas de sensibilidad que se llevan a cabo en el capítulo VI, también se utilizan aceites esenciales comerciales marca Just. A continuación, se transcribe la composición de cada uno de ellos, brindada en el rótulo por el fabricante.

- Aceite esencial de lavanda: se corresponde a *Lavandula angustifolia*, y contiene cumarina, farnesol, geraniol, 7-metoxicumarina, acetato de 1-octen-3-ilo.
- Aceite esencial de geranio: se corresponde a *Geranium maculatum*, y contiene citral, eugenol, farnesol, geraniol, limoneno, linalool.

- Aceite esencial de menta: se corresponde a *Mentha piperita* (peppermint), y contiene trans-2 hexenol.
- Aceite esencial de limón: se corresponde a *Citrus lemon peel oil*, y contiene citral y geraniol, como componentes alergénicos.
- Aceite esencial de naranja: se corresponde a *Citrus aurantium dulcis* y contiene limoneno, linalool y citral.

Cabe mencionar que según la disposición 6365-2012 de ANMAT, los ingredientes de fragancia alergénicos son de declaración obligatoria en el rotulado del producto cuando su concentración sea superior al 0.001 %, en el caso de productos que no deben enjuagarse, o al 0.01 % cuando se trate de productos que se enjuagan. Dentro de la lista de ingredientes alergénicos se encuentran: citral, geraniol, farsenol, eugenol, linalool, D-limoneno, entre otros. (Obsingrer, 2012)

4.7 Conclusiones

Como se pudo apreciar en el desarrollo de este capítulo, los aceites esenciales de hojas y flores se obtuvieron por la técnica de arrastre con vapor de agua. Los extractos naturales logrados de semillas, fueron obtenidos por las técnicas de extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas. A estos extractos se les cuantifica el contenido de polifenoles totales, cuyos resultados se brindan en la sección 6.3.4 (Pruebas de sensibilidad). Los extractos obtenidos en esta etapa se utilizan en las pruebas de sensibilidad llevadas a cabo en el capítulo VI.

En la sección 4.4 (Rendimiento de las extracciones) se puede ver que los rendimientos de las extracciones de *Aloysia polystachya*, *Eucaliptus cinerea* y *Laurus nobilis* que optuvimos están en el rango de otros autores. En el caso de *Citrus lemon*, el rendimiento obtenido es inferior al propuesto por el fabricante del equipo (Figmay).

Capítulo V

5. *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y microbiota natural en salchichas tipo Viena

5.1 Introducción

Primeramente, por parte del establecimiento elaborador de salchichas tipo Viena, se aisló y se purificó la cepa causante de deterioro, de un paquete de salchicha que presentaba hinchazón y limo. El agente causante de deterioro fue provisto por la Empresa, se conservó en nuestros laboratorios y se realizó la tipificación bioquímica y molecular, para identificar la cepa.

Luego procedimos a sembrar muestras de otros paquetes de salchichas tipo Viena, que no presentaban signos visibles de deterioro, para analizar la microbiota natural de las mismas, en medio de cultivo MRS, y realizar los recuentos iniciales en el producto en estudio. Cabe mencionar, que utilizamos medio de cultivo MRS, ya que la cepa proporcionada por la Empresa pertenecía al género *Leuconostoc*, y estos desarrollan muy bien en el medio de cultivo específico mencionado. Por lo tanto, el recuento de bacterias lácticas que realizamos en el transcurso de esta tesis es parcial, es decir, son las bacterias ácido lácticas que desarrollan en medio de cultivo MRS.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Aislamiento, purificación y tipificación de la cepa silvestre causante del deterioro

En el trabajo de Cuervo Mulet et al. (2010) realizaron aislamientos y cultivos de *Leuconostoc mesenteroides* provenientes del jugo de la caña, además de las diferentes pruebas bioquímicas y microbiológicas en el laboratorio para el aislamiento y la identificación de las cepas tanto de *Leuconostoc mesenteroides*, como las cepas bacterianas antagonistas a ella. El aislamiento se realizó utilizando el método de siembra en superficie por estrías a partir de un cultivo mixto. Las colonias aisladas fueron seleccionadas por sus diferencias morfológicas y se purificaron por repiques sucesivos antes de realizar las diferentes pruebas de identificación, las cuales consistieron en caracterización

macroscópica (color, tamaño, superficie, consistencia, entre otros), microscópica tales como coloraciones diferenciales (coloración de Gram) las cuales sirvieron para descartar algunas colonias diferentes a *Leuconostoc mesenteroides* y caracterización por medio de pruebas bioquímicas específicas. El mantenimiento de la cepa pura aislada se realizó en glicerol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cuervo Mulet et al., 2010).

En nuestro caso de estudio, la Empresa procedió a aislar cepas de BAL, que desarrollan en agar MRS, a partir de muestras de salchichas, extraídas de su planta industrial, con evidente hinchazón de los envases. Esto podría deberse a condiciones de conservación que favorecieran el desarrollo de los alterantes (alta temperatura), lo cual está en concordancia con el estudio realizado por Padilla-Frausto et al. (2015) en el que concluyen que el deterioro de los alimentos puede ocurrir si la temperatura de almacenamiento es deficiente.

El aislamiento de las bacterias lácticas alterantes fue realizado por la Empresa, en sus laboratorios, según la metodología que se resume a continuación. El muestreo se realizó por hisopado de la superficie de las salchichas tipo Viena que presentaban hinchazón y limo. Luego del hisopado, se inoculó un tubo de ensayo con caldo MRS y campana de Durham a los efectos de detectar la formación de gas producto de la actividad heterofermentativa (Carr et al., 2002). El cultivo que evidenció desarrollo (turbidez del medio), con formación de gas, fue utilizado para aislar las bacterias alterantes, mediante dilución seriada 1/10 en agua peptonada (1 % peptona de carne, 0.5 % de NaCl) y posterior siembra en superficie, en placa de Petri, de 0.1 mL sobre medio selectivo MRS agar. Se incubaron las placas, invertidas, en estufa de cultivo durante 48 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se escogieron colonias aisladas que se inocularon en tubos con caldo MRS, incubado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Madigan et al., 2004). Las cepas aisladas se purificaron por estriados sucesivos en MRS agar y se conservaron en caldo MRS con 10 % de glicerol y 1 % de lactosa a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Arencibia Arrebola et al., 2008).

5.2.1.1 Tipificación bioquímica

La tipificación bioquímica se realizó de acuerdo con el procedimiento presentado por Mulet (Cuervo Mulet et al., 2010) y que se corresponde con los siguientes ensayos: morfología, tinción de Gram, agrupación, formación de dióxido de carbono, crecimiento en caldo MRS, crecimiento en caldo Mayeux,

crecimiento en agar nutritivo, crecimiento a diferentes temperaturas y crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio. Todas las operaciones se realizaron con materiales esterilizados en autoclave (a 121 °C por 15 min) y bajo condiciones de asepsia.

5.2.1.1.1 Morfología y agrupación

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color (Bou et al., 2011). Básicamente se diferencian según su forma en cocos (esféricos u ovalados), bacilos (cilíndricos o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral). Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. Si el plano de división es único, podemos encontrar diplococos o cocos en cadena. Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en tétradas o en racimos. Los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos) o muy largos. Sus extremos pueden ser redondeados o rectos; pueden estar aislados, en cadenas, en filamentos o formando letras chinas. Los bacilos curvos pueden tener forma de coma (Pírez et al., 2008).

La morfología bacteriana debe ser observada con el microscopio óptico o en el microscopio electrónico, dado el tamaño pequeño de estos microorganismos. Las bacterias pueden observarse sin tinción (examen en fresco) si se las coloca en glicerol o soluciones no acuosas que aumenten el índice de refracción o con tinción usando distintas coloraciones que mejoran su visualización (Pírez et al., 2008).

El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie. La forma está determinada por los bordes y el grosor de la colonia. El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia abultada o plana. La textura de la colonia es también importante. Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular (Bou, 2011).

5.2.1.1.2 Tinción de Gram

La tinción de Gram es una tinción diferencial ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas. Fue desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en 1884; hoy en día, sigue siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta. Esta técnica requiere, antes de su proceso, la fijación de las muestras, con la finalidad de preservar la arquitectura estructural y química de las células.

Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características de la tinción. La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca lugol, el cual sirve como mordiente (sustancia que aumenta la afinidad de las células por el colorante) e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo 'cristal violeta – yodo' que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. En seguida, se coloca una mezcla de alcohol-acetona, la cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol-acetona. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano. Por último, se coloca safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contra-tinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo. Las bacterias Gram positivas se observan de color azul oscuro a morado, mientras que las Gram negativas se observan de color rosa a rojo (López-Jácome et al., 2014).

5.2.1.1.3 Formación de dióxido de carbono

5.2.1.1.4 Medios de cultivo

En los medios de cultivo las bacterias se multiplican y es necesario esperar al menos 18 – 24 horas para visualizarlas. En términos generales todas las bacterias tienen unos requerimientos nutricionales imprescindibles para su crecimiento. Necesitan una fuente de energía, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua. Todos los medios de cultivo han de cumplir como mínimo con estos requisitos, pero en muchas ocasiones se necesitan además otras sustancias adicionales como vitaminas, factores o aminoácidos esenciales.

Se utilizan medios de cultivo líquidos y sólidos. En los medios líquidos las sustancias nutritivas se encuentran disueltas. Los medios sólidos suelen consistir en una base de agar, polímero de origen vegetal que se mantiene en fase líquida a altas temperaturas y que forma un gel al enfriarse, que mantiene una alta humedad y contiene los elementos nutricionales necesarios. El cultivo sobre medios sólidos permite disponer fácilmente de las colonias bacterianas. Por otro lado, en medios líquidos, el crecimiento suele ser mayor porque la disponibilidad de nutrientes también es mayor (Bou, 2011).

5.2.1.1.5 Crecimiento en caldo MRS

El caldo MRS permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. Este caldo posee la siguiente formulación: proteosa peptona N°3 10 g, extracto de carne 10 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 20 g, sorbitán monoleato 1 ml, fosfato dipotásico 2 g, acetato de sodio 5 g, citrato de amonio 2 g, sulfato de magnesio 0.2 g, sulfato de manganeso 0.05 g en un litro de agua destilada (Laboratorio Britania S.A, 2016).

La proteosa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. El monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas (Laboratorio Britania S.A, 2016).

Para preparar el caldo se disuelven 55.3 g en un litro de agua destilada. Posteriormente se somete a esterilización a 121°C durante 15 minutos y se colocan en tubos de ensayo, esterilizados, con campana Durham invertida.

También se prepara este caldo con diferentes concentraciones de NaCl para las pruebas de crecimiento a 3 %, 6.5 % y 10 % p/v de cloruro de sodio.

5.2.1.1.6 Crecimiento en medio Mayeux

Para preparar el medio Mayeux se procede a mezclar: peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, sacarosa 100 g, citrato de sodio 1 g, glucosa 5 g, gelatina 2.5 g, agar 15 g en un litro de agua destilada. Posteriormente se somete a calentamiento hasta hervir durante aproximadamente 2 minutos y se procede a esterilizar por calor húmedo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Luego, se sirve en cajas de Petri y se solidifica a temperatura ambiente.

5.2.1.1.7 Crecimiento en agar nutritivo

Se agregan 23 g de agar nutritivo comercial en un litro de agua destilada, posteriormente se somete a calentamiento dejándolo hervir aproximadamente durante un minuto y se procede a esterilizar por calor húmedo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Luego, el agar nutritivo es servido en cajas de Petri y solidificado a temperatura ambiente.

5.2.1.2 Tipificación molecular

La identificación por técnicas de biología molecular se realizó mediante la identificación de microorganismos por secuenciación de un fragmento del gen que codifica el 16S rARN, en el INLAIN (UNL-CONICET). A partir del cultivo original, provisto por la Empresa, se sembró por estría una placa de agar MRS (30 °C, 24 h) a los fines de obtener colonias aisladas y comprobar la pureza de los cultivos. Posteriormente, se realizó la observación microscópica de las muestras con contraste de fases (1000x). La primera etapa de la identificación genética implica la extracción del ADN cromosómico utilizando el kit GeneElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma, St Louis. MO, USA) a partir de cultivos *overnight* en caldo MRS (30 °C, 16 h) provenientes de una colonia aislada (agar MRS). La identidad de los microorganismos se determinó por amplificación y posterior análisis de un producto de 1500 bp, perteneciente al gen 16S rARN, utilizando

oligonucleótidos universales (pA y pH) (Edwards et al., 1989). La reacción de amplificación se realizó utilizando 5 µl de ADN como templado, 2.5 U de *Taq* polimerasa (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), 200 nM de dNTPs (GE Healthcare) y 400 nM de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX USA) en 50 µl de volumen final añadiendo un control negativo de reacción (sin ADN). La reacción de PCR se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94 °C, 36 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 51 °C y 2 min a 72 °C, incluyendo un paso final de extensión de 7 min a 72 °C. El producto de PCR fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5 %, adicionado de GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) y se visualizó bajo luz UV (Sambrook y Russell, 2001). Los productos de amplificación obtenidos se purificaron a partir de agarosa, utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y su secuencia nucleotídica se determinó en el Servicio de Secuenciación de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Los datos de secuencias fueron ensamblados y comparados utilizando la herramienta de análisis de secuencia del *software* disponible en el nodo EMBL (CNB, CSIC, España). La identidad de la cepa se determinó por similitud con las secuencias disponibles en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) (*National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2016*).

5.3 Microbiota natural de salchichas tipo Viena

En esta etapa de la tesis hemos realizado el recuento inicial de bacterias ácido lácticas que crecen en medio de cultivo MRS agarizado, presentes en muestras de salchichas tipo Viena, comerciales, que no presentaban defectos visibles. Para esta etapa se realizaron ensayos en la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional San Francisco y en el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET) de la ciudad de Santa Fe.

5.3.1 Diluciones decimales

Para realizar las diluciones decimales, en una muestra de alimento, primeramente, se prepara un macerado y luego se efectúan las diluciones

decimales partiendo del mismo. El procedimiento empleado con más frecuencia para este fin, consiste en la utilización de un homogeneizador de alimentos en el cual se mezclan diluyente y muestra y, de esta forma, se prepara una suspensión más o menos homogénea de alimento y microorganismos que permite su posterior dilución a ser utilizada en los diversos métodos de recuento. Para ello se pesan, asépticamente, 10 g del alimento. La pesada suele realizarse en bolsa de plástico estéril. Se añaden a la bolsa 90 mL de diluyente estéril y se homogeneiza el alimento con el diluyente durante 2 minutos. Así conseguimos el macerado inicial que es la dilución 1:10 (Cano Ruera, 2006). En el caso de no poseer un homogeneizador de alimentos se procede a realizar el homogenizado en forma manual.

Para preparar las diluciones decimales, se añade 1 mL de macerado inicial (también llamado dilución madre o dilución 1:10) a un tubo con 9 mL de diluyente, y se homogeneiza usando un agitador excéntrico de tubos de ensayo durante 20 segundos o agitando manualmente. De esta forma hemos preparado la dilución 1:100 o 10^{-2} . Se repite la operación anterior transfiriendo 1 mL de la dilución 1:100 a un tubo con 9 mL de diluyente para preparar la dilución 1:1000 o 10^{-3} . Se repite la operación anterior tantas veces como sea necesario hasta conseguir el número de diluciones deseado. El número de diluciones que se necesita depende de lo contaminado que este el alimento. De un alimento del que se sospecha un número alto de microorganismos/g hay que hacer más diluciones que de uno poco contaminado (Cano Ruera, 2006).

5.3.2 Recuento en superficie

El uso de caldo o agar MRS ha ganado aceptación como medio para todo uso debido a su capacidad para soportar una gran variedad de BAL. (Carr et al., 2008).

Para el recuento de colonias, el caldo de cultivo adecuado se adiciona de agar 20 g/l (agar al 2 %) para obtener el medio sólido. La placa con el medio sólido, se inocula con la muestra, o diluciones decimales adecuadas, de tal manera que en alguna de las placas inoculadas el desarrollo de las colonias esté dentro de 30 a 300 colonias por placa (Lonvaud-Funel, 2014).

La técnica de recuento de colonias en placa se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de

muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección, después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir, una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo (Camacho et al., 2009).

La siembra en superficie se caracteriza porque durante la incubación las colonias crecen en la superficie del agar. Se utilizan placas previamente preparadas que contienen el medio de cultivo solidificado (unos 15 mL/placa). Luego, se deposita en la superficie del agar 0.1 mL de la muestra o de cada dilución. Posteriormente de realizada la descarga de la muestra, se procede a extenderla sobre toda la superficie de las placas, usando una espátula de Drigalski estéril. Se espera 2 o 3 minutos a que se seque el inóculo, y se llevan las placas a incubar a la temperatura y tiempo específico para cada cepa (Cano Ruera, 2006).

Luego de la incubación, se eligen, de entre todas las placas, las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 30 y 300 colonias/placa (esto proporciona una precisión estadística suficiente). Para realizar el conteo, se utiliza un cuenta-colonias; se pone la placa de Petri con la base hacia arriba y, si es preciso, se divide en sectores marcando mediante un lápiz graso a lo largo de los diámetros. El número de unidades formadoras de colonia o UFC/g (o mL en muestras líquidas) de la muestra original será: número de UFC/g = número de colonias x factor de dilución (Cano Ruera, 2006).

En nuestro caso particular, para los recuentos en la matriz alimentaria, en los diferentes tratamientos realizados (sección 8.3 Matriz alimentaria), hemos tomado muestras de salchichas de 2.5 g, y adicionamos 22.5 mL de agua peptonada, como diluyente. Esta etapa (1) se realiza en bolsas estériles, bajo campana de flujo laminar, y se procede a la homogeneización manual por un lapso de tiempo de 2 minutos. Luego, se procede a realizar las diluciones decimales (2), y la posterior siembra en superficie (3), en las placas de Petri con MRS agarizado como medio de cultivo. En una etapa posterior (4) se incuban las placas en posición invertida, en estufa de cultivo a una temperatura de 30 °C. Luego de 48 h, se procede a realizar el conteo (5), en las placas que presenten

desarrollo de 30 a 300 colonias. Esta metodología, se puede apreciar en la figura 5.1.

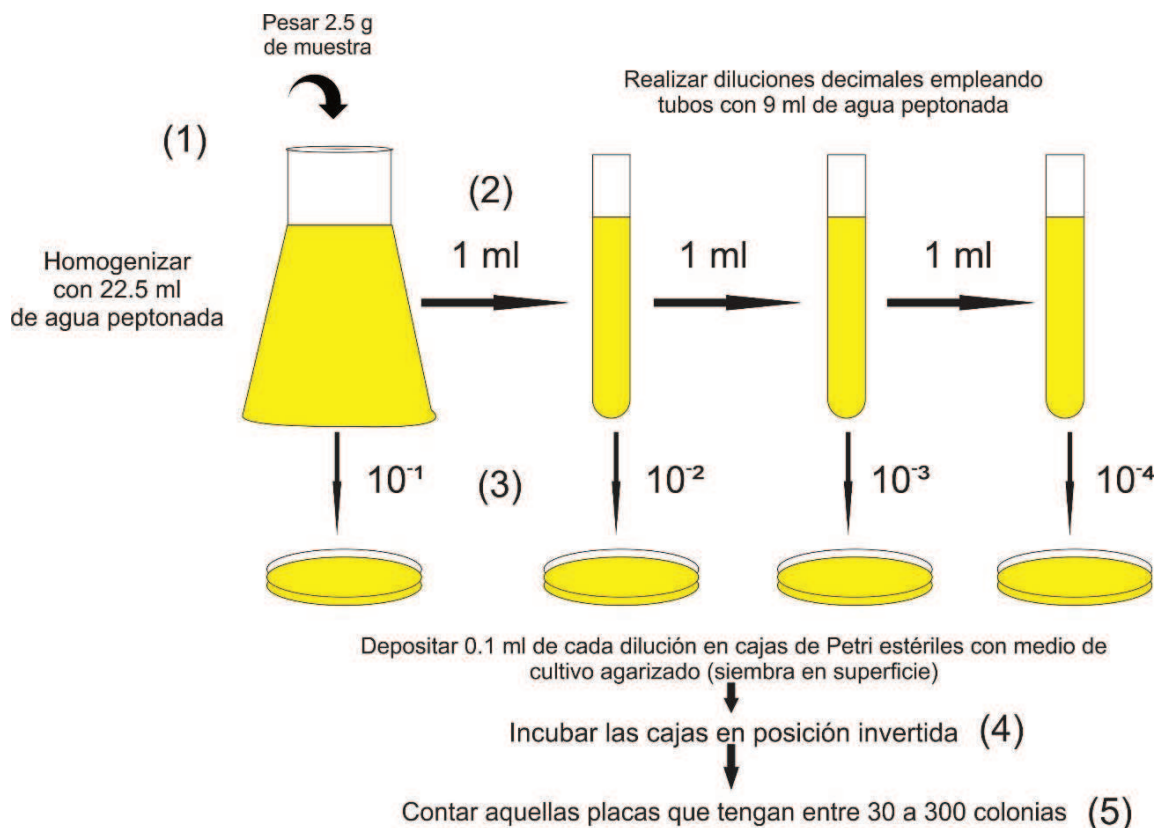


Fig. 5.1. Esquema de la realización de diluciones decimales y siembra en superficie.

5.3.3 Recuento en muestras de salchichas tipo Viena

Dos paquetes de salchichas tipo Viena, de la marca en estudio, sin signos visibles de alteración, con la misma fecha de elaboración y número de lote, fueron adquiridos en comercios de la ciudad de San Francisco (Córdoba). Uno de ellos se utilizó en el laboratorio de UTN y el otro se envió al INLAIN, conservado en refrigeración.

En ambos laboratorios se procedió a realizar el recuento bacteriano en medio agarizado (bacterias lácticas que desarrollan en MRS agarizado). Para ello, se tomaron muestras de 25 gramos de salchichas, del envase sin tratamiento posterior, se colocaron en una bolsa estéril y se adicionaron 225 mL de agua peptonada. Se homogeneiza manualmente por 2 minutos y se procede a realizar las diluciones decimales de la muestra. En relación a esta actividad, utilizamos una solución de peptona al 1 % p/v, en correspondencia con Mourad

et al., los cuales, hicieron diluciones decimales seriadas (10^{-2} a 10^{-5}) en una solución de peptona al 1 % y la extendieron sobre placas por duplicado (Mourad et al., 2004).

En la figura 5.2. se muestra una bolsa estéril utilizada, conteniendo una muestra de salchicha, ya homogeneizada, con la solución de agua peptonada.

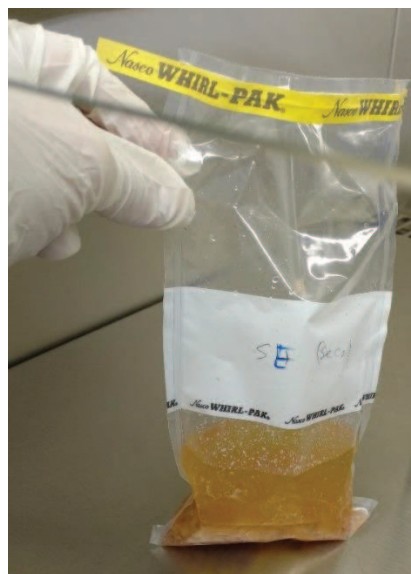


Fig. 5.2. Bolsa estéril conteniendo una muestra de salchicha con agua peptonada.

Luego de realizar las diluciones decimales, se procede a adicionar 0.1 mL (de cada dilución) a las placas con MRS agarizado al 2 % p/v (Lonvaud-Funel, 2014), con la técnica de siembra en superficie, para poder evaluar la forma de las colonias y realizar el recuento de células viables. A continuación, las placas se incuban invertidas en estufa de cultivo a 30 °C por 48 h.

Luego de la incubación, en el INLAIN se continuó con el análisis para lograr la identificación preliminar de las bacterias capaces de desarrollar durante el recuento en medio MRS agarizado. Utilizando la técnica de gota fresca, se procede a colocar una gota de agua destilada en un porta objeto, se toma una colonia, con un ansa de aguja estéril, de la placa en estudio y se ubica sobre la gota de agua destilada. A continuación, se sitúa el cubre objeto y se observa, por inmersión, al microscopio (Bazet Ugalde et al., 2004).

5.3.3.1 Prueba de catalasa

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el

peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas (Bou et al., 2011).

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Tipificación de la cepa silvestre causante del deterioro

La Empresa nos proveyó de la cepa alterante, ya aislada, purificada y conservada. Por lo tanto, posteriormente hemos procedido a la caracterización taxonómica aplicando técnicas bioquímicas y genéticas, tal como se detalla a continuación.

Al realizar la técnica de tinción de Gram se pueden visualizar las bacterias de color violeta, lo que significa que son Gram positivas; en forma de cocos, agrupadas de a pares o en cadenas lineales.

Con la siembra de la cepa en estudio, en los diferentes medios de cultivo y en las diferentes condiciones planteadas por Cuervo Mulet, (2010) se verifica la formación de dióxido de carbono en caldo MRS a 30°C, el crecimiento o no en las diferentes condiciones, lo que se resume en la tabla 5.1. Los resultados obtenidos son compatibles con las características de la especie *Leuconostoc mesenteroides*.

Tabla 5.1. Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a cepa en estudio.

Prueba bioquímica	Técnica utilizada	Resultado obtenido
Morfología celular	Tinción de Gram y observación al microscopio	Coco
Coloración de Gram	Tinción de Gram y observación al microscopio	+
Agrupación	Tinción de Gram y observación al microscopio	Pares o cadenas
Formación de dióxido de carbono	Siembra en caldo MRS, con campana Dürham, incubado a 30 °C, por 48 h y 72 h. Se observa en la campana formación de gas	+
Crecimiento en MRS	Siembra en caja de Petri con MRS agar, incubado a 30 °C, por 48 h y 72 h	+
Crecimiento en Mayeux	Siembra en caja de Petri con Mayeux agar, incubado a 30 °C, por 48 h y 72 h	+

Crecimiento en Agar nutritivo	Siembra en caja de Petri con agar nutritivo, incubado a 30 °C, por 48 h y 72 h	-
Crecimiento a 30 °C	Siembra en caja de Petri con MRS agar, incubado a 15 °C, por 48 h y 72 h	+
Crecimiento a 37 °C	Siembra en caja de Petri con MRS agar, incubado a 37 °C, por 48 h y 72 h	d
Crecimiento a 40 °C	Siembra en caja de Petri con MRS agar, incubado a 40 °C, por 48 h y 72 h	-
Crecimiento a 50 °C	Siembra en caja de Petri con MRS agar, incubado a 50 °C, por 48 h y 72 h	-
Crecimiento en NaCl 3 %	Siembra en caldo MRS con NaCl al 3 %, incubado a 30 °C, por 48 h y 72 h	+
Crecimiento en NaCl 6.5 %	Siembra en caldo MRS con NaCl al 6.5 %, incubado a 30 °C, por 48 h y 72 h	d
Crecimiento en NaCl 10 %	Siembra en caldo MRS con NaCl al 10 %, incubado a 30 °C, por 48 h y 72 h	-

+: desarrollo

-: ausencia de desarrollo

d: desarrollo débil

5.4.2 Microbiota natural de salchichas tipo Viena

5.4.3 Recuento en muestras de salchichas tipo Viena

El recuento en las muestras que no presentaban signos visibles de deterioro, fue de 10^8 UFC/g, en ambos laboratorios (UTN e INLAIN).

Como hemos mencionado en la sección 5.3.3. (Recuento en muestras de salchichas tipo Viena) en INLAIN se continuó con el análisis para lograr la identificación preliminar de las bacterias capaces de desarrollar durante el recuento en medio MRS agarizado. Fue posible apreciar dos tipos de colonias diferentes. En la figura 5.3. se pueden apreciar la colonia (1), la colonia (2) y sus diferencias visuales. La colonia (1) se ve amarillenta vista desde el fondo y blanca desde la superficie, cremosa, redonda y con bordes lisos. La colonia (2) se ve blanca, cremosa, redonda, con bordes lisos, pero más translúcida que la colonia (1).

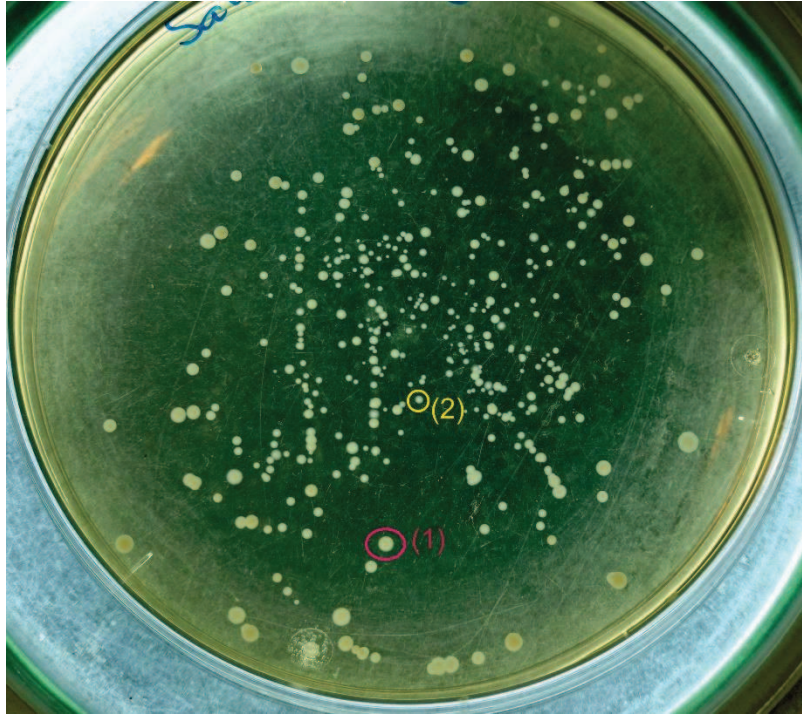


Fig. 5.3. Vista de las diferentes colonias en la placa de Petri.

Al observar al microscopio de contraste de fases (1000x), la colonia (1) corresponde a cocos alargados, delgados formando cadenas lineales. La colonia (2) muestra bacilos medianos, de a pares, en forma de V y presentando algunas cadenas no lineales. En las figuras 5.4. y 5.5. se pueden apreciar las imágenes observadas al microscopio de contraste de fases, de ambas colonias, diferenciando las características mencionadas.



Fig. 5.4. Imágenes de la colonia (1) en microscopio de contraste de fases.

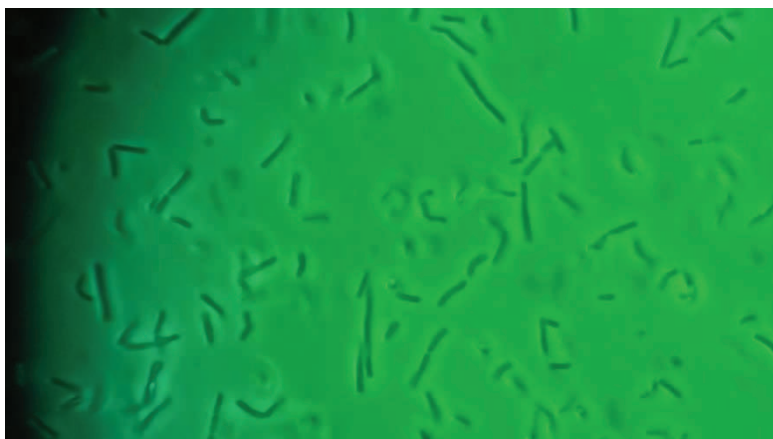


Fig. 5.5. Imagen de la colonia (2) en microscopio de contraste de fases.

Al realizar la prueba de catalasa a ambas colonias, se obtiene que son catalasa negativa, ya que no hubo desprendimiento de O₂, al colocar sobre un porta objeto, una gota de agua oxigenada, una ansada de la colonia en estudio y cubrir con un cubreobjeto.

Se procede a realizar la siembra en tubos, con caldo MRS y campana Dürham invertida, para cada colonia (1) y (2). Se incuban a 30 °C por 48 h. Al observar visualmente los tubos, se aprecia formación de CO₂ en los tubos inoculados con (1) y (2). En la figura 5.6. se muestra una fotografía con estos tubos. Por lo expuesto, se concluyó que la muestra de salchicha contenía, al menos, una bacteria cocoide compatible con *Leuconostoc mesenteroides*, especie previamente aislada, por la Empresa, a partir de la muestra con el deterioro ya detallado anteriormente. En la tabla 5.2. se puede apreciar un resumen de estos resultados.

Tabla 5.2. Resumen de colonias obtenidas de la siembra de salchichas tipo Viena.

Colonia	Características visuales	Características morfológicas	Formación de gas
(1)	Coco alargado, en cadenas lineales	coco	sí
(2)	Bacilo mediano, de a pares en forma de V y cadenas no lineales	bacilo	sí

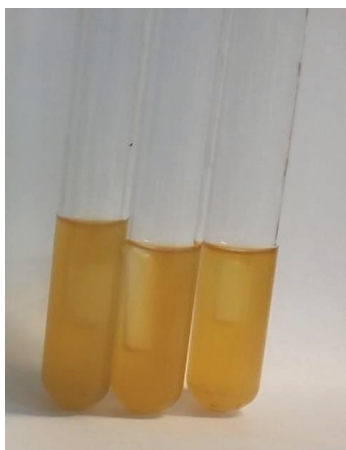


Fig. 5.6. Formación de CO₂, en caldo MRS con campana Dürham invertida, a partir de la siembra de colonias (1) y (2).

5.5 Conclusiones

A la cepa productora de deterioro, provista por la Empresa, se le realizan las pruebas de tipificación bioquímica y molecular para identificarla. Las pruebas de tipificación bioquímica indican que la bacteria en estudio se corresponde con las siguientes características: coco elongado, Gram positiva, catalasa negativa, anaerobia facultativa, heterofermentativa (produce dióxido de carbono), posee reacción negativa al crecimiento a 45 °C, no es móvil, forma pares y cadenas. El medio selectivo utilizado para el cultivo de la misma es MRS agarizado, consiguiendo un óptimo desarrollo en estufa a 30 °C en un período de 24 a 48 h. Además, se ha observado crecimiento en caldo Mayeux y en caldo nutritivo; posee crecimiento positivo en caldo MRS con solución de NaCl 3 % y crecimiento negativo en caldo MRS con solución NaCl 10 %, todos estos parámetros en concordancia con Cuervo Mulet et al. (2019). Hasta estos resultados, la cepa en estudio sería compatible con *Leuconostoc mesenteroides*.

Se procedió a la tipificación genética de la cepa aislada de la planta de procesamiento, para confirmar el género y la especie. Ésta se realizó por secuenciación de un fragmento del gen que codifica el 16S rRNA, y pudo identificarse como perteneciente a la especie *Leuconostoc mesenteorides* con un elevado grado de certeza (99 %), sin poder discernirse mediante la técnica empleada, la subespecie. Lo expuesto está en concordancia con la investigación de Samelis y Georgiadou, (2000), quienes también han encontrado una

considerable presencia, principalmente de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, en salchichas tipo taberna conservadas en aire.

Al ser una cepa silvestre, se le da el nombre de *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Su conservación se realiza en el INLAIN ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, caldo MRS con 10 % de glicerol). Además, se conserva en el laboratorio de UTN, a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, en caldo MRS con 10 % de glicerol y 1 % de lactosa, durante 6 meses. Trascurrido ese tiempo se realizan los repiques en medio fresco.

Respecto a la microbiota inicial de las salchichas tipo Viena que no presentaban signos de deterioro, el recuento inicial dio 10^8 UFC/g en ambos laboratorios, lo que sería compatible con producto deteriorado según los estudios mostrados por otros autores en la sección 3.2.4. (Microbiota natural) de la presente tesis. Según lo expuesto por (Badia, 2019), los límites de calidad aceptables de los recuentos de BAL que se encuentran en la literatura para productos cárnicos cocidos oscilan entre 10^6 y 10^8 UFC/g.

Además, podemos concluir que, al realizar la siembra en superficie de una muestra de las mencionadas, en agar MRS, obtuvimos dos tipos de colonias, una bacteria cocoide compatible con *Leuconostoc mesenteroides* (coincidente con lo determinado por la Empresa al momento de aislar *Leuconostoc mesenteroides* MS1) y un bacilo también heterofermentante. Es decir, que ambos son muy probablemente causantes del deterioro de las salchichas tipo Viena previa a la fecha de caducidad. Como hemos mencionado en este capítulo, los dos tipos de colonias fueron catalasa negativa y, además, presentaban las siguientes características: el coco era alargado y se hallaba en cadenas lineales; el bacilo era mediano agrupado de a pares, en forma de V y en cadenas no lineales.

Capítulo VI

6. Pruebas de sensibilidad de *Leuconostoc mesenteroides* MS1

6.1 Introducción

En este capítulo, se propone encontrar extractos naturales con efecto bactericida y bacteriostáticos frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1 mediante las llamadas pruebas de sensibilidad. Para llevar adelante las mismas, se utilizan los extractos obtenidos en el capítulo IV. Además, se van a utilizar compuestos puros, soluciones y aceites esenciales comerciales, para comparar los efectos bactericidas y bacteriostáticos frente a la cepa en estudio.

Para realizar los ensayos de sensibilidad se utiliza el método de difusión en agar por medio de discos, donde el disco con una cantidad específica conocida de antimicrobiano, se aplica a una superficie de MRS agarizado de una caja de Petri, inoculado previamente con *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

6.2 Medición de la actividad antimicrobiana

En el libro editado por Peter et al. (2004), se menciona que la actividad antimicrobiana de compuestos derivados de plantas contra muchos microorganismos diferentes, probados individualmente e *in vitro*, está bien documentada en la literatura (Peter et al., 2004). Sin embargo, los resultados informados en diferentes estudios son difíciles de comparar directamente. De hecho, diferentes autores han informado de datos contradictorios para el mismo compuesto antimicrobiano. Además, no siempre es evidente si los métodos citados miden actividades bacteriostáticas o bactericidas, o una combinación de ambas. Cabe mencionar que un antimicrobiano con efecto bacteriostático es aquel que no destruye o mata las bacterias, pero sí detiene su crecimiento; mientras que un antimicrobiano con efecto bactericida es el que provoca la muerte de las bacterias de manera irreversible.

Los ensayos antimicrobianos descritos en la literatura incluyen la medición de:

- ✓ El radio o diámetro de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de discos de papel impregnados con (o

pocillos que contienen) un compuesto antimicrobiano en medio de agar;

- ✓ La inhibición del crecimiento bacteriano en un medio de agar con el compuesto antimicrobiano difundido en el agar;
- ✓ La concentración mínima inhibitoria del compuesto antimicrobiano en medios líquidos;
- ✓ Los cambios en la densidad óptica o impedancia en un medio de crecimiento líquido que contiene el compuesto antimicrobiano.

Tres factores principales pueden influir en el resultado de los métodos anteriores cuando se utilizan AE de plantas: i) la composición de la muestra analizada (tipo de planta, ubicación geográfica y época del año), ii) el microorganismo (cepa, condiciones de crecimiento, tamaño del inóculo, etc.) y iii) el método utilizado para cultivar y enumerar las bacterias supervivientes.

Muchos estudios se han basado en la evaluación subjetiva de la inhibición del crecimiento, como en el método de difusión en disco, o en técnicas rápidas como la densidad óptica (turbidimetría) sin tener en cuenta las limitaciones inherentes a dichos métodos. En el método del disco, el área de inhibición depende de la capacidad del AE para difundirse uniformemente a través del agar, así como de los vapores del aceite liberados. Otros factores que pueden influir en los resultados incluyen la presencia de múltiples componentes activos. Estos compuestos activos a bajas concentraciones pueden interactuar de forma antagonista, aditiva o sinérgica entre sí. Algunas de las diferencias en la actividad antimicrobiana de los aceites observadas en alimentos complejos en comparación con su actividad cuando se usan solos en medio de laboratorio podrían deberse a la partición de los componentes activos entre las fases lipídica y acuosa de los alimentos.

La turbidimetría es un método rápido, no destructivo y económico que se automatiza fácilmente, pero tiene baja sensibilidad. La turbidimetría detecta solo la parte superior de las curvas de crecimiento, es decir la fase estacionaria de crecimiento, y requiere calibración para correlacionar los resultados con los recuentos viables obtenidos en medios de agar. Los cambios en la absorbancia solo son evidentes cuando los niveles de la población alcanzan 10^6 - 10^7 UFC/mL y están influenciados por el tamaño de las células bacterianas en diferentes etapas de crecimiento. El estado fisiológico de las células (lesionadas o sanas),

el estado de oxidación del aceite esencial, así como la disolución inadecuada del compuesto ensayado también pueden afectar las mediciones de absorbancia en los medios de crecimiento.

A diferencia de la técnica de conteo de placas, los métodos basados en impedancia pueden usarse para monitorear el metabolismo microbiano en modo de tiempo real. El método impedimétrico se reconoce como un método rápido alternativo no solo para detectar la actividad biocida de nuevos agentes antimicrobianos sino también para estimar la cinética del crecimiento en modelos matemáticos. La técnica depende del uso de un medio que ofrezca un cambio impedimétrico detectable agudo a medida que la población bacteriana crece y convierte los nutrientes de baja conductividad en productos altamente cargados. Al igual que con la turbidimetría, es necesaria la calibración de datos impedimétricos con recuentos de placas.

Aunque requiere mucho tiempo y es laborioso, el método microbiológico tradicional para determinar números de células viables mediante el recuento en placa sigue siendo el estándar de oro en los estudios antimicrobianos. Tiene la gran ventaja de requerir poca inversión de capital; sin embargo, requiere mucho material, requiere un tiempo prolongado y puede tener poca reproducibilidad.

Las CIM se miden mediante dilución en serie de los agentes probados en medio de caldo seguido de la determinación del crecimiento mediante lectura de absorbancia o recuento en placa. La técnica CIM se ha miniaturizado y automatizado utilizando el analizador de crecimiento microbiológico bioscreen para permitir un alto rendimiento de compuestos y microorganismos. La ventaja de este método es el examen simultáneo de múltiples concentraciones de uno o más conservantes y la posterior determinación de la CIM basada en el procesamiento matemático (Peter et al., 2004).

6.2.1 Pruebas *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana

Uno de los primeros exámenes *in vitro* sistemáticos de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se remonta a finales del siglo XIX, cuando Buchholtz estudió las propiedades inhibidoras del crecimiento del aceite de alcaravea, aceite de tomillo, fenol y timol en bacterias cultivadas en una decocción de tabaco (la cual se produce cuando se hierven hojas secas o frescas de tabaco en agua por 5 minutos, luego se enfría y se filtra). En este examen, el

timol resultó ser 10 veces más fuerte que el fenol, que se usaba como antiséptico quirúrgico en ese momento (Can Baser y Buchbauer, 2010).

Entre los métodos de prueba utilizados para caracterizar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales, los tres métodos principales resultan ser: la prueba de difusión en agar; la prueba de dilución en agar o caldo en serie y la prueba en fase vapor. En este capítulo realizamos la prueba de difusión en agar, por lo que se explica en la sección 6.3.1. En el capítulo 7, sección 7.2 (Macrodilución en caldo), realizamos las pruebas de dilución en caldo en serie (específicamente, macrodilución en caldo). A modo de aclaración la prueba en fase vapor, consiste en verificar la efectividad del vapor de un aceite esencial frente a una cepa. Consiste en colocar el aceite esencial en un depósito e invertir una placa con medio de cultivo y agar sembrada, cubriendo el depósito. Luego de la incubación, se forma una zona de inhibición.

6.2.1.1 Pruebas de difusión en agar

En la prueba de difusión en agar, el aceite esencial a analizar se coloca encima de una superficie de agar. Existen dos técnicas:

- en la primera, el aceite esencial se coloca en un disco de papel;
- en el segundo, se hace un orificio en la superficie del agar y se coloca el aceite esencial en el mismo.

A continuación, el aceite esencial se difunde desde su depósito a través del medio de agar, que se siembra con microorganismos. Los aceites con actividad antimicrobiana provocan una zona de inhibición alrededor del depósito después de la incubación, respectivamente, y normalmente el tamaño de la zona de inhibición se considera una medida de la potencia antimicrobiana de un AE. Los inhibidores fuertes que tienen baja solubilidad en agua pueden dar un resultado pobre o incluso negativo en la prueba de difusión en agar. Por lo tanto, es erróneo concluir que un aceite esencial sin dar lugar a una zona de inhibición en la prueba de difusión en agar carece de constituyentes activos antimicrobianos; o, en otras palabras, los compuestos activos antimicrobianos se pasan por alto fácilmente con este método. Otro problema es la interpretación del tamaño de las zonas de inhibición, que dependen de ambos, el coeficiente de difusión más la actividad antimicrobiana de cada compuesto presente en un aceite esencial. Además de los coeficientes de difusión, generalmente

desconocidos, de los componentes del aceite esencial, el tamaño de las zonas de inhibición está influenciado por varios otros factores: volatilización del aceite esencial, tamaños de discos u orificios, cantidad de compuesto administrado al disco u al orificio, adsorción por el disco, contenido de agar, pH, cepas microbianas analizadas. En conjunto, este método de prueba se puede utilizar como prueba preliminar, pero los resultados no deben sobrevalorarse (Can Baser y Buchbauer, 2010).

La prueba de difusión (en agar) está aceptada por la FDA y está establecida como estándar por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) para el análisis de la actividad antimicrobiana en agentes antimicrobianos convencionales como los antibióticos (Cockerill et al., 2012).

Sin embargo, las propiedades químicas que presentan los aceites no permiten seguir completamente la metodología estandarizada. En consecuencia, se realizaron modificaciones en base a otras técnicas propuestas en la literatura.

6.2.1.2 Preparación del inóculo

Existen dos métodos para la preparación del inóculo: *suspensión directa de colonias* y *fase logarítmica de crecimiento*. Sólo el método de suspensión directa de colonias provee resultados precisos para ciertos organismos. En ambos métodos, la turbidez de la suspensión debe ser estandarizada (para que sea igual) al estándar 0.5 de Mc Farland (lo que corresponde a aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL). Las suspensiones así ajustadas deben utilizarse como inóculo dentro de los 15 minutos siguientes (Cavalieri et al., 2006).

En nuestro trabajo utilizamos el método de suspensión directa de colonias, en el cual las colonias no deben sobrepasar las 18 - 24 horas de crecimiento. Se estandariza el inóculo al mismo tiempo que se prepara la suspensión. Se suspenden las colonias en solución salina o caldo; luego, se ajusta el inóculo a una turbidez equivalente al estándar 0.5 de Mc Farland. Este método se utiliza para los siguientes organismos: todos los estafilococos y bacterias fastidiosas que tienen crecimiento impredecible en caldo (Cavalieri et al., 2006).

6.2.2 Trabajo experimental

Hemos tenido en cuenta la concordancia con Klančnik et al. (2010), sobre que el método de difusión en agar por medio de discos es apropiado solo como prueba de detección preliminar antes de la determinación cuantitativa de la CIM con métodos de dilución. Sugieren también que el método de microdilución en caldo se utilice como método de cribado rápido para la determinación de CIM y el método de macrodilución, a valores de CIM seleccionados, para confirmar la inactivación bacteriana (Klančnik et al., 2010).

Por lo expuesto, utilizamos el método de difusión en agar por medio de discos con el objetivo de obtener una evaluación preliminar del potencial antimicrobiano de los aceites esenciales obtenidos, de los aceites esenciales comerciales y los compuestos puros frente a la cepa *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Después de esta selección preliminar, aquellos aceites esenciales cuya concentración fue bactericida hacia la cepa en estudio; y, además, teníamos acceso a la materia prima vegetal para obtener los mencionados, se seleccionaron para un análisis adicional mediante el método de macrodilución en caldo. Esta selección y la prueba de dilución se lleva a cabo en el capítulo VII.

En los ensayos de sensibilidad el disco, con una cantidad específica conocida de antimicrobiano, es aplicado sobre una superficie de MRS agar, en una caja de Petri, inoculado previamente con *Leuconostoc mesenteroides* MS1. El inóculo se preparó siguiendo el método de suspensión directa de colonias en solución salina (0.85 % NaCl), para obtener una densidad de 0.5 en la escala de Mc Farland, que se corresponde aproximadamente, con una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL. Se aplicó el inóculo con un hisopo embebido en la solución estandarizada y se distribuyó uniformemente sobre el medio de cultivo agarizado. Los discos estériles se corresponden a papel de filtro de 5 mm de diámetro, obtenidos a partir de papel de filtro banda negra (125 mm, Munktell), los cuáles fueron impregnados con una concentración conocida del antimicrobiano. Se colocan tres discos por cada placa. Posteriormente, las cajas de Petri se incubaron a 30 °C por 48 h. El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo, produciendo una zona de inhibición, para aquellos casos donde la cepa sea sensible al extracto utilizado. En el caso que los halos de inhibición sean mayores a 25 mm, se procede a repetir la prueba colocando un disco por placa. Para aquellos casos donde hubo formación de halo de inhibición,

se continuó el proceso tomando una muestra, con un ansa de aguja, del halo de inhibición. Ésta se sembró, en estría, en placas de Petri con MRS sin antimicrobianos y se incubó a 30 °C por 48 h. Posteriormente, se observó evidencia o no de desarrollo, determinando si las concentraciones de los extractos fueron bacteriostáticas o bactericidas, respectivamente.

En la figura 6.1. se muestran, esquemáticamente, los pasos a seguir en las pruebas de sensibilidad. En resumen, serían:

1. Sembrar con inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 la placa de Petri con MRS agar.
2. Impregnar el disco con el extracto a testear como antimicrobiano, luego incubar a las condiciones adecuadas.
3. Verificar y medir halo de inhibición para el extracto al cual sea sensible *Leuconostoc mesenteroides* MS1.
4. Tomar muestra del área de inhibición.
5. Sembrar dicha muestra en otra placa de Petri sin antimicrobiano.
6. Verificar desarrollo o no de la cepa.

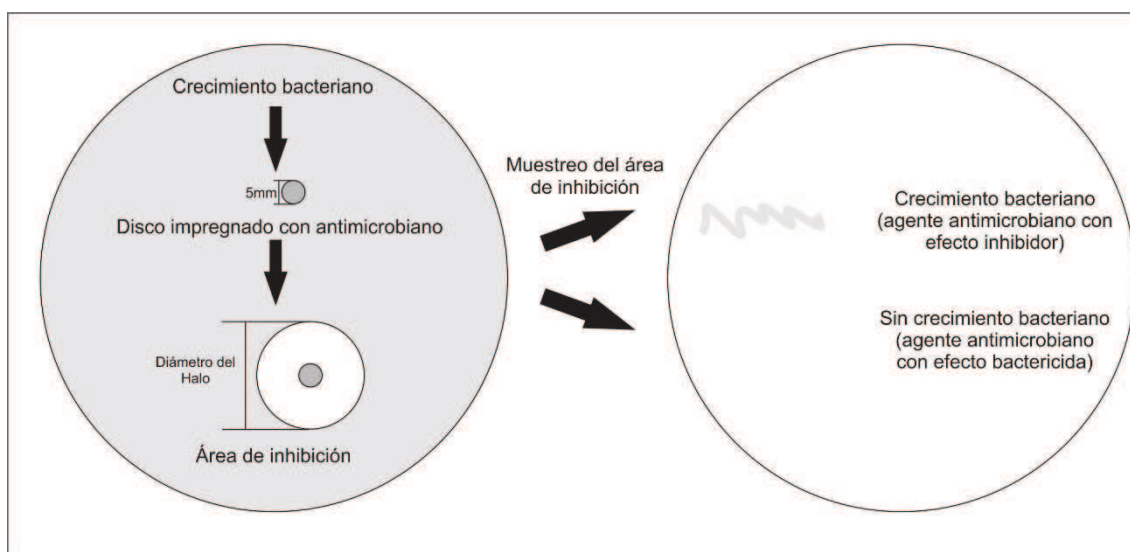


Fig. 6.1. Representación esquemática de los pasos de las pruebas de sensibilidad.

6.2.3 Pruebas de sensibilidad

Se realizaron los ensayos de sensibilidad frente a los diferentes extractos naturales obtenidos en la sección 4.2 (Obtención de extractos naturales), soluciones, compuestos puros y aceites esenciales comerciales usados como

antimicrobianos. A continuación, se mencionan todos los aceites esenciales, soluciones y compuestos puros testeados frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

- Extractos naturales: los aceites esenciales de *Laurus nobilis*, *Eucalyptus cinerea*, *Eucalyptus tereticornis*, *Mentha piperita*, *Minthostachys verticillata*, *Rosmarinus officinalis*, *Aloysia citrodora*, *Poligonum convulvulus*, *Aloysia polystachya*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus lemon*, *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*, *Lavandula angustifolia*; y los extractos de *Helianthus annuus*, *Citrus lemon*, *Citrus sinensis*, *Citrullus lanatus*, *Vitis vinífera Tannat*, *Cucumis melo* y *Malus domestica*.
- Soluciones de: ácido cítrico (Cicarelli > 99.5 %), ácido gálico (Biopack, 98 %), ácido salicílico (Cicarelli > 99 %), ácido succínico (Anedra, 99 %), ácido tartárico (Cicarelli > 99 %), ácido acético glacial (Cicarelli, 99.5 %), ácido ascórbico (Cicarelli > 99 %), hidroquinona (Mallinckrodt, 99.95 %) y solución de sorbitol (Ingredion, 70 % p/p).
- Compuestos puros: alcanfor (Drosanto ≥ 96 %) y R (+) limoneno (Fluka, 98 %) y eugenol (Sigma-Aldrich, 99 %).
- Aceites esenciales comerciales marca Just (*Swiss Just*, 2016) de limón, naranja, lavanda, geranio y menta, adquiridos comercialmente. Los mismos, no han recibido ninguna purificación previa a los ensayos.

Diferentes concentraciones de compuestos puros fueron diluidas en agua destilada o en aceite de girasol para el caso particular de las pruebas de sensibilidad con eugenol. Esto último, fue necesario debido a que el eugenol, en su estado puro, presentaba halos de inhibición demasiado extensos en la placa de Petri, y se procedió a diluirlo con aceite de girasol dada la solubilidad con este último.

Los controles positivos utilizados fueron el antibiótico comercial Gatifloxacina (Gatif Forte – Poen, 0.5 %) y sus diluciones, que exhiben actividad antibacteriana frente a un amplio rango de bacterias aeróbicas Gram-positivas y Gram-negativas; hipoclorito de sodio (Ayudín, 25g de Cl/l) y alcohol etílico (Porta,

96 %). Los controles negativos que se utilizados fueron aceite de girasol (AGD S.A. Argentina, 100 %) y lecitina de soja granulada (Modelife, 70 %).

En la tabla 6.1. se muestran los resultados de las pruebas de sensibilidad de los controles frente a la cepa en estudio.

Tabla 6.1. Controles positivos y negativos frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

Antimicrobiano	Cantidad antimicrobiano (mg)	Diámetro halo (mm)	pH
Control positivo			
Gatifloxacina	0.0034	38	7.0
	0.0040	40	
	0.0073	40	
	0.024	42	7.0
	0.061	44	
	0.072	45	
	0.105	47	7.0
	0.115	49	
	0.143	50	
Hipoclorito de sodio	13.3	18	10.0
Etanol	29.8	7	6.7
Control negativo			
Aceite de Girasol	11.3	n.d.	5.0
Lecitina de soja	18.7	n.d.	6.0

n.d. no detectado.

La tabla 6.2. muestra los antimicrobianos ensayados y con resultados negativos frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Se debe tener en cuenta la forma de extracción y la cantidad de extracto ensayado. Cuando hablamos de resultados negativos significa que las cantidades utilizadas de los extractos, soluciones y compuestos puros ensayados en algunos casos formaron halos de inhibición y su concentración no fue bactericida; y en otros casos no hubo formación de halos de inhibición.

Tabla 6.2. Extractos naturales, soluciones de compuestos puros, compuestos puros y aceites esenciales comerciales sin efecto bactericida frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

Antimicrobiano	A partir de	Rango de mg de extracto por disco	pH
Aceites esenciales obtenidos por arrastre con vapor de agua			
<i>C. aurantifolia</i>	Cáscara fresca	5.5 – 20.9	5.0
<i>C. paradisi</i>	Cáscara fresca	7.7 – 9.0	5.0
<i>C. reticulata</i>	Cáscara fresca	9.9 – 14.9	5.0
<i>C. sinensis</i>	Cáscara fresca	7.7 – 14.8	n.c.
<i>E. cinerea</i>	Hojas secas	1.6 – 6.0	5.0
<i>E. tereticornis</i>	Hojas secas	4.4 – 13.0	n.c.
<i>L. angustifolia</i>	Flores secas	11.5 – 15.2	5.0
<i>L. nobilis</i>	Hojas secas	7.5 – 11.1	5.0
<i>M. piperita</i>	Hojas secas	13.9 – 27.8	5.0
<i>M. verticillata</i>	Hojas secas	10.8 – 24.2	n.c.
<i>R. officinalis</i>	Hojas secas	6.2 – 9.8	n.c.
Extracto acuoso obtenido por extracción asistida con microondas			
<i>A. citrodora</i>	Hojas secas	16.4 – 24.1	6.4
<i>C. lanatus</i>	Hojas secas	7.9 – 33.7	6.4
<i>C. lemon</i>	Semillas secas	5.5 – 13.4	4.2
<i>C. sinensis</i>	Semillas secas	10.4 – 64.8	5.1
<i>H. annuus</i>	Semillas secas	23.7 – 75.4	6.0
<i>P. convolvulus</i>	Hojas secas	11.1 – 43.2	4.8
<i>V. vinífera Tannat</i>	Semillas secas	18.3 – 26.2	4.8
Extracto acuoso obtenido por extracción asistida con ultrasonido			
<i>C. lemon</i>	Cáscara fresca	14.5 – 33.3	4.3
<i>C. melo</i>	Semillas secas	8.4 – 15.7	6.7
<i>M. domestica</i>	Semillas secas	3.8 – 18.9	5.8
<i>V. vinífera Tannat</i>	Semillas secas	3.7 – 15.2	4.6
Soluciones			
	Concentración (% p/p)		
Ácido Acético	0.60	21.8 – 26.1	4.0
Ácido- Ascórbico	0.75	16.0 – 43.4	2.9
Ácido Cítrico	0.75	16.8 – 19.1	2.5
Ácido Gálico	0.75	14.7 – 21.1	3.0
Ácido Salicílico	0.75	3.5	2.8
Ácido Succínico	0.75	40.5 – 42.4	2.8

Ácido Tartárico	0.75	9.2 – 60.3	2.4
Eugenol/aceite de girasol	6.9	11.4 – 14.5	5.0
Eugenol/aceite de girasol	12.5	3.3 – 5.3	5.0
Eugenol/aceite de girasol	18.5	3.1	5.0
Sorbitol	70.0	19.2 – 26.8	5.0
Aceites esenciales comerciales			
Aceite esencial de limón	Comercial <i>Just</i>	5.1 – 15.2	6.0
Aceite esencial de Naranja	Comercial <i>Just</i>	8.2 – 15.5	6.0
Compuestos puros			
Alcanfor	Drosanto	1.0 – 8.3	n.c
Limoneno		8.5 – 9.6	5.0

n.c: no cuantificado.

En la tabla 6.3. se muestran los resultados del contenido de polifenoles totales, en $\text{mg}_{\text{ácido gálico}}/\text{g}_{\text{material}}$, para muestras de semillas, a las cuales se les realizaron las extracciones acuosas por tratamientos asistidos por ultrasonido o microondas. Cabe aclarar que esta medición fue para tener un índice de caracterización de estos extractos.

Tabla 6.3. Contenido de polifenoles totales en extractos provenientes de semillas.

Extracto	Tratamiento	mg ácido gálico/g material
Semillas de Naranja	Microondas	0.112
		0.118
		0.157
Semillas de Sandía	Microondas	0.106
		0.135
		0.139
Semillas de Limón	Microondas	0.251
		0.262
Semillas de Manzana	Ultrasonido	0.426
Semillas de Melón	Ultrasonido	0.443
Semillas de Uva	Ultrasonido	0.626
	Microondas	0.824
		1.042
		1.103
		1.283
		1.297
		1.313
		Semillas de girasol
Microondas	1.998	
Microondas	2.023	
Poligonum convulvulus	Microondas	2.223
	Microondas	2.237
	Microondas	2.244

Como podemos apreciar en la tabla 6.3. el contenido de polifenoles totales, en extractos acuosos varía entre 0.106 y 2.244 mg ácido gálico/g semilla.

Existen estudios sobre comparación del contenido de polifenoles totales en extracto metanólico y acuoso en semillas de sandía, presentando este último menor contenido de polifenoles totales, en concordancia con los valores obtenidos en nuestro estudio. Sathya & Shoba en su estudio fitoquímico y el efecto antioxidante en las semillas de sandía, realizado a partir del extracto metanólico, evidencia que el contenido de polifenoles totales fue de 6,45 mg ácido gálico/g semilla (Sathya y Shoba, 2014). Por otra parte, Oseni y Okoye (2013) estudiaron las propiedades fitoquímicas y antioxidantes de las semillas de la sandía (*C. lanatus*), mediante un extracto acuoso, y obtuvieron un contenido de polifenoles totales de 0,169 mg/ml.

Según otro estudio Cervantes-Cardoza et al. (2010), el contenido de polifenoles totales en extracto acuoso de semillas de manzana, de tres variedades diferentes a la nuestra, varió entre 0.286 y 0.366 mg ácido gálico/g.

En el estudio realizado por García Mora et al. (2015) obtuvieron que el contenido de polifenoles totales en extracto acuoso de semillas de melón (*Cucumis melo*), varió entre 0.161 y 0.255 mg ácido gálico/g, dependiendo de las muestras utilizadas.

Respecto al extracto metanólico de semillas de uva (*Vitis vinífera*), el contenido de polifenoles totales varió entre 8.72 y 9.07 mg ácido gálico/g, según el estudio realizado por Ordoñez et al. (2019).

En la tabla 6.4. se muestran aquellos antimicrobianos con resultado positivo para la inhibición de la cepa en estudio. En la misma, se presenta la cantidad del agente antimicrobiano utilizado en el disco, junto con el diámetro del halo de inhibición producido.

Los antimicrobianos con efecto inhibidor frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1, presentados en la tabla 6.4., fueron sometidos a siembras a partir de los halos de inhibición en una segunda placa con medio agar MRS, tal como se describió previamente. De esta observación, se pudo ver que todos estos antimicrobianos presentaron concentración bactericida ya que no exhibieron crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 en esta segunda siembra.

Tabla 6.4. Antimicrobianos con efecto bactericida frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

Antimicrobiano	A partir de	Cantidad extracto (mg)	diámetro del halo (mm)	pH
<i>L. nobilis</i>	Hojas secas	12.2	12	5.0
		13.7	13	
		17.0	14	
<i>C. lemon</i>	Cáscara fresca	5.3	6	5.0
		8.0	7	
		9.4	7	
		10.3	8	
		15.8	10	
<i>A. polystachya</i>	Hojas secas	9.6	8	5.0
		10.2	9	
		11.8	10	
		12.1	12	
		14.2	18	
		16.8	20	
<i>E. cinerea</i>	Hojas	6.8	8	5.0
		8.9	12	
		11.4	14	
		15.2	15	
Soluciones	Concentración (% p/p)			
Ácido Salicílico	0.75	17.4	6	2.8
		30.0	6	
Hidroquinona	0.75	27.8	24	5.0
		31.2	26	
		57.1	28	
Eugenol/aceite girasol	18.5	17.4	16	5.0
		29.9	16	
Eugenol/aceite girasol	29.7	4.3	23	5.0
		23.4	25	
		34.9	28	

Aceite esencial de lavanda	Comercial <i>Just</i>	6.5	8	6.0
		10.6	10	
		11.7	13	
		11.8	14	
Aceite esencial de Menta	Comercial <i>Just</i>	6.1	14	6.0
		9.1	20	
		9.7	21	
		12.1	22	
Aceite esencial de Geranio	Comercial <i>Just</i>	5.7	20	6.0
		8.3	23	
		9.4	24	
		11.9	33	

(diámetro del disco, 5 mm, incluido)

En las figuras 6.2 y 6.3 se pueden apreciar la formación de halos de inhibición, para el caso de *E. cinerea* y de hidroquinona. También se puede apreciar en la figura 6.4 la no formación de halo de inhibición alrededor de los discos de papel, como en el caso del limoneno.

En la figura 6.5 se puede observar la relación entre diferentes cantidades de antibiótico Gatifloxacina, respecto a los halos de inhibición formados.



Fig. 6.2 Halos de inhibición de *E. cinerea*

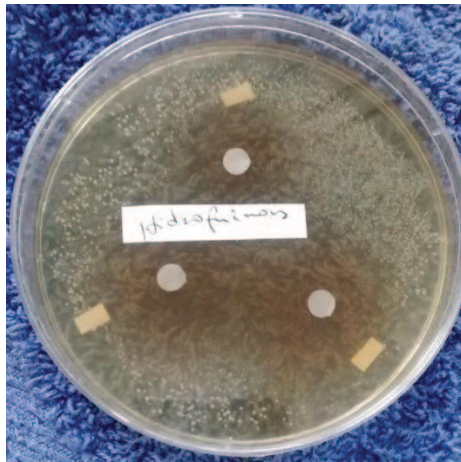


Fig. 6.3 Halos de inhibición de hidroquinona

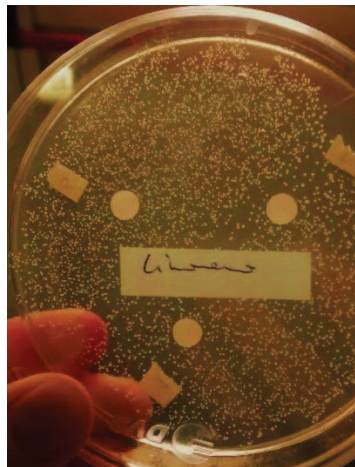


Fig. 6.4 Sin formación de halos de inhibición, para el caso de limoneno

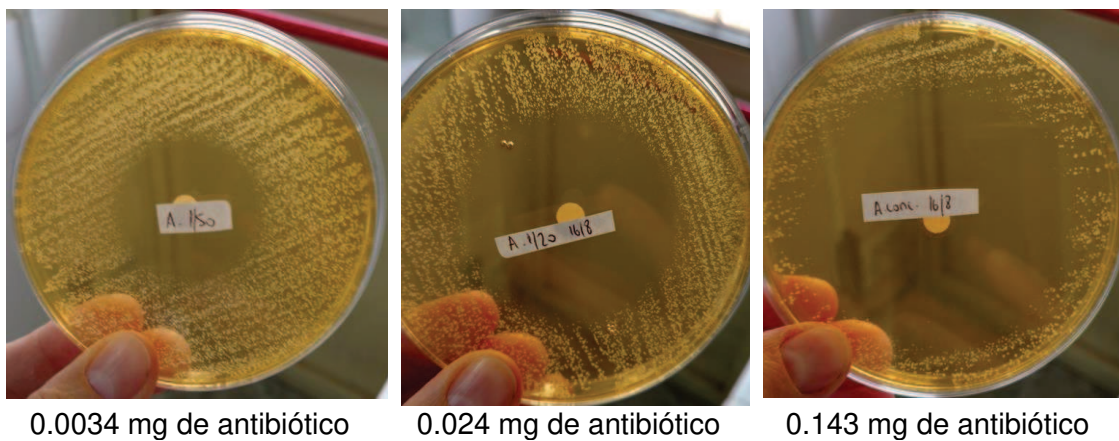


Fig. 6.5 Comparación entre los halos de inhibición para el antibiótico Gatifloxacina, y las diferentes cantidades de antimicrobiano adicionado al disco de papel.

Con respecto a los resultados obtenidos en la tabla 6.4. se elabora el gráfico de la figura 6.6. En esta última se muestra una comparación entre los diámetros de inhibición y la cantidad de antimicrobiano utilizado, de aceite esencial de *Aloysia polystachya*, *Eucaliptus cinerea*, *Laurus nobilis* y *Citrus lemon* respecto al control. En la figura 6.7. se pueden apreciar los diámetros de inhibición, comparados con la cantidad de extracto utilizado, de diferentes concentraciones de eugenol/aceite de girasol junto al control positivo del antibiótico Gatifloxacina. Se puede observar que, si bien es menor el efecto de los aceites esenciales y concentraciones de eugenol/aceite de girasol comparados con el antibiótico, los efectos bactericidas presentados por estos antimicrobianos naturales son prometedores.

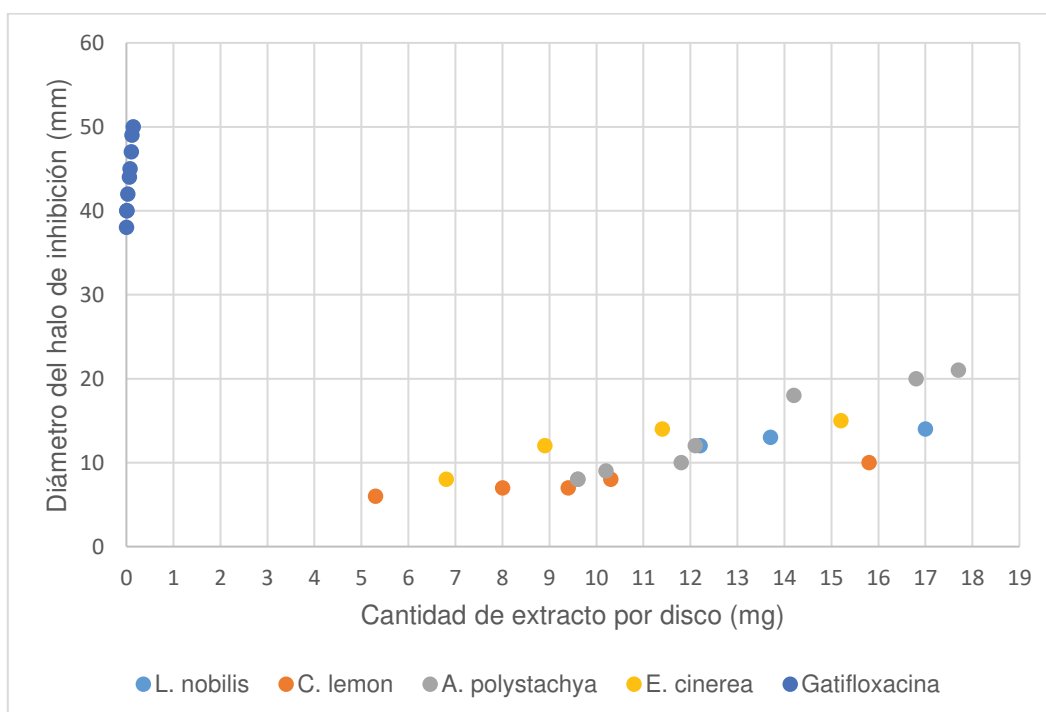


Fig. 6.6. Comparación entre los diámetros de inhibición con la cantidad de extracto, para los AE de *A. polystachya*, *E. cinerea*, *L. nobilis*, *C. lemon*, y el antibiótico Gatifloxacina.

De la observación de la figura 6.6. se puede ver que no existe una marcada diferenciación de los halos de inhibición de los aceites esenciales de *Aloysia polystachya*, *Eucaliptus cinerea*, *Laurus nobilis* y *Citrus lemon* frente a la misma cantidad de antimicrobiano.

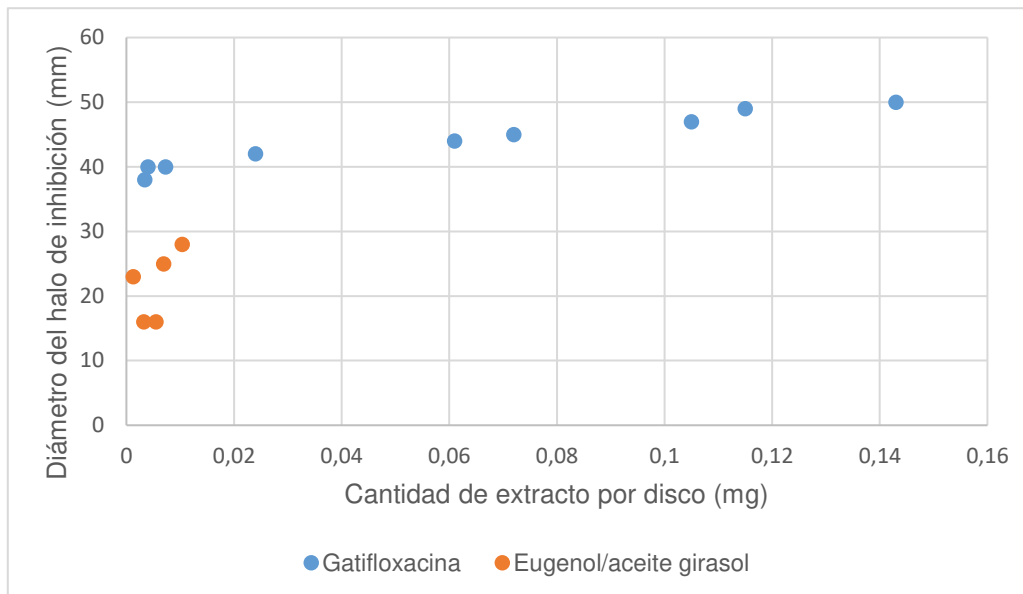


Fig. 6.7. Comparación entre los diámetros de inhibición con la cantidad de extracto, para diferentes concentraciones de eugenol/aceite de girasol y el antibiótico Gatifloxacin.

Como se evidencia en la figura 6.7. a cantidades similares de la solución de eugenol/aceite de girasol y de antibiótico, los halos de inhibición desarrollados son mayores para el antibiótico Gatifloxacin.

6.2.4 Análisis estadísticos de los datos de la prueba de difusión en agar

En base al análisis exploratorio de los datos mencionados en tabla 6.4., podemos decir que los diámetros promedio de la zona de inhibición de cada aceite esencial, presentan diferencias entre sí.

Los datos observados sobre la zona de inhibición en *Leuconostoc mesenteroides* MS1 para los aceites esenciales de *Aloysia polystachya*, *Eucalyptus cinerea*, *Laurus nobilis* y *Citrus lemon* se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, con un grado de significancia menor al 1 % de error, tipo uno, previa verificación de la hipótesis de este modelo, analizando los residuos del mismo. En un primer ensayo, la zona media de inhibición para cada aceite esencial se comparó con el antibiótico de referencia (Gatifloxacin 0.025 %) a través de la prueba Dunnett. En este ensayo, la hipótesis de la investigación fue “la zona de inhibición para el compuesto de ensayo fue diferente que el antibiótico de referencia frente a la hipótesis de ausencia de diferencias (hipótesis nula)”, que establece que no existe diferencia significativa entre la zona de inhibición del compuesto de ensayo y la referencia del antibiótico. En un

segundo ensayo, se realizaron las pruebas de comparaciones múltiples utilizando el método de Tukey para identificar las diferencias entre los aceites esenciales con las mismas hipótesis planteadas en el ensayo anterior. Ambas pruebas, se desarrollaron con el programa de estadística informática llamado “R Studio” disponible on line, (<https://www.r-project.org/>).

Si planteamos como Hipótesis nula: H_0 “Los gramos de extractos no presentan diferencias significativas entre las medias”; y como Hipótesis alternativa: H_1 “Los gramos de extractos presentan diferencias significativas entre las medias”, obtenemos los datos que se presentan en la tabla 6.5.

```
#gramos=as.factor(gramos)
> modelo=aov(diámetro~gramos)
> summary(modelo)
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
gramos      36  38.19  1.0609    3.143 0.0767 .
Residuals    6   2.03  0.3375
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Tabla 6.5 Resumen del modelo de análisis de la varianza respecto a las masas de extracto adicionadas

Como se aprecia, $p > 0.05$; por lo tanto, aceptamos H_0 ; es decir, no existen diferencias significativas entre las medias de las masas de extracto.

Si planteamos como H_0 : “Los diámetros de los halos no presentan diferencias entre las medias” y la H_1 :” Los diámetros de los halos presentan diferencias significativas”, obtenemos el resumen de la tabla 6.6.

```
diámetro=as.factor(diámetro)
> modelo=aov(gramos~diámetro)
> summary(modelo)
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
diámetro    19 0.003062 1.611e-04    3.157 0.0049 **
Residuals   23 0.001174 5.105e-05
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
```

Tabla 6.6 Resumen del modelo de análisis de la varianza respecto a los diámetros de los halos de inhibición

Como $p < 0.05$, rechazamos H_0 ; es decir, existen diferencias significativas entre las medias de los diámetros de los halos

En las tablas 6.7 y 6.8 se muestran los resultados de la prueba Dunnett y de las pruebas de comparaciones múltiples (Tukey), como los brinda el programa mencionado. En este caso la hipótesis nula: H0 “Los diámetros de los halos no presentan diferencias significativas con el antibiótico Gatifloxacina 0.025% (control)” y la hipótesis alternativa: H1 “Los diámetros de los halos presentan diferencias significativas con el antibiótico Gatifloxacina 0.025% (control)”

Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts

Fit: aov(formula = diámetro ~ factor)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
Control - Burro == 0	2.5333	0.2508	10.100	<0.001	***
Eucalipto - Burro == 0	-0.1750	0.2278	-0.768	0.8801	
Laurel - Burro == 0	-0.1000	0.2508	-0.399	0.9871	
Limón - Burro == 0	-0.6400	0.2128	-3.007	0.0284	*

Tabla 6.7 Resultados de prueba Dunnett, brindada por R Studio

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = diámetro ~ factor)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
Control - Burro == 0	2.5333	0.2508	10.100	<0.001	***
Eucalipto - Burro == 0	-0.1750	0.2278	-0.768	0.9354	
Laurel - Burro == 0	-0.1000	0.2508	-0.399	0.9941	
Limón - Burro == 0	-0.6400	0.2128	-3.007	0.0528	.
Eucalipto - Control == 0	-2.7083	0.2776	-9.755	<0.001	***
Laurel - Control == 0	-2.6333	0.2968	-8.873	<0.001	***
Limón - Control == 0	-3.1733	0.2655	-11.954	<0.001	***
Laurel - Eucalipto == 0	0.0750	0.2776	0.270	0.9987	
Limón - Eucalipto == 0	-0.4650	0.2438	-1.907	0.3475	
Limón - Laurel == 0	-0.5400	0.2655	-2.034	0.2893	

Tabla 6.8 Resultados del método Tukey, brindada por R Studio

Como se aprecia en ambos métodos los valores de p del control con cada extracto es <0.05; con lo cual rechazamos la hipótesis nula.

Los resultados estadísticos, comprueban que los diámetros de los halos de aceite esencial de *Aloysia polystachya*, *Eucaliptus cinerea*, *Laurus nobilis* y *Citrus lemon* presentan diferencias significativas respecto a los diámetros obtenidos para el antibiótico utilizado de referencia en estas pruebas (Gatifloxacina 0.025 %). También se pudo verificar que los diámetros promedios

del aceite esencial de *Aloysia polystachya* y el de *Laurus nobilis* no presentan diferencias significativas entre sí; al igual que el aceite esencial de *Eucaliptus cinerea* con el de *Citrus lemon*.

6.3 Conclusiones

En este capítulo se describió la técnica de difusión en agar por medio de discos, para realizar las pruebas de sensibilidad de *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

Luego de las pruebas de sensibilidad se obtuvo que los aceites esenciales de *Aloysia polystachya*, *Eucaliptus cinerea*, *Laurus nobilis* y *Citrus lemon*, así como las soluciones de eugenol/aceite de girasol en concentraciones 18.5 % p/p y 29.7 % p/p, presentan efecto bactericida frente a la cepa en estudio.

Se realiza también el análisis estadístico de los datos, respecto a los diámetros de los halos de inhibición, comprobándose que los diámetros de los halos de aceite esencial de *Aloysia polystachya*, *Eucaliptus cinerea*, *Laurus nobilis* y *Citrus lemon*, presentan diferencias significativas respecto a los diámetros obtenidos para el antibiótico utilizado de referencia en estas pruebas (Gatifloxacina 0.025 %). También se pudo verificar que los diámetros promedios del aceite esencial de *Aloysia polystachya* y el de *Laurus nobilis* no presentan diferencias significativas entre sí, al igual que el aceite esencial de *Eucaliptus cinerea* con el de *Citrus lemon*.

Capítulo VII

7. Caracterización de aceites esenciales y determinación de CIM y CBM

7.1 Introducción

En este capítulo se explica el método de macrodilución en caldo que se utiliza para obtener las concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas de los extractos con capacidad bactericida que se obtuvieron en el capítulo anterior. Cabe mencionar que se estudian los aceites esenciales de *Aloysia polystachya*, *Eucalipto cinerea*, *Laurus nobilis*, *Citrus lemon* y el compuesto puro L-carvona. Este último se elige, ya que se puede adquirir comercialmente, y es el compuesto mayoritario del aceite esencial de *Aloysia polystachya*, como se verá en el desarrollo de este capítulo.

Además, se realizan las caracterizaciones de estos aceites esenciales, mediante CG-MS, se explican brevemente las particularidades del material vegetal utilizado en las extracciones. También se explican algunas características del compuesto puro L-carvona.

Vale destacar que los aceites esenciales de *Citrus lemon*, *Laurus nobilis* y *Eucaliptus cinerea*, y el compuesto puro L-carvona están contemplados en el Capítulo XVI del CAA, para ser utilizados como aditivos en alimentos, como se ha mencionado en la sección 2.3.1.1 (Situación regulatoria) de la presente tesis. En este capítulo se agregan como complemento, las especificaciones contempladas en el CAA.

7.2 Macrodilución en caldo

Como complemento a lo expuesto en la sección 6.2 (Medición de la actividad antimicrobiana), los métodos de dilución son los más adecuados para la determinación de los valores de la concentración mínima inhibitoria, ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano analizando el efecto, tanto en el agar (dilución en agar) como en el medio líquido (macrodilución o microdilución) (Balouiri et al., 2016).

En la prueba de dilución, el aceite esencial a ensayar se incorpora en un medio de agar semisólido o caldo líquido en varias cantidades definidas. La

ausencia de crecimiento en placas de agar o tubos de ensayo se determina a simple vista después de la incubación. La prueba de dilución en serie en caldo líquido se recomienda para sustancias naturales y está estandarizada para la prueba de fármacos antibacterianos y antifúngicos en caldo líquido y placas de agar (Cockerill et al., 2012).

Con el objetivo de estudiar la capacidad inhibitoria, se realizaron estudios a través del tiempo, teniendo en cuenta la vida en anaquel del producto, envase de seis salchichas tipo Viena.

Se utiliza la técnica de macrodilución en caldo, ya que es una técnica que se puede usar para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano. El valor de CIM se define como la menor concentración del agente antimicrobiano ensayado que inhibe el crecimiento visible del microorganismo testado. La determinación de la CBM es la estimación más común de actividad bactericida y se define como la menor concentración de agente antimicrobiano necesario para matar el 99.9 % del inóculo final después de incubar bajo las condiciones de cada microorganismo (Balouiri et al., 2016).

En esta etapa se obtienen las CIM y las CBM de cuatro aceites esenciales y un compuesto puro frente a la cepa *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Los aceites esenciales que se estudiaron fueron *Aloysia polystachya*, *Eucalyptus cinerea*, *Laurus nobilis*, *Citrus lemon* y el compuesto puro L-carvona. Los cuatro primeros se obtuvieron con el método de extracción por arrastre con vapor, que se explicó en la sección 4.2.1 (Arrastre con vapor de agua); mientras que el compuesto se adquirió comercialmente de un proveedor local.

Se procede a la preparación de una serie de tubos de ensayo con tapa a rosca con distinto volumen de caldo MRS, para lograr las diluciones requeridas. Además, se utiliza un tubo control conteniendo únicamente el medio de cultivo. También se estudia cuál es el emulsionante a utilizar para lograr la mezcla del medio de cultivo con el aceite esencial. Luego se inoculan cada uno de los tubos con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio teniendo en cuenta que el tiempo empleado no debe ser superior a 15 min entre la preparación del inóculo y su colocación en el tubo. El inóculo se prepara siguiendo el método de suspensión directa de colonias en solución salina como se menciona en los ensayos de sensibilidad antimicrobiana (sección 6.2.1.2 página 111). Las pruebas se examinan después de incubar 48 h a 30 °C.

Transcurrido ese tiempo se observa el desarrollo o no de la cepa en los tubos; de los que no presentaron turbidez, se procede a realizar la siembra en placa de Petri con el medio agar MRS y se analizan la CIM y la CBM. Los ensayos se realizan por triplicado para cada una de las diluciones en cada uno de los extractos. Para la técnica de macrodilución en caldo, se utilizó aquella reportada por Araújo et al., (2018) con algunas modificaciones.

En la figura 7.1. se muestra un esquema de la técnica de macrodilución en caldo; en la cual los tubos numerados del 1 al 6 no presentan turbidez visual, por lo que se realiza la siembra en superficie, de 0.1 mL de cada tubo, para establecer CIM y CBM. Los tubos numerados del 7 al 10 presentan turbidez, lo que es compatible con desarrollo de la cepa en estudio, ya que, a esa concentración del antimicrobiano, *Leuconostoc mesenteroides* MS1 no presenta inhibición.

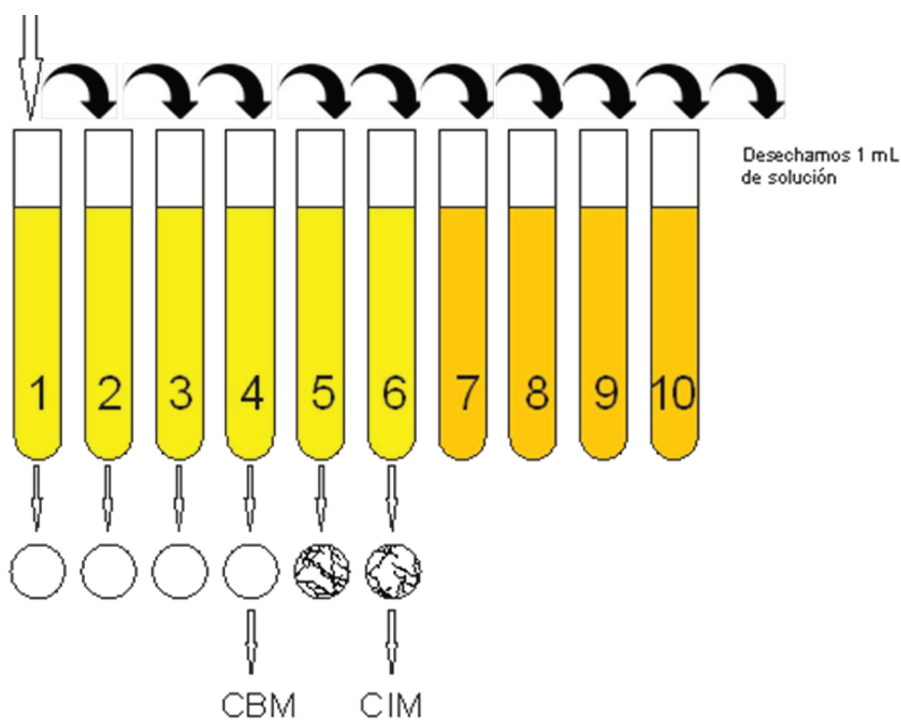


Fig. 7.1. Esquema de la técnica de macrodilución en caldo.

7.2.1.1 Emulsión del aceite esencial con agua

Para poder realizar la macrodilución en caldo necesitamos poder disolver el aceite esencial en el medio de cultivo y que la emulsión se mantenga estable en el tiempo. Hicimos pruebas con varios agentes emulsionantes, como ser

yema de huevo en polvo, lecitina de soja granulada “Modefile”, agar “Britania”, gelatina sin sabor “Royal”, Sorbitol (D-glucitol), glicerol “Cicarelli”, monoesterato de glicerilo, alcohol etílico “Porta”, ácido acético (vinagre comercial “Casalta”). Se realizaron diferentes tratamientos y mezclas de los emulsionantes mencionados.

Para efectuar esta parte del estudio, se tuvieron en cuenta los temas tratados en los siguientes libros: “Química de los Alimentos” (Fennema et al., 2010) y “Química de los alimentos” (Beliitz y Grosch 1997); además, se evaluó la disponibilidad del emulsionante y la proporción permitida por el CAA.

Existe una característica importante de los surfactantes de bajo peso molecular, que es el valor de Balance hidrófilo – lipófilo (HLB). Se define de tal forma que un valor de 7 significa que la sustancia tiene aproximadamente igual solubilidad en agua que en aceite. Los valores inferiores implican mayor solubilidad en aceite. Los surfactantes tienen valores HLB que oscilan entre 1 y 40. La relación entre el valor HLB y la solubilidad resulta útil por sí misma, y está además relacionada con la adecuación del surfactante para el desempeño de una función emulgente.

Los surfactantes con valores $HLB > 7$ suelen ser apropiados para emulsiones O/W (aceite/agua).

Los surfactantes con valores $HLB < 7$ suelen ser apropiados para emulsiones W/O (agua/aceite).

Los surfactantes útiles como agentes de limpieza (detergentes) en disoluciones acuosas tienen un número HLB elevado.

El monoestearato de glicerol tiene un valor HLB de 3.8; en cambio la lecitina tiene un valor considerablemente elevado, según la bibliografía mencionada. El valor HLB de la gelatina es de 9.8. Uno de los más utilizados en alimentos es el sorbitol (D-glucitol). La estabilidad de una emulsión aumenta por adición de compuestos que dificultan la movilidad de las gotículas. Los hidrocoloides (Ej: agar, alginatos de propilenglicol) estabilizan por ello las emulsiones O/W al aumentar la viscosidad de la fase externa.

El monoestearato de glicerilo es prácticamente insoluble en agua, es dispersable en agua caliente con ayuda de una pequeña cantidad de un

surfactante adecuado. Absorbe hasta 10 veces su peso en agua, dando lugar a emulsiones perfectamente estables, incluso a elevadas temperaturas.

El sorbitol es un azúcar – alcohol higroscópico, con un poder edulcorante que es casi el 50 %, sirve como plastificante, se utiliza en cantidades del 5 – 15 %, agregándose por lo común en forma de jarabe al 70 %.

Se llegó a la conclusión de que la mejor emulsión, obtenida con los emulgentes probados, fue la de lecitina de soja granular. Si bien la lecitina es parcialmente soluble en agua, se hidrata parcialmente formando emulsiones, como se menciona más abajo en el artículo 1398 del Capítulo XVIII del CAA. La concentración de lecitina óptima fue al 2 % p/v, en concordancia con Aguilera Márquez et al. (Aguilera Márquez et al., 2017).

En el artículo 1398 del Capítulo XVIII del CAA se mencionan los aditivos alimentarios que integran la lista positiva del mismo con sus especificaciones y exigencias; en el cual se encuentra la lecitina en el número 86 Res 1556, 12.09.90. “La lecitina de uso alimentario se obtiene de los porotos de soja y otras fuentes vegetales. Es una mezcla compleja de fosfátidos insolubles en acetona compuesta en su mayor parte por fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina y fosfatidil inositol, combinados con otras sustancias tales como triglicéridos, ácidos grasos y carbohidratos. Los grados refinados de lecitina pueden contener estos componentes en proporciones variables y en combinaciones que dependen del tipo de fraccionamiento usado. En su forma libre de aceite, el producto contiene 90 % o más fosfátidos. La consistencia en los grados natural y refinado puede variar desde plástica a fluida, en polvo o gránulos, dependiendo del contenido de ácidos grasos y de aceite y de la presencia o ausencia de otros diluyentes. Su color varía de amarillo pálido a pardo dependiendo del origen y de si es blanqueada o no. Inodora o con olor característico suave. Sabor suave. Para mejorar sus características de sabor o funcionales se puede reemplazar el aceite de soja por manteca de cacao u otros aceites vegetales alimenticios. La lecitina es sólo parcialmente soluble en agua, pero se hidrata fácilmente formando emulsiones. Los fosfátidos libres de aceite son solubles en ácidos grasos, pero prácticamente insolubles en aceites fijos. Cuando están presentes todas las fracciones de fosfátidos, la lecitina es parcialmente soluble en etanol y prácticamente insoluble en acetona. Insoluble en hexano: máx 0.3 %. Insoluble

en acetona (fosfátidos): mín 50.0 %. Índice de acidez: máx 36. Arsénico, como As: máx 3 ppm. Metales pesados, como Pb: máx 0.004 %. Plomo: máx 10 ppm. Índice de peróxido: máx 10.0. Agua: máx 1.5 %. Antioxidante Emulsionante, Antisalpicante FAO OMS- F.C.C.”

En el Capítulo VI del CAA, Artículo 323 - (Resolución Conjunta RESFC-2018-10-APN-SRYGS#MSYDS N°10/2018), se menciona: “Se permite la adición a los chacinados de sustancias amiláceas alimenticias, como ligantes, en las siguientes proporciones en peso, referidos al producto terminado.

- Chacinados frescos, máx 5 %,
- Chacinados secos, máx 3 %,
- Chacinados cocidos, máx 10 %.

Se admite también el agregado a los chacinados, como ligantes o extensores, de aislados proteínicos de soja, texturizados o no, hasta un máximo de 2 % en peso referido al producto terminado. Estos agregados deberán figurar cuali y cuantitativamente en la lista de ingredientes declarados en el rotulado, con caracteres de buen tamaño, realce y visibilidad. Se permite el agregado de texturizado de soja como extensor, hasta un máximo de 10 % en base seca en el producto terminado, debiendo declararse este agregado en la denominación del producto (por ej.: salchichas con soja, hamburguesas con soja) con caracteres de igual tamaño y su porcentaje en la lista de ingredientes, con caracteres de buen tamaño realce y visibilidad.

7.2.1.2 Trabajo experimental

En la tabla 7.1. se listan los rangos de concentraciones utilizadas, de cada extracto, para realizar la prueba de macrodilución en caldo. También se menciona la cantidad de ensayos realizados por cada antimicrobiano.

Tabla 7.1 Rango de concentraciones utilizadas de los AE de *Aloysia polystachya*, *Eucalyptus cinerea*, *Laurus nobilis*, *Citrus lemon* y el compuesto puro L-carvona

Antimicrobiano	Rango de concentración (µg/mL)	Cantidad de diluciones testeadas
<i>Aloysia polystachya</i>	4 - 81180	57
<i>Laurus nobilis</i>	160 - 82400	41
Carvona	0.4 - 54100	86
<i>Eucalyptus cinerea</i>	1 - 79010	79
<i>Citrus lemon</i>	150 - 75170	32

Luego de realizar el ensayo con los aceites esenciales de *Aloysia polystachya*, *Eucalyptus cinerea*, *Laurus nobilis*, *Citrus lemon* y el compuesto puro L-carvona, se obtuvieron los valores de CIM y CBM, que se muestran en la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Valores promedios en µg/mL, con su desviación estándar, de CIM y CBM de los AE de *Aloysia polystachya*, *Eucalyptus cinerea*, *Laurus nobilis*, *Citrus lemon* y del compuesto puro L-carvona, frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

Extracto	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Aloysia polystachya</i>	643 ± 6	763 ± 15
<i>Laurus nobilis</i>	647 ± 21	1320 ± 306
Carvona	663 ± 6	770 ± 17
<i>Eucalyptus cinerea</i>	747 ± 38	1100 ± 118
<i>Citrus lemon</i>	1873 ± 15	2410 ± 98

En la tabla 7.3. se muestran las cantidades ensayadas por otros autores, de diferentes extractos, testeados contra *Leuconostoc mesenteroides*.

Tabla 7.3. Cantidades de aceites esenciales o de compuestos, testeadas por otros autores, contra *Leuconostoc mesenteroides*.

Aceite esencial o extracto	Cantidad adicionada	Autores
<i>Citrus lemon</i> (limón) y <i>Citrus reticulata</i> (mandarina)	CIM 2 µL/mL	(Targino de Souza Pedrosa et al., 2019)
Moztaza	CIM 80 µg/mL	(Regubalan y Ananthanarayan, 2018)
Timol	CIM varía entre 500 – 1000 µg/mL	(Marchese et al., 2016)
<i>Mentha piperita</i>	CIM 0.625 µL/mL CBM 0.625 µL/mL	(Moosavi-Nasab et al., 2016)
<i>Aloysia citrodora</i>	CIM 0.625 µL/mL CBM 1.25 µL/mL	
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	CIM 4.66 µL/mL	(Khorsandi et al., 2018)
<i>Curcuma longa</i> (curcuma)	CIM 7.5 µL/mL	
Timol	CIM 500 µg/mL	(Schirmer y Langsrud, 2010)
Extracto de romero	CIM 600 µg/mL	
Cinamaldehído	CIM 900 µg/mL	
Semilla de pomelo	CIM 1600 µg/mL	
Ácido cítrico	CIM 8000 µg/mL	
Isotiocianato de alilo	CIM mayor a 10000 µg/mL	

7.3 Cualidades del material vegetal y del compuesto L-carvona

7.3.1 *Aloysia polystachya*

El burro o burrito (*Aloysia polystachya*) es un arbusto perteneciente a la familia de las verbenáceas. Adquiere una altura de 1 a 3 m; posee hojas puntiagudas, de un color verde oscuro de 4 a 8 centímetros de largo, característica que la diferencia del cedrón o hierba Luisa; con flores pequeñas blanquecinas, muy aromáticas. En la figura 7.2. se muestra una imagen de parte de la planta, con sus hojas y flores características. La especie en estudio es nativa de Argentina, Bolivia y Paraguay; en Argentina se distribuye en las Provincias de Salta, La Rioja, Córdoba, Tucumán, San Luis y San Juan, además de Corrientes y Chaco (Gonzalez et al., 2014). Es una planta aromática, consumida habitualmente en forma de infusión (té), de sabor y aroma agradable. Es también utilizada para saborizar el mate o el tereré, e industrialmente cultivada para formar parte de la yerba mate compuesta. Esta planta se encuentra muy arraigada en el uso popular, puede hallarse tanto en forma silvestre como domesticada en casas y jardines. Se adapta fácilmente a los

cambios de suelo y también cuando se la planta hace raíces de la misma rama. Usada en medicina popular como digestivo estomacal, contra trastornos hepáticos (dolores de estómago y digestiones lentas).



Fig. 7.2. Planta de *Aloysia polystachya* en floración.

Es muy utilizada en la medicina popular y en la herboristería por sus propiedades medicinales, la infusión de las hojas y flores, se utiliza contra dolores de estómago, trastornos hepáticos, digestiones lentas, empachos, acidez, náuseas y vómitos. Hay referencias que indican una muy interesante potencialidad de esta planta para su aplicación como cultivo para la industria farmacéutica ya sea como eupéptico, carminativo y sedante (Hellión-Ibarrola et al., 2008) y (Mora et al., 2005) como pediculicida (Tolozá et al., 2006); asimismo mostró una interesante actividad contra el coleóptero *Rhizopertha dominica*, plaga que afecta a los granos en la etapa de poscosecha (Benzi et al., 2009) y como repelente frente a *Aedes aegypti* (Gleiser et al., 2011). Además, ha mostrado actividad antibacteriana contra diferentes cepas de *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Enterobacter* (Pérez Zamora et al., 2016). Elechosa (2009) determinó en la Argentina, la existencia de dos poblaciones definidas por sus quimiotipos, el Tipo 1 con un alto contenido de carvona, acompañado de limoneno; y el Tipo 2 que presenta como componente destacado a la α -tuyona, acompañado de β -tuyona (Elechosa, 2009). Las propiedades digestivas y carminativas se atribuyen a la presencia de carvona (Burdyn et al., 2006). Sin

embargo, la α -tuyona se menciona como una neurotoxina animal (Millet et al., 1981).

Se han identificado compuestos fenólicos y terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos en el aceite esencial.

Se describe toxicidad aguda baja, actividad ansiolítica y antidepresiva en ratones y ratas (Gonzalez et al., 2014).

También se han realizado estudios sobre la actividad biológica de los AE de *Aloysia polystachya* contra la plaga de la soja *Nezara viridula* (“chinche verde”), evaluándose la actividad ovicida, fumigante, toxicidad por contacto y efectos repelentes de los AE mencionados, obtenidos por hidrodestilación (Werdin González et al., 2010).

7.3.2 *Eucalyptus cinerea*

Eucalyptus pertenece a la familia *Myrtaceae* y abarca aproximadamente 900 especies y subespecies. El género es originario de Australia y se ha extendido por todo el mundo debido a sus características favorables como adaptabilidad, facilidad de cultivo y rápido crecimiento. Por su parte, el aceite esencial de *Eucalytus* spp. posee propiedades antibacterianas, antifúngicas, antisépticas y de manejo de plagas (Batish et al., 2008).

Los principales productos que se obtienen del eucalipto son el aceite, la goma, la celulosa y la madera, mientras que el aceite esencial extraído de las hojas se emplea ampliamente en las industrias de la medicina, la perfumería y la alimentación; en el primer caso, esto se debe principalmente a sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antisépticas, astringentes, antiinflamatorias, cicatrizantes, desinfectantes y expectorantes.

Eucalyptus cinerea F. Muell. ex Benth, conocido como árbol del dólar de plata, es una de las numerosas especies del género y su uso principal es ornamental, con pocos informes de su uso en la medicina popular. En la figura 7.3. se muestran hojas secas de *Eucalyptus cinerea*.



Fig. 7.3. Hojas secas de *Eucalyptus cinerea*.

En un estudio realizado por Laissi et al. (2012) encontraron que *E. cinerea* era la especie más rica en 1.8-cineol. La actividad de los AE de eucalipto varió significativamente entre las especies y las cepas. En general, la fuerte actividad antimicrobiana no se relacionó solo con un alto contenido de un componente principal como el 1.8-cineol, sino también con la presencia de compuestos moderados y menores (Mabrouk et al., 2012). Entre las especies de eucalipto, el rendimiento de aceite esencial de las hojas de *E. cinerea* y el de su principal compuesto 1,8-cineol (eucaliptol) se consideran altos.

7.3.3 *Laurus nobilis*

El laurel, *Laurus nobilis* (Linnaeus), es una planta perteneciente a la familia de las lauráceas. Además, es un arbusto o árbol de múltiples ramas con hasta 10 m de altura. La corteza es lisa con un color verde oliva a negro. Esta especie es una planta siempre verde con hojas de color verde oscuro, lanceoladas, acuminadas en ambos extremos, de unos 10 cm de largo y alternas en la rama (Marques et al., 2015).

En la antigüedad, la planta llamada “Daphne” fue definida como *Laurus nobilis* por Goodyer en 1655. Sus hojas se utilizan ampliamente como ingredientes aromatizantes en la cocina mediterránea, sin embargo, el uso de su AE, en la ciencia de los alimentos, ha sido bastante limitado.

En la figura 7.4. se muestran hojas secas de *Laurus nobilis*. Si bien *Laurus nobilis* no tiene usos importantes en la medicina tradicional, estudios recientes han revelado que las hojas de laurel y su AE podrían poseer algunas actividades funcionales, como ser contra trastornos digestivos, como antiepiléptico y anticonvulsivo. Además, se ha demostrado actividad antimicrobiana contra

cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella typhimurium* (Nehir El et al., 2014).



Fig. 7.4. Hojas secas de *Laurus nobilis*.

Akgül et al., (1989) han encontrado actividades antimicrobianas del aceite esencial del laurel frente a cepas de *Enterobacter aerogenes* y *Streptococcus faecalis* con una concentración de 0.05 % y 0.1 % respectivamente. Por su parte, otros autores (Biondi et al., 1993) encontraron efecto bactericida de diluciones 1:2 de aceite esencial de laurel frente a bacterias Gram-positivas como *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Hofnia alvei*, *Proteus vulgaris*. Celikel et al. (2008) han testeado el aceite esencial de laurel frente a *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S aureus*, *Candida albicans*, en cantidades de 30, 60 y 100 microlitros, obteniendo halos de inhibición entre 7 y 19 mm. Los recuentos iniciales de colonias están en el orden de $10^7 - 10^8$ UFC/mL (Celikel et al., 2008).

Laurus nobilis es originaria del área mediterránea y crece espontáneamente en Europa y California. Se cultiva ampliamente en Europa, América y en países árabes desde Libia hasta Marruecos.

7.3.4 *Citrus lemon*

El género *Citrus* parece provenir de la zona este del Himalaya, Pakistán y Birmania. Dentro de la tribu botánica de las Aurantoideas, en la familia de las Rutáceas, se encuentra el género *Citrus*, al que pertenece el limonero, que tras el acuerdo tomado en 1964 en Edimburgo en el X Congreso Internacional de Botánica con vistas a unificar la nomenclatura recibe el nombre de: *Citrus lemon* (Linneo) N.L. Burman (Albaladejo Meroño, 1999).

El *Citrus lemon* es un árbol de talla media o grande, posee ramas con espinas fuertes, hojas de color verde pálido, flores de color rosa – violáceo. Además, sus frutos son alargados o más o menos redondeados de corteza ligeramente rugosa, con pulpa de tono amarillo rica en zumo de sabor ácido y presentan semillas.

El aceite esencial se encuentra en sacos de forma ovalada en el pericarpio o en la porción coloreada de la cáscara, y actúa como barrera tóxica natural contra varios microorganismos e insectos.

Para el aceite esencial de limón, se ha encontrado que el limón comercial (Settanni et al., 2012) mostró algunas propiedades antagónicas contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* y ninguna actividad antimicrobiana frente a *Salmonella*; aunque estos autores demostraron que esta actividad era menor, que otras especies de limón tales como *Citrus lemon* (cv. *Femminello*) cultivado en Sicilia (Italia). Por su parte, otros autores (Alfonzo et al., 2017) han encontrado que la adición de aceite esencial de limón a sardinas saladas, determinó bajas concentraciones de microorganismos patógenos y de deterioro durante todo el período de maduración de la sardina. Por su parte, Fisher y Phillips (2006) han demostrado que el aceite esencial del limón presenta actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157 y *Campylobacter jejuni*. También han verificado que el limoneno, el principal componente de este aceite esencial, no posee actividad antibacteriana mientras que el linalool presenta alta actividad antibacteriana frente a estos microorganismos. Por su parte, se ha encontrado que el aceite esencial de limón de Turquía e India (Al-jabri y Hossain, 2014) presenta inhibición, bajo determinadas concentraciones del mismo, frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris*. Esta bioactividad negativa del limoneno contra *Leuconostoc mesenteroides* MS1 también se puede apreciar, en este estudio, para un rango de concentración de 8.5 – 9.6 mg de extracto por disco (Tabla 6.2).

La mayor producción de aceite esencial de limón se realiza por prensado en frío; de menor calidad y más económicos, son los destilados de aceites esenciales usados para la producción de aceites libres de terpenos (Cuspinera, 1951).

7.3.5 Carvona

La carvona es un componente de la alcaravea (*Carum carvi*), el eneldo (*Anethum graveolens*), dos de las especias cultivadas más antiguas, y la hierbabuena (*Mentha spicata*) de plantas aromáticas de uso mundial.

La carvona, es un monoterpeno ópticamente activo y sus formas enantioméricas pueden aislarse de diferentes fuentes. Por ejemplo, la S-(+)-carvona (o D-carvona) está presente en cantidades importantes en la alcaravea y el eneldo, mientras que la R-(-)-carvona (o L-carvona) se puede encontrar en la menta verde. En la figura 7.5. se muestran las moléculas de S-(+)-carvona y la R-(-)-carvona.

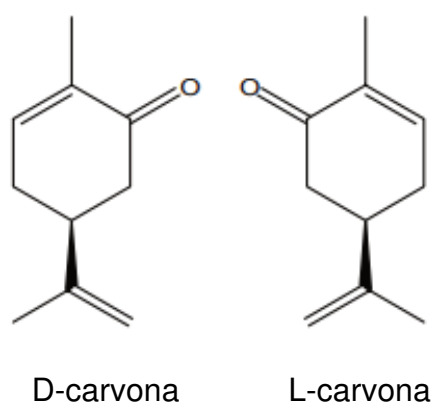


Fig. 7.5. Molécula de D-carvona y L-carvona.

Cabe mencionar que los isómeros que son imágenes especulares recíprocas se llaman enantiómeros. Los enantiómeros tienen propiedades físicas idénticas, exceptuando la dirección de rotación del plano de la luz polarizada. Solamente la dirección de la rotación es diferente, la magnitud es la misma. En cuanto a las propiedades químicas, ambos enantiómeros difieren únicamente en su reactividad con otras moléculas quirales. Eso quiere decir que una molécula quiral sólo se manifiesta como tal cuando es afectada por la influencia de la luz polarizada o de otras moléculas quirales.

La D-carvona tiene un aroma mentolado y picante con notas de centeno, mientras que la L-carvona tiene un olor a menta y dulzón.

La carvona es un agente antimicrobiano, con actividades tanto antibacterianas como antifúngicas. La evaluación *in vitro* ha demostrado que ambos isómeros ópticos tienen propiedades antimicrobianas en especies de

Aspergillus, *Botrytis*, *Campylobacter*, *Candida*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Listeria*, *Monilinia*, *Mucor*, *Nepenthes*, especies de *Salmonella*, *Saccharomyces*, *Penicillium* y *Photobacterium* (Morcia et al., 2015).

También se la ha investigado efectiva contra insectos (*Sitophilus zeamais*) de granos almacenados (Herrera et al., 2014).

Además, en el estudio realizado por Dwivedy et al. (2016) se menciona que la mayoría de los aceites esenciales de plantas han mostrado una toxicidad segura para mamíferos con valores de dosis letal 50 (DL50) más altos que los diferentes pesticidas sintéticos durante las pruebas toxicológicas a través de la administración oral en ratones. Cabe aclarar que DL50 (dosis letal media) es la dosis, calculada estadísticamente, de un agente químico o físico (radiación) que se espera que mate al 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas. A valores mayores significa que el agente es menos tóxico. Determinaron el valor de DL50 en el aceite esencial de comino (1604.60 ml/kg), de hierbabuena (8342.33 ml/kg) y de pomelo chino (36680.04 ml/kg); y lo compararon con valores de DL50 en botánicos prevalentes previamente reportados, a saber: azadiractina (> 5000 mg/kg, es considerado como no tóxica para los mamíferos), **carvona** (1640 mg/kg), piretro (350 – 500 mg/kg); algunos pesticidas comerciales, como ser azufre humectable (5000 mg/kg), organofosforados como malatión (1522 – 1945 mg/kg) y algunos conservantes sintéticos como ácido sórbico (3200 mg/kg) y ácido acético (3530 mg/kg), entre otros (Dwivedy et al., 2016; Isman, 2006).

En nuestro caso, estudiamos el compuesto L-carvona, debido a su aroma a menta, para que sea más aceptable sensorialmente.

7.4 Marco regulatorio de los aceites esenciales estudiados y del compuesto L-carvona

Este tema es un complemento de la sección 2.3.1.1 (Situación regulatoria). Como hemos mencionado en dicha sección en el CAA, art. 1300 del capítulo XVI, se encuentran contemplados los aceites esenciales de *Laurus nobilis* y *Citrus lemon*. El aceite esencial de *Eucalyptus* corresponde a otra variedad y el aceite esencial de *Aloysia polystachya* no está contemplado en el

CAA. El compuesto puro L-carvona, está contemplado en la legislación mencionada, en el art. 1309.

A continuación, se mencionan las características que deben cumplir cada uno de los aceites esenciales y el compuesto puro.

- **Esencia de Laurel (*Laurus nobilis* L):** Obtenida de las hojas. Líquido límpido, de color amarillo claro y con olor aromático agradable, especiado. Densidad relativa a 20°C: 0.910 a 0.928. Índice de refracción a 20 °C: 1.467 a 1.477. Desviación polarimétrica a 20 °C: - 15° a - 22°. Solubilidad en alcohol etílico de 80°: 1 vol mín. Índice de acidez KOH mg/g, Máx: 3. Índice de éster KOH mg/g: 15 a 45. Índice de éster después de la acetilación: KOH mg/g 33 a 88.
- **Esencia de Limón (*Citrus limonum* L *Burhmann*):** Obtenida del epicarpio fresco del fruto, por expresión o raspado. Líquido de color amarillo pálido a verde amarillento, de olor característico. Densidad relativa a 20 °C: 0.850 a 0.859. Índice de refracción a 20°C: 1.4740 a 1.4780. Desviación polarimétrica a 20 °C: +57° a +67°. Solubilidad en alcohol etílico de 95°, Máx: 3 vol. Residuo de evaporación: 2 % a 4 % p/p, IRAM 18.521. Peróxidos orgánicos: Negativo IRAM 18.506. Citral: 2,5 % a 4 % p/p IRAM 18.515 y 18.521 (G-6).
- **Esencia de Eucalipto (*Eucalytus globulus* *Labillardiere*):** Obtenida de las hojas superiores frescas. Densidad relativa a 20 °C: 0.905 a 0.926. Índice de refracción a 20 °C: 1.458 a 1.470. Desviación polarimétrica a 20 °C: 0° a +12° Solubilidad en alcohol etílico de 70°: 1 vol mín, 4 vol máx. Cineol (Eucaliptol): 60 % p/p, Método ortocresol IRAM 18.518.
- **Esencia de Eucalipto (Farmacopea Nacional Argentina):** Obtenida por rectificación de la Esencia de Eucalipto. Ensayos de identificación y de pureza, según Farm. Nac. Argentina, V Edición. Cineol (Eucaliptol): 75 % mín, 85 % máx.
- Según Res 5210, 29.12.72 **L-Carvona** (1-1-metil-4-isopropenil-6-ciclohexen-2-ona). Fórmula empírica: C₁₀H₁₄O. Peso molecular:

150,22. Características: Líquido incoloro o amarillento pajizo con olor a menta. Pureza: no menos de 98 % de C₁₀H₁₄O. Índice de refracción a 20 °C: 1.4950 a 1.5000. Peso específico a 25 °C: 0.955 a 0.962. Desviación polarimétrica a 25 °C: - 57° a - 62°. Solubilidad en etanol: 1 mL se disuelve en 2 mL de alcohol de 70 %. Aromatizante - FAO/OMS.

7.5 Caracterización de los AE

Los aceites esenciales de *Eucalyptus cinerea* y *Laurus nobilis* utilizados en este estudio fueron caracterizados mediante un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer *Clarus 500* con una columna elite 5 de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de la película y provisto de un detector por espectrometría de masas. Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del inyector 220 °C; caudal de gas carrier (H₂) 1 mL/min; temperatura del detector 150 °C; modo *scan*; energía de ionización 70 eV; volumen inyectado 1 µl; temperatura inicial del horno 70 °C (0 min) y calentamiento a 4 °C/min hasta 240 °C (4.50 min). Dichos resultados se muestran en la tabla 7.4.

Por su parte, la caracterización de los aceites esenciales de *Citrus lemon* y *Aloysia polystachya* se efectuaron con un cromatógrafo gaseoso *Clarus 600*, Perkin Elmer provisto de una columna DB5 Perkin Elmer de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 µm de la película, con Helio como gas Carrier (49.6 psi). El mismo, estaba provisto de un detector por espectrometría de masas. Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del detector 150 °C, temperatura del inyector 300 °C, temperatura de la interface de GC y MS de 250 °C; modo *scan*, volumen inyectado 1 µl; temperatura inicial del horno 60 °C (5 min) y calentamiento a 5 °C/min hasta 240 °C (10 min). Los resultados se muestran en la tabla 7.6.

La identificación de los picos se realizó por comparación con los espectros de las Bibliotecas del programa NIST MS Search 2.0.

Tabla 7.4. Composición porcentual de los aceites esenciales de *Eucalyptus cinerea* y *Laurus nobilis* mediante GC-MS.

Tiempo de retención (min)	Componente	<i>E. cinerea</i> %	<i>L. nobilis</i> %
6.4	α -Tuyona		0.34
6.6	α -Pinoeno	8.18	
7.0	Canfeno	0.06	0.55
7.5	β -Pinoeno	0.14	9.57
7.7	Bromuro de geranilo	0.10	
7.8	Mirceno		0.38
8.3	α -Felandreno	0.18	3.63
8.6	1-Hexen-3-ino. 2-tert-butilo		0.40
8.8	m-Cimeno		0.32
9.0	Limoneno		1.13
9.1	1,8-Cineol (eucaliptol)	84.17	46.26
9.7	γ -Terpineno	0.18	0.66
10.1	5-Metil 1,5- hexadien 3-ol		0.15
10.5	Ocimeno		0.16
10.5	Terpinoleno	0.05	
11.0	Éster pentílico del ácido valérico	0.07	
11.0	Linalool		22.70
12.4	Trans-pinocarveol	0.20	
13.7	Terpinen 4-ol		1.74
13.9	Alcohol perilla	0.48	
14.3	α -Terpineol	1.46	2.76
15.6	5-Tetradecen-3-ino. (E)-		0.14
16.9	Formiato de isobornilo		0.23
17.9	Geranato de metilo	0.12	
18.8	α -Terpineol		0.31
18.8	α -Acetato de terpineol	4.51	7.68
19.0	Eugenol		0.09
20.4	Eugenol metil éter		0.64
21.3	β -Cariofileno	0.09	0.17

Eucalyptus cinerea es una especie que podría emplearse como fuente de 1,8-cineol, ya que las partes aéreas de esta planta (hojas, flores y frutos) se revelaron ricas en este compuesto en todas las estaciones del año, alcanzando su punto máximo a una concentración del 85.3 % en el aceite esencial (Silva et al., 2011). En concordancia, como se puede apreciar en la tabla 7.4., *Eucalyptus cinerea* posee 84.17 % de 1,8-cineol.

En la tabla 7.5. se pueden apreciar los componentes mayoritarios del AE de *Laurus nobilis* obtenido, con respecto al obtenido por otros autores.

Tabla 7.5 Principales componentes del aceite esencial de *Laurus nobilis*, reportados en bibliografía.

Eucaliptol %	Linalool %	Sabineno %	α -Acetato de terpineol %	Autor
43.8	12.7	8.4	7.9	(Marques et al., 2015)
35.5	14.10	9.45	9.65	(Mello Da Silveira et al., 2012)
46.26	22.7	9.57	7.68	Este trabajo

Tabla 7.6. Composición porcentual de los aceites esenciales de *Citrus lemon* y *Aloysia polystachya* mediante GC-MS.

Tiempo de retención (min)	Componente	<i>C. lemon</i> %	<i>A. polystachya</i> %
10.4	α -Pino	0.65	0.1
11.8	β -3-Careno	0.47	
12.1	β -Pino	5.07	0.1
12.4	β -Mirceno	1.28	0.12
14.5	Limoneno	68.29	9.04
15.2	γ -Terpinen	5.86	
16.0	α -Terpinolen	0.29	
16.5	β -Linalool		0.1
19.9	Bergamiol	4.24	
19.9	α -Terpineol		0.14
20.8	Neral	0.98	
21.6	Carvona		90.2
22.1	Geranial	0.68	
23.0	No identificado	2.45	
23.5	(Z.E)- α -Farneseno	3.58	
26.8	β -Cariofileno	5.66	0.2
28.9	α -Curcumeno	0.50	

Como se puede apreciar en la tabla 7.6. el aceite esencial de *Citrus lemon* presenta, como componentes mayoritarios, limoneno (68.29 %), β -pino (5.07 %) y γ -terpinen (5.86 %); mientras que el aceite esencial de *Aloysia polystachya* presenta como componentes mayoritarios carvona (90.2 %) y limoneno (9.14 %).

7.6 Conclusiones

En este capítulo se pudo estudiar la inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 mediante la técnica de macrodilución en caldo, utilizando los aceites esenciales de *Aloysia polystachya*, *Eucalytus cinerea*, *Laurus nobilis*

y *Citrus lemon* y el compuesto puro L-carvona. Cabe mencionar que los aceites esenciales habían demostrado actividad bactericida frente a la cepa.

También hemos efectuado las pruebas para encontrar el emulsionante que permita una distribución lo más homogénea posible en el caldo de cultivo. En este sentido, se trabajó con lecitina de soja con la cual se obtuvo una concentración óptima al 2 % p/v (Aguilera Márquez et al., 2017).

Se han descrito las composiciones de los cuatro aceites esenciales, realizadas por CG-MS. Haciendo comparaciones entre los AE de *Eucalyptus cinerea* y *Laurus nobilis*, ambos poseen como componente mayoritario 1,8-cineol (eucaliptol). También se mencionan las composiciones obtenidas por otros autores.

Por los valores obtenidos de CIM y CBM mostrados en la tabla 7.2., se puede ver que para el aceite esencial de *Citrus lemon* obtuvimos valores muy superiores a los demás extractos ensayados; además de presentar una alta variabilidad en los resultados al repetir ensayos con las mismas concentraciones. Con lo cual decimos no utilizarlo para las pruebas en la matriz alimentaria, que se muestran en el capítulo VIII.

Hasta el momento, no tenemos conocimiento de algún productor de aceite esencial de *Aloysia polystachya*, en nuestro país. Sin embargo, L-carvona que es su componente mayoritario se puede adquirir comercialmente. Por lo que nos parece interesante destacar, hasta aquí, que es un producto innovador para el mercado actual de aceites esenciales.

Capítulo VIII

8. Prueba, en la matriz alimentaria, de los extractos y aplicación industrial

8.1 Introducción

En el presente capítulo, y como etapa final de esta tesis, se realizan las pruebas en la matriz alimentaria, utilizando los aceites esenciales de *Aloysia polystachya*, *Eucalyptus cinerea*, *Laurus nobilis* y el compuesto puro L-carvona. No se utiliza el aceite esencial de *Citrus lemon*, ya que las concentraciones mínimas inhibitoria y bactericida halladas fueron muy superiores a los demás extractos, como se mencionó en el capítulo anterior.

Primeramente, se realizan diferentes pruebas con el fin de encontrar la mejor matriz alimentaria para efectuar el análisis. Entre ellas: i) la salchicha tal como se adquiere comercialmente; ii) la salchicha cocida en las condiciones que indica el envase (100 °C por 3 min); y iii) la salchicha esterilizada en autoclave (15 min a 121 °C). Luego, se efectúan diferentes pruebas en cuanto a cantidad de aceite esencial y compuesto puro adicionado frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1. También se realizan pruebas en salchichas tipo Viena comerciales, sin ningún tratamiento.

También se realizan pruebas sobre la forma de adicionar el aceite esencial de *Aloysia polystachya* y L-carvona a la matriz alimentaria: por aspersion y por adición directa. En la sección 8.2 (Métodos de aplicación de los AE en alimentos) se describen los métodos de aplicación de los aceites esenciales en alimentos.

Cabe mencionar que los recuentos de células viables en muestras de salchichas esterilizadas e inoculadas con *Leuconostoc mesenteroides* MS1 se realizan desde el tiempo 0 de las muestras hasta el día 42, que coincide con la caducidad del alimento en anaquel, reportado por la Empresa y avalado por diversos estudios (Ceja Farias et al., 2018; Korkeala et al., 1989).

En las muestras de salchichas sin tratamiento previo, el recuento se llevó a cabo hasta el día 21, debido al inicio de la pandemia por Covid19 y que impidió acceder a los laboratorios. Sin embargo, existen pruebas en matrices

alimentarias con recuentos en placa, en esa cantidad de días, como es el caso de Schirmer y Langsrud (2010), autor citado en el presente.

8.2 Métodos de aplicación de los AE en alimentos

En el capítulo “Bioconservantes como agentes para prevenir el deterioro de los alimentos” (Mani-lópez et al., 2018) se explica que la composición de los alimentos es un factor importante que puede reducir el efecto antimicrobiano de los AE; el contenido de grasas y proteínas, la actividad del agua, el pH y las enzimas podrían limitar o interactuar con los AE y disminuir su actividad. El pH bajo puede aumentar la solubilidad y estabilidad de los AE, lo que lleva a mejorar su actividad antimicrobiana. Las bajas temperaturas también contribuyen a estabilizar los AE aumentando su efecto antimicrobiano. En general, la actividad antimicrobiana de los AE depende de la concentración, pero su límite de aplicación es su mal sabor u olor fuerte.

La incorporación de AE como agentes antimicrobianos en la carne puede eliminar una determinada población bacteriana objetivo, pero a su vez produce condiciones favorables que promueven el crecimiento y la virulencia de otros microorganismos indeseables debido a cambios en la ecología microbiana. La aplicación de AE como conservantes en la carne y productos cárnicos depende del mantenimiento de la estabilidad y bioactividad de sus fitoquímicos constituyentes. La estabilidad física de la mayoría de los fitoquímicos en los AE disminuye cuando interactúan con los componentes de la carne, posiblemente debido a la alta capacidad de unión de las proteínas y grasas de la carne a los compuestos volátiles de los AE. Una de las soluciones sugeridas para aumentar la estabilidad de los AE es encapsularlos en lugar de aplicarlos directamente sobre la carne y los productos cárnicos (Chivandi et al., 2016).

El método de aplicación de los AE en los alimentos es una opción muy importante para garantizar el control microbiano, minimizar el efecto sobre las propiedades sensoriales, mantener la calidad y, como consecuencia, extender la vida útil. Se han propuesto varios enfoques para lograr una aplicación óptima; sin embargo, la mejor opción depende del tipo de alimento, la carga microbiana inicial, el microorganismo objetivo, el impacto sensorial, la compatibilidad del sabor del AE con los alimentos y la temperatura de almacenamiento, entre otros.

Los principales métodos de aplicación de los AE son:

- adición directa (como ingrediente de la formulación de los alimentos o sobre las superficies de los alimentos mediante pulverización o inmersión/remojo),
- fase vapor (el AE líquido genera una atmósfera en un espacio cerrado, el AE encapsulado genera una atmósfera en un paquete cerrado, o un paquete activo emite AE volátiles),
- control de liberación (alimentos en contacto con el empaque activo con AE, recubrimiento comestible con AE o AE microencapsulado en una emulsión).

El método de la fase de vapor disminuye los efectos sensoriales en los alimentos debido a la adición de aceites esenciales. En la figura 8.1. se representan los principales métodos de aplicación de los AE en los alimentos (Mani-lópez et al., 2018).

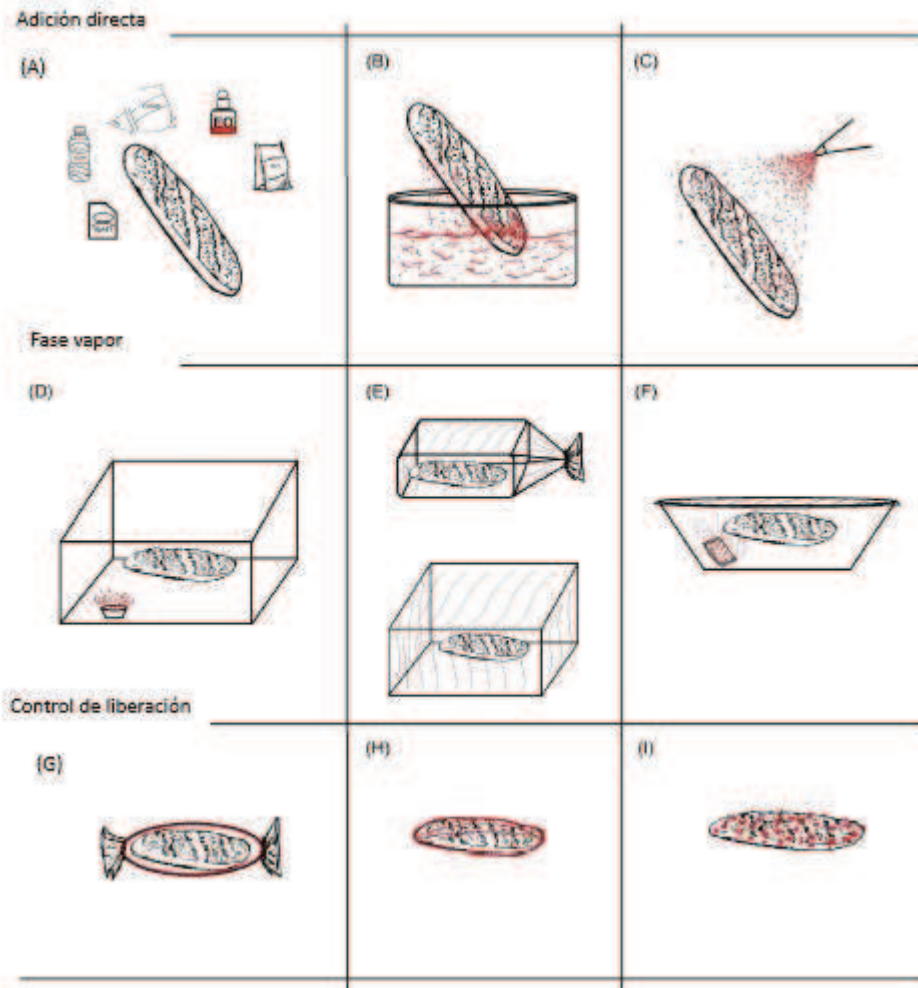


Fig. 8.1. Métodos de aplicación de un AE en alimentos.

Los métodos de adición directa pueden ser: (A) como ingrediente de la formulación de alimentos; (B) por inmersión o mojado de alimentos; (C) rociando la superficie del alimento. Los métodos en fase vapor pueden ser: volátiles en fase vapor (D) de AE líquido en atmósfera cerrada; (E) el envasado activo desprende volátiles de AE; (F) el AE encapsulado genera una atmósfera en un paquete cerrado. Los métodos de control de liberación pueden ser: (G) alimentos en contacto directo con un paquete activo que contenga el AE; (H) revestimiento comestible que contiene el AE; (I) AE microencapsulado en emulsión aplicado sobre la superficie del alimento.

La encapsulación de aceites esenciales parece ser un nuevo enfoque atractivo. De hecho, las técnicas de microencapsulación se han vuelto populares porque son el medio más versátil de superar problemas como los inherentes a los de AE usados como aditivos alimentarios; es decir los efectos sensoriales mencionados en la sección 2.3.1.4 (Efectos sensoriales). Entre los objetivos básicos de la microencapsulación se encuentran reducir la toxicidad del material, brindar protección ambiental a compuestos sensibles y enmascarar el sabor y aroma indeseables de ciertos compuestos. Por lo tanto, la combinación de tecnologías podría brindar productos seguros sin una pérdida sustancial de la calidad sensorial (Selim, 2011). En concordancia con los autores anteriores, Tongnuanchan y Benjakul (2014) concluyen que la nueva tecnología que se debe implementar para reducir el olor único e indeseable del AE es la encapsulación. Como consecuencia de la aplicación de esta tecnología, el AE puede usarse ampliamente sin ningún efecto negativo sobre las propiedades sensoriales de los alimentos. El desarrollo de un sistema de liberación para el aceite esencial del empaque o el sistema de vapor dentro del envase debe llevarse a cabo para maximizar la actividad de los compuestos activos en los AE (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

En concordancia con Marques et al. (2015), Selim (2011) concluye que deberían aprovecharse los efectos sinérgicos para maximizar la actividad antibacteriana de los AE y minimizar las concentraciones necesarias para lograr un efecto antibacteriano particular sin afectar, adversamente, la aceptabilidad sensorial. Se han sugerido varios factores sinérgicos potenciales para su uso con AE, como la reducción del pH, la adición de ácidos orgánicos, la reducción de la tensión de oxígeno utilizando atmósferas modificadas, la aplicación de

choques térmicos leves, etc. (Selim, 2011). Tajkarini et al. (2010) mencionan que la aplicación de hierbas, especias y AE con efectos antimicrobianos comparables a los aditivos sintéticos es todavía remota por tres razones principales: datos limitados sobre sus efectos en los alimentos, olor fuerte y alto costo. Se han aplicado con éxito combinaciones de técnicas de varios experimentos en alimentos e *in vitro* (Tajkarimi et al., 2010).

Según Moreira et al. (2016) la mayor disponibilidad de nutrientes en los alimentos en comparación con los medios de laboratorio puede permitir que las bacterias reparen las células dañadas más rápidamente (Moreira et al, 2016). En concordancia, Tassou et al. (2012) concluyen que la matriz alimentaria es un ambiente muy nutritivo y puede incrementar la tasa de recuperación de microorganismos que hayan sufrido algún tipo de daño (Tassou et al., 2012).

La distribución espacial de los microorganismos en los alimentos no es homogénea. La ecología microbiana de un alimento específico, su capacidad amortiguadora, el pH local, la disponibilidad de oxígeno y la acumulación de metabolitos también interfieren en la actividad de los agentes antimicrobianos (Tassou et al., 2012). Por esta razón, es necesario agregar concentraciones 10 – 100 veces más altas de un AE en los alimentos para obtener los mismos efectos observados *in vitro* (Burt, 2004).

Los estudios sobre alimentos reales muestran que algunos botánicos tienen el potencial de ser biopreservantes efectivos, aunque el desarrollo de productos para optimizar la funcionalidad y el sabor de los alimentos será un desafío. Se necesitan más estudios sobre el tema de las aplicaciones botánicas para optimizar su uso y proporcionar los fundamentos que necesita la industria alimentaria. La efectividad de la aplicación de aceites esenciales en los sistemas alimentarios es el resultado de múltiples asociaciones de factores, como la composición de los alimentos o las temperaturas de almacenamiento. La presencia de tensioactivos y sustancias orgánicas que interactúan con los sitios activos de las sustancias antimicrobianas también juega un papel importante. Además, las técnicas utilizadas para aplicar los aceites esenciales a los alimentos constituyen un factor importante que afecta su actividad antibacteriana y antioxidante. Aparecen dos variables importantes cuando los aceites esenciales se aplican en la matriz alimentaria o *in vitro*; uno es el tiempo de contacto para que los aceites ejerzan su efecto y el otro es la concentración

requerida para lograr el mismo grado de inhibición y estas dos variables estarían interactuando. El menor contenido de agua de los alimentos en comparación con los medios de laboratorio puede obstaculizar el progreso de los agentes antibacterianos hacia el sitio objetivo en la célula bacteriana. Además, en los ensayos *in vitro*, los microorganismos y los aceites esenciales entran en estrecho contacto, mientras que la matriz alimentaria tiene membranas celulares que actúan como barreras físicas que interfieren el contacto del aceite y los microorganismos (Moreira et al., 2016).

El interés de evitar el crecimiento de bacterias heterofermentativas del género *Leuconostoc*, principalmente *Leuconostoc mesenteroides*, y sus efectos no deseables sobre productos cárnicos, plantea diferentes métodos para inhibir su crecimiento: utilización de aditivos, utilización de microorganismos bactericidas o el uso de procesos tecnológicos (Diez et al., 2009).

8.3 Matriz alimentaria

Primeramente, se procedió a evaluar cuál era la matriz con menor cantidad de microorganismos iniciales, cuantificados en MRS agar. Se analizan tres matrices, a saber: i) la salchicha tal como se adquiere comercialmente; ii) la salchicha cocida en las condiciones que indica el envase (100 °C por 3 min); y iii) la salchicha esterilizada en autoclave (15 min a 121 °C). A estas diferentes matrices se les realizó el recuento de células viables en agar MRS, a fin de determinar aquella con menor cantidad de microorganismos iniciales, para evitar enmascaramiento de la cepa a ensayar. La matriz que logró esta condición, fue la matriz iii); es decir la salchicha esterilizada (15 min a 121 °C); por lo que se utilizó la salchicha tipo Viena esterilizada para realizar las pruebas en las que inoculábamos la cepa en estudio.

8.3.1 Recuento de células viables en muestras esterilizadas e inoculadas con *Leuconostoc mesenteroides* MS1

Previamente, se describe la preparación del cultivo *overnight* que se utiliza para la inoculación de las muestras esterilizadas. Luego, se explican los muestreos que llevamos a cabo y los recuentos realizados.

8.3.1.1 Cultivo *overnight*

Para obtener el inóculo, la cepa se incuba 18 h a 30 °C en caldo MRS. Transcurrido ese tiempo se llevan los tubos, con el cultivo *overnight*, a heladera por 15 min. Se centrifugan los mismos 5 min a 3500 rpm, se extrae el sobrenadante y se desecha. Se adicionan 5 mL de agua peptonada a 8 °C y se vuelve a centrifugar 5 min a 3500 rpm. Luego, se extrae el sobrenadante y se desecha. Al residuo que queda en el tubo se le denomina *pellet*

A este último se lo suspende en 5 mL de agua peptonada y se procede a realizar diluciones decimales, también en agua peptonada, y sembrar en placa de Petri con MRS agar para realizar el recuento en placa del *pellet*, después de incubar a 30 °C por 48 horas.

Trascurrido el tiempo de incubación, se toma la dilución cuyo recuento sea de aproximadamente de 10² UFC/mL. Se toman 0.2 mL de ésta y se procede a la inoculación de las muestras de salchichas esterilizadas previamente. Se obtiene una concentración final de 10³ UFC/g, como se puede apreciar en el cálculo siguiente. Esta parte del trabajo se basó en Dussault et al., (2014) pero con adaptaciones al producto en estudio.

$$\frac{UFC}{g} = 10^2 \frac{UFC}{mL} \times \frac{25 mL}{2.5g} = 10^3 \frac{UFC}{g}$$

Cabe mencionar que los 25 mL de la ecuación, surgen de sumar el volumen de agua peptonada 22.5 mL, para los recuentos de células viables, y los gramos de salchichas, teniendo en cuenta además los mililitros de antimicrobiano adicionado y los mililitros del inóculo.

Para estas pruebas preliminares, se esteriliza la salchicha en las mismas condiciones que el medio de cultivo MRS; es decir, a 121 °C por 15 minutos. Para llevar a cabo esta etapa se procede a trozar las salchichas en rodajas de 2.5 g aproximadamente, se colocan en Erlenmeyer (tapado con algodón y papel aluminio), y se llevan a autoclave. Luego se procede a la preparación de las muestras y se realiza el recuento de células viables a los 0, 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42 días. Se preparan las siguientes muestras:

- i. salchicha estéril sin inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y sin antimicrobiano (control del proceso de esterilización)
- ii. salchicha estéril sin inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y con antimicrobiano (control del antimicrobiano)

- iii. salchicha estéril con inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y sin antimicrobiano (control del crecimiento de la cepa en estudio, en el lapso de tiempo que duró el experimento)
- iv. salchicha estéril con inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y con las siguientes cantidades y tipo de antimicrobiano:
 - a. *Aloysia polystachya* (0.1; 0.5 o 0.7 mL)
 - b. *Laurus nobilis* (0.5 mL)
 - c. *Eucalyptus cinerea* (0.5 mL)
 - d. L-carvona (0.1; 0.5 o 0.7 mL)

Estas últimas, las muestras con inóculo y con cada aceite esencial o el compuesto puro, son para testear la inhibición en la matriz alimentaria.

En la figura 8.2. se pueden apreciar las bolsas estériles con las rodajas de salchichas tipo Viena, en la campana de flujo laminar, para proceder a la preparación de los distintos tratamientos.



Fig. 8.2. Preparación de las muestras con diferentes tratamientos.

En la figura 8.3. se puede ver cómo se guardan las muestras, con los diferentes tratamientos, en refrigeración para su posterior recuento. En placas de Petri estériles se colocan 4 bolsas conteniendo muestras con el mismo tratamiento, y se guardan en la heladera para los recuentos posteriores.



Fig. 8.3. Placas de Petri conteniendo las muestras de cada tratamiento.

En la figura 8.4. se muestra uno de los recuentos realizados, para dos tratamientos de salchichas estériles e inoculadas con *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Las placas superiores contienen 0.5 mL de L-carvona y las placas inferiores carecen de antimicrobiano. Se pueden apreciar las diluciones - 1, -2 y -3, contando desde la primera placa de la izquierda hacia la derecha.

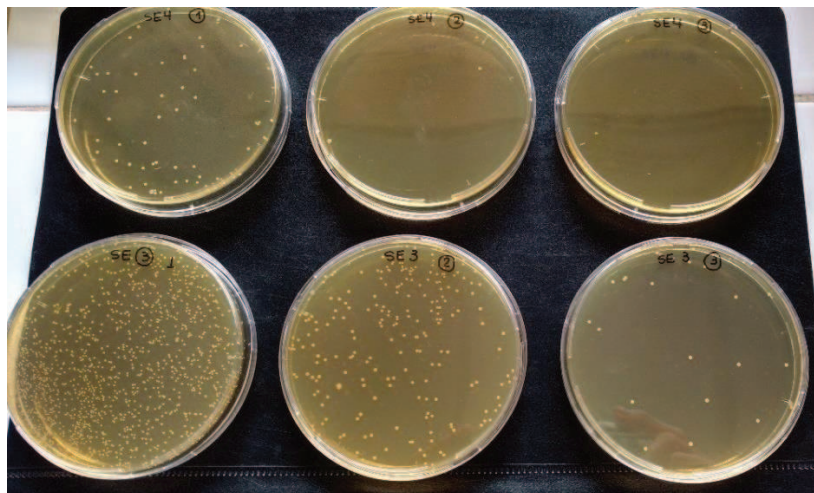


Fig. 8.4. Recuento en placa de diluciones decimales de diferentes muestras de salchichas estériles inoculadas. Las placas superiores contienen 0.5 mL de L-carvona, y las placas inferiores carecen de antimicrobiano.

En la tabla 8.1., se muestran los resultados de las muestras inoculadas con *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y con diferentes cantidades de los antimicrobianos seleccionados: *Aloysia polystachya* (0.1; 0.5; 0.7 mL), *Laurus nobilis* (0.5 mL), *Eucalyptus cinerea* (0.5 mL) y el compuesto puro L-carvona (0.1; 0.5 mL). En el caso de las muestras control, de salchicha estéril, el valor

estimado es menor a 1 UFC/g, durante las experiencias. Vale destacar que se realizó la prueba con la adición de 0.7 mL de aceite esencial de *Aloysia polystachya* dado que éste contiene casi un 90 % de L-carvona. En la tabla 8.1. se pueden ver los valores de UFC/g con las diferentes cantidades de antimicrobiano adicionada, comparándolas con la salchicha inoculada sin adición de antimicrobiano.

Tabla 8.1. Comparación entre los valores de UFC/g de la salchicha inoculada con *Leuconostoc mesenteroides* MS1 sin adición de antimicrobiano (AM) y con adición de los AE y el compuesto puro.

UFC/g de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MS1								
Días	Salchicha inoculada, sin AM	Salchicha inoculada, con el agregado de 0.1 mL de AE de <i>Aloysia polystachya</i>	Salchicha inoculada, con el agregado de 0.1 mL de L-carvona	Salchicha inoculada, con el agregado de 0.5 mL de AE de <i>Aloysia polystachya</i>	Salchicha inoculada, con el agregado de 0.5 mL de L-carvona	Salchicha inoculada, con el agregado de 0.7 mL de <i>Aloysia polystachya</i>	Salchicha inoculada, con el agregado de 0.5 mL de <i>Laurus nobilis</i>	Salchicha inoculada, con el agregado de 0.5 mL de <i>Eucalyptus cinerea</i>
0	3.63×10^3	4.07×10^3	6.16×10^3	2.75×10^3	2.20×10^3	1.12×10^4	1.10×10^3	2.20×10^3
2	3.85×10^5	3.52×10^5	9.24×10^4	7.59×10^3	1.10×10^3	3.25×10^4	3.96×10^3	3.52×10^3
7	8.14×10^6	2.48×10^7	1.20×10^6	2.35×10^5	6.82×10^3	9.79×10^3	1.79×10^3	3.85×10^3
14	1.00×10^8	6.00×10^7	3.05×10^6	1.00×10^5	5.61×10^3	1.28×10^3	1.23×10^3	2.75×10^3
21	1.00×10^8	4.85×10^6	5.06×10^6	8.00×10^4	4.18×10^3	1.08×10^3	9.90×10^2	2.08×10^3
28	6.49×10^7	3.85×10^6	1.35×10^6	6.40×10^4	1.32×10^3	1.06×10^3	1.01×10^3	1.34×10^3
35	1.03×10^8	2.59×10^6	4.23×10^6	5.28×10^4	1.10×10^3	9.57×10^2	1.05×10^3	1.29×10^3
42	5.50×10^7	3.63×10^6	2.87×10^6	9.90×10^3	1.20×10^3	8.25×10^2	9.68×10^2	1.14×10^3

En la figura 8.5. se puede apreciar la relación entre los recuentos de las muestras de salchichas inoculadas sin adición de antimicrobiano y las muestras adicionadas de 0.1 mL de AE de *Aloysia polystachya* o 0.1 mL de L-carvona.

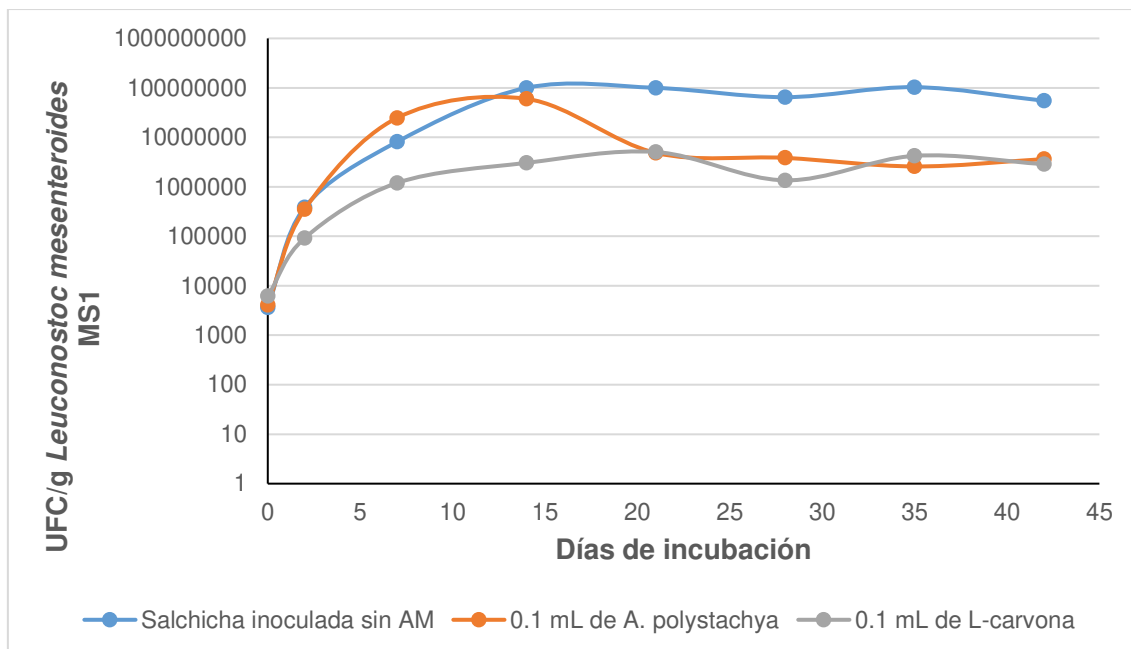


Fig. 8.5. Comparación entre los valores de UFC/g de la salchicha inoculada con *Leuconostoc mesenteroides* MS1 sin adición de antimicrobiano y con adición de 0.1 mL de AE de *Aloysia polystachya* o 0.1 mL de L-carvona.

Como se puede apreciar en la figura anterior, las muestras adicionadas con 0.1 mL de AE de *A. polystachya* o 0.1 mL del compuesto L-carvona, muestran un crecimiento de la cepa con valores muy similares a la que se obtiene frente a la salchicha esterilizada e inoculada con *Leuconostoc mesenteroides* MS1, lo que se traduce como una no inhibición del desarrollo frente a esta cantidad de antimicrobiano.

En la figura 8.6. se pueden visualizar las relaciones entre los recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 de las muestras de salchicha sin agregado de antimicrobiano y las muestras con agregado de 0.5 mL o 0.7 mL de *Aloysia polystachya* o de 0.5 mL de L-carvona.

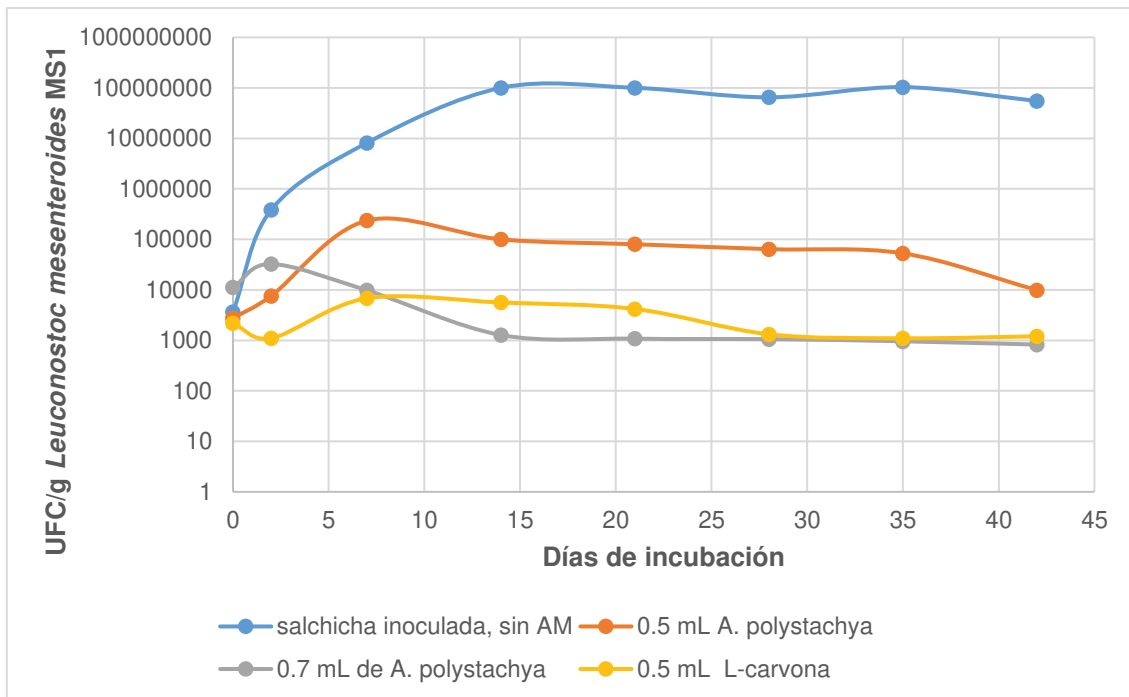


Fig. 8.6. Comparación entre los valores de UFC/g de la salchicha inoculada con *Leuconostoc mesenteroides* MS1 sin adición de antimicrobiano y con adición de 0.5 mL de AE de *Aloysia polystachya*, 0.7 mL de AE de *Aloysia polystachya* o 0.5 mL de L-carvona.

Como se puede apreciar en la figura 8.6., al incrementar la cantidad de antimicrobiano (0.5 mL de L-carvona y 0.7 mL de AE de *A. polystachya*) el recuento se mantiene, aproximadamente, en el orden de 10^3 UFC/g. Mientras que al adicionar 0.5 mL de *A. polystachya* el recuento se mantiene en el orden de 10^4 UFC/g.

En la figura 8.7. se muestra la relación entre los recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 de las muestras de salchicha inoculada y sin agregado de antimicrobiano, con respecto a las muestras adicionadas con 0.5 mL de AE de *Laurus nobilis* o 0.5 mL de AE de *Eucalytus cinerea*.

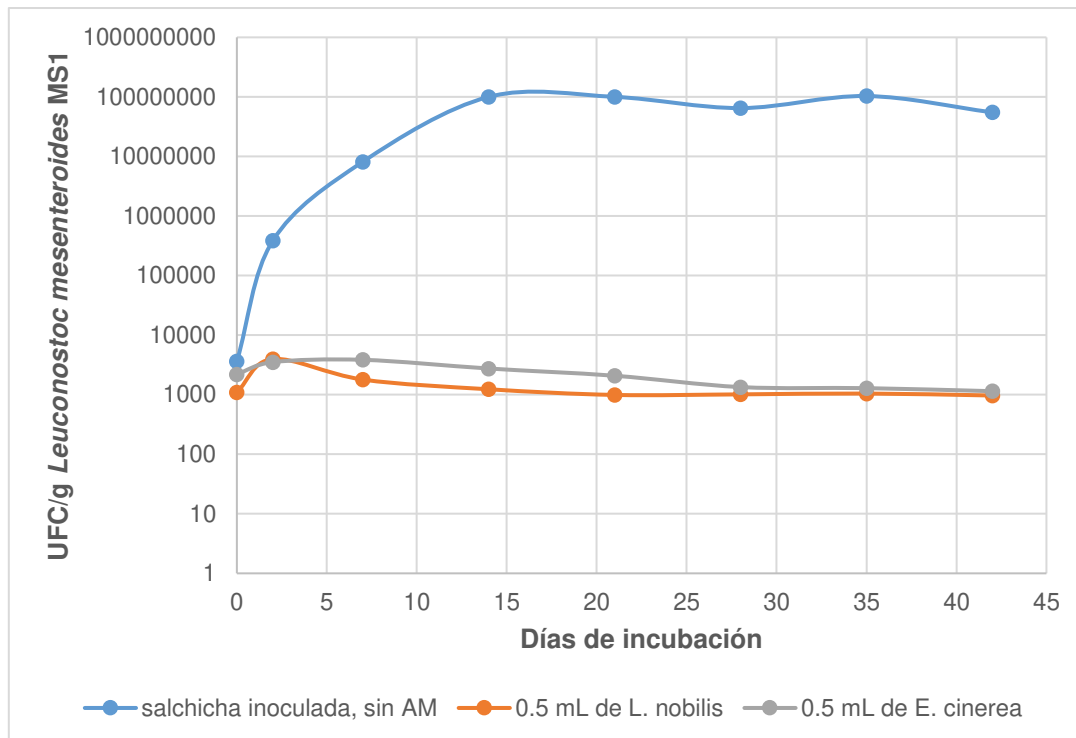


Fig. 8.7. Comparación entre los valores de UFC/g de la salchicha inoculada con *Leuconostoc mesenteroides* MS1 sin adición de antimicrobiano y con adición de 0.5 mL de AE de *Laurus nobilis* o 0.5 mL de AE de *Eucalyptus cinerea*.

En la figura 8.7. se puede visualizar que los recuentos con la adición de 0.5 mL de AE de *L. nobilis* o 0.5 mL de AE de *E. cinerea*, se mantienen en el orden de 10^3 UFC/g, como con el agregado de 0.7 mL de *A. polystachya* y 0.5 mL de L-carvona.

8.3.2 Recuento de células viables en muestras de salchichas sin esterilizar

Cabe mencionar que, a nivel industrial, una vez que las salchichas son cocidas, se les retira la tripa artificial de celulosa (calibre de 21 – 22 mm), se adiciona, en forma de aspersion, ácido láctico para la preservación de la vida útil de las mismas y, luego, se envasan al vacío. En nuestro caso, y con el fin de escalar los ensayos realizados en laboratorio, procedemos a colocar por aspersion aceite de *Aloysia polystachya* y L-carvona, en reemplazo del ácido láctico, y realizamos el recuento de células viables, por triplicado, a 0, 2, 7, 14 y 21 días.

Cabe mencionar que para estas pruebas se utilizan los extractos de *Aloysia polystachya* y el compuesto puro L-carvona, debido a que *Aloysia*

polystachya es autóctona de nuestra provincia y el rendimiento en la extracción es superior al de *Laurus nobilis*. Además, *Eucalyptus cinerea*, es una materia prima difícil de conseguir, ya que se cultiva en una proporción mucho menor que el *Eucalyptus tereticornis*. El compuesto L-carvona se adquiere comercialmente, y existe en la ciudad de San Francisco, un proveedor de la misma.

Como se menciona en la sección 8.2 (Métodos de aplicación de los AE en alimentos) del presente capítulo, utilizamos para aplicar el aceite esencial y el compuesto puro, el método de adición directa rociando la superficie del alimento.

Para esta segunda etapa de las pruebas en la matriz alimentaria, se obtienen, de la planta de producción, muestras de salchichas antes de la adición de ácido láctico y se procede a preparar las muestras para el posterior recuento en placa. También se adquiere un paquete de salchichas envasado ese mismo día.

Se toman rodajas de 2.5 g aproximadamente y se colocan en bolsas estériles. Estas muestras no se esterilizan, ya que se trabajan como si se estuviera realizando la prueba en la planta de producción. Las muestras que se preparan son las siguientes:

- i. salchicha con ácido láctico (envasadas por la Empresa), (control)
- ii. salchicha sin ácido láctico, (control)
- iii. salchichas sin ácido láctico con 0.7 mL de aceite de *Aloysia polystachya*,
- iv. salchichas sin ácido láctico con 0.5 mL de L-carvona,
- v. salchichas sin ácido láctico con aceite de *Aloysia polystachya* aplicado por aspersion (0.025 – 0.028 g),
- vi. salchichas sin ácido láctico con L-carvona aplicada por aspersion (entre 0.21 – 0.22 g).

Las cantidades adicionadas del aceite esencial de *Aloysia polystachya* y L-carvona (0.7 y 0.5 mL respectivamente), son las mismas utilizadas para inhibir a *Leuconostoc mesenteroides* MS1, en muestras de salchichas esterilizadas e inoculadas, que lograron mantener el recuento de células viables en el orden de 10^3 UFC/g, como mencionamos en la figura 8.6.

Las cantidades agregadas por aspersion, fueron las que nos permitió el pulverizador del envase, que se puede apreciar en la figura 8.8. El aceite esencial

o el compuesto puro se aplicó por aspersión de ambos lados de la muestra, dentro de la bolsa, se aplicó una vez por cada lado. Luego, se procedió al recuento de células viables a 0, 2, 7, 14, 21 días (Schirmer, 2010). Como control se tomaron las muestras de salchicha con ácido láctico y sin ácido láctico; es decir, la i) y ii).



Fig. 8.8. Envase spray para agregar, por aspersión, el AE de *Aloysia polystachya* y L-carvona.

En cada uno de los casos se procede a determinar el recuento de microorganismos en función del tiempo: 0, 2, 7, 14 y 21 días. Para realizar el recuento de microorganismos, a la muestra de salchicha se adicionan 22.5 mL de agua peptonada y se homogeneiza, manualmente, por el lapso de 2 minutos. Se deja decantar la mezcla, se toma 1 mL de ésta, se procede a realizar diluciones decimales y la correspondiente siembra en placa de Petri con medio agar MRS, incubando 48 h a 30 °C (Madigan et al., 2004).

Se pudo observar en las muestras adicionadas con 0.5 mL de L-carvona o 0.7 mL de AE de *Aloysia polystachya*, que el desarrollo de BAL en agar MRS fue menor al límite de detección de 50 UFC/g.

En la tabla 8.2. se muestran los recuentos de BAL, en agar MRS, en las muestras sin adición de antimicrobiano (salchichas con y sin ácido láctico) y las muestras de salchichas con adición de 0.025 – 0.028 g de AE de *Aloysia polystachya* o 0.21 – 0.22 g de L-carvona por aspersión. Estos resultados se muestran en la figura 8.9.

Tabla 8.2. Recuentos de BAL, en agar MRS, en las muestras de salchichas tipo Viena con y sin ácido láctico, con la adición de L-carvona o AE de *Aloysia polystachya* por aspersion.

Días	CL (UFC/g)	SL (UFC/g)	CA _{asp} (UFC/g)	CC _{asp} (UFC/g)
0	$4,13 \times 10^3$	$3,30 \times 10^2$	$1,10 \times 10^2$	$5,50 \times 10^1$
2	$1,65 \times 10^6$	$2,64 \times 10^5$	$6,49 \times 10^2$	$3,52 \times 10^4$
7	$1,18 \times 10^9$	$8,47 \times 10^6$	$2,04 \times 10^6$	$1,57 \times 10^6$
14	$1,30 \times 10^9$	$1,43 \times 10^7$	$6,60 \times 10^5$	$6,05 \times 10^6$
21	$1,53 \times 10^8$	$1,45 \times 10^7$	$1,21 \times 10^6$	$7,70 \times 10^5$

CL: muestra de salchicha con ácido láctico

SL: muestra de salchicha sin ácido láctico

CA_{asp}: muestra de salchicha sin ácido láctico con agregado de 0.025 – 0.028 g de AE de *Aloysia polystachya* por aspersion

CC_{asp}: muestra de salchicha sin ácido láctico con agregado de 0.21 – 0.22 g de L-carvona por aspersion

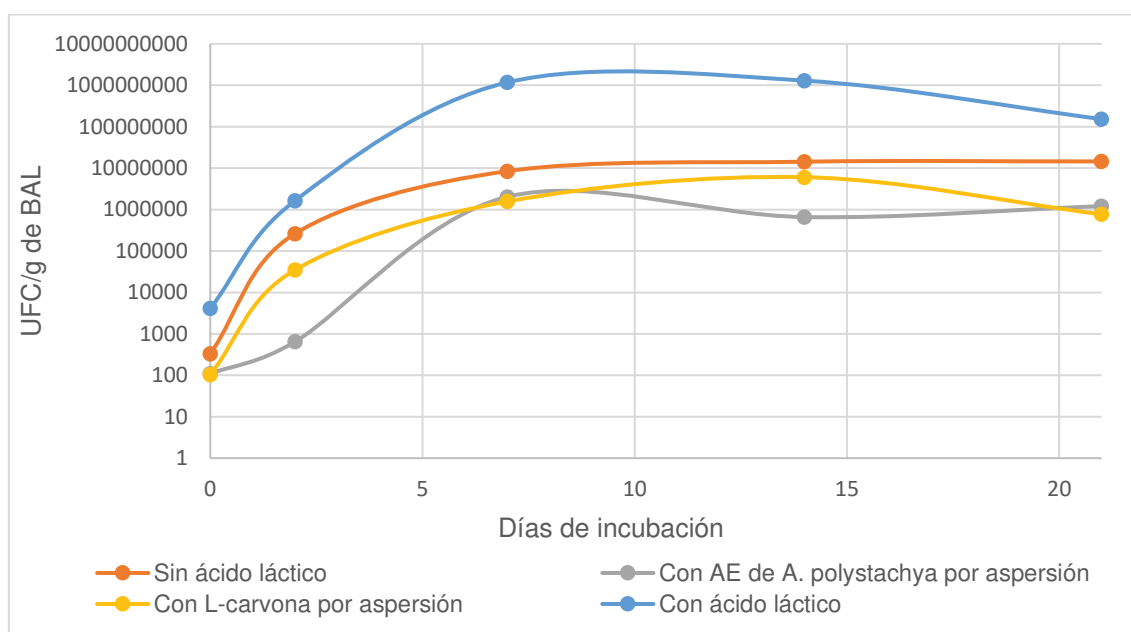


Fig. 8.9. Comparación de los valores UFC/g de BAL de las diferentes muestras de salchichas analizadas, en agar MRS.

Cabe mencionar que las muestras de salchicha sin ácido láctico y sin agregado de antimicrobiano, presentan un menor recuento de bacterias ácido lácticas, en agar MRS, que las muestras de salchicha con ácido láctico, adicionado por aspersion, en la línea de producción.

En la figura 8.9. se muestran los recuentos de BAL en la salchicha sin ácido láctico y en la salchicha sin ácido láctico adicionada con aceite esencial de *Aloysia polystachya* o L-carvona por aspersion. Como se puede apreciar, en ambos tratamientos, se mantienen los recuentos en un orden menor al de la muestra de salchicha sin ácido láctico. Por lo que podrían ser utilizados, en un futuro, como antimicrobianos naturales.

8.4 Ejemplos de aplicación de aceites esenciales en salchichas

Como se mencionó previamente en la sección 8.2 (Métodos de aplicación de los AE en alimentos), se requieren niveles de AE más altos para efectuar la inhibición en los alimentos que en los medios de cultivo. Se estima que aproximadamente el 60 % de las especias en los Estados Unidos se consumen en el comercio minorista, y que al menos la mitad del uso industrial es en la industria cárnica, principalmente en la fabricación de salchichas (Shelef, 1983).

En el estudio realizado por Badia et al. (2019) se concluyó que los AE de orégano y romero, en salchicha toscana refrigerada envasada al vacío, ralentizaron el crecimiento de BAL, pero no cambiaron la población bacteriana máxima; ya que estos autores evaluaron el tiempo que tarda la población bacteriana en alcanzar valores de 10^6 y 10^7 UFC/g, para lograr estimar si aumentaba o no la vida útil del producto (Badia et al., 2019). En este sentido, el extracto de romero también inhibió bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, en salchichas de cerdo frescas (Georgantelis et al., 2007).

Además, para extender la vida útil de las salchichas cocidas almacenadas en refrigeración, se puede aplicar con éxito el AE de nuez moscada (*Myristica fragans*), el cual influye en la oxidación de lípidos y el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias totales (Šojić et al., 2015).

Por otra parte, se estudió la inhibición de *Listeria monocytogenes* sobre salchichas tipo bologna aplicando un film antimicrobiano que contiene extracto de mostaza o sinigrina (Lara-Lledó et al., 2012) y se investigó la actividad antimicrobiana de extractos de la planta *Petiveria alliacea* L en distintas condiciones experimentales (Sariego et al., 2013). También, un film de quitosano con el agregado de extracto de té verde fue utilizado como envase activo para extender la vida en anaquel de salchichas de cerdo (Siripatrawan y Noipha,

2012). Araújo et al. (2018) ensayaron combinaciones de aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) y nisina, en salchichas frescas, observando una reducción significativa de la población de *Escherichia coli* (Araújo et al., 2018).

Por su parte, se ha documentado el uso de caoba china y romero, en salchichas frescas de pollo, conservadas en refrigeración a 4 °C (Lucera et al., 2012).

En salchichas cocidas de pollo se utiliza, como agente bactericida, aceite de mostaza (Burt, 2004). También es ampliamente utilizado el aceite de orégano en carnes envasadas (Vergis et al., 2015).

Para otras clases de salchichas, como ser salchichas de cerdo envasadas al vacío, salchichas frescas de cerdo, salchichas secas curadas, salchichas de pollo, entre otras, se utilizan los siguientes antimicrobianos naturales: quitosano, extractos polifenólicos de cereza y hojas de grosella negra, AE de albahaca, laurel, pimienta negra, canela, ajo, nuez moscada, comino, limón, naranja, orégano, perejil, romero, estragón y tomillo. Estos últimos aplicados sobre las salchichas, pero teniendo en cuenta las limitaciones sensoriales (Pisoschi et al., 2018).

Otros autores (Mello da Silveira et al., 2014) evaluaron la actividad antimicrobiana del AE de hoja de laurel en salchicha toscana fresca almacenada en refrigeración, pudiendo extender la vida útil del producto por dos días.

En salchichas almacenadas a 4 °C y envasadas bajo vacío se ha documentado el uso de lactato de sodio como alternativa al uso de nitrito (Lucera et al., 2012). Se ha encontrado, también, que una combinación de carvacrol (presente en aceites esenciales de orégano, tomillo, ají y bergamota salvaje) y surfactantes catiónicos fue efectiva en la inhibición del crecimiento bacteriano en productos cárnicos (Saurabh et al., 2017.).

Respecto a la aplicación de bacteriocinas en salchichas tipo Viena, en el trabajo presentado por Álvarez et al. (Álvarez et al., 2014), se evaluó la capacidad bioprotectora de *Lactobacillus sakei* en salchichas tipo Viena, obteniéndose reducción en el recuento de *Listeria innocua* en las condiciones ensayadas. Otros autores (Rivas et al., 2014) reportaron un estudio que determinó la funcionalidad de la bacteriocina sakacina Q aplicada en salchichas tipo Viena. En este último estudio se obtuvieron resultados efectivos frente a

bacterias lácticas y mesófilos totales desde el inicio del ensayo (Lopez et al., 2014).

8.5 Ejemplos de aplicación de aceites esenciales contra *Leuconostoc mesenteroides*

El uso de extractos naturales para la inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* también está siendo estudiado. En este sentido, Radha Krishnan et al., (2014) han observado el poder inhibitorio de extractos acuosos de *Syzygium aromaticum*, *Cinnmomum cassia*, *Origanum vulgare* y *Brassica nigra* y han encontrado, que la concentración mínima inhibitoria fue de 15, 10, 20 y 25 mg/mL para cada uno de los extractos respectivamente. Por su parte Kivanç et al. (1991) han encontrado un efecto inhibitorio utilizando aceite esencial de orégano (150, 300 y 600 ppm), mientras que han encontrado un efecto estimulador con el uso de comino (300 y 600 ppm) frente al crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* (Carvalho et al., 2015). A su vez, se encontró que el ácido jasmónico, obtenido en plantas por lipoxigenación del ácido linolénico, posee un efecto inhibitorio sobre *Leuconostoc mesenteroides* a concentraciones superiores a 2 ppm en medio sólido (Michelena et al., 2005). Por su parte, en el trabajo de Fernández-López et al. (2005) han encontrado que el extracto de ajo (Aquaresin® garlic), el extracto de fibra de limón y el extracto de fibra de naranja no presentan inhibición frente a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 824 y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 882. Por el contrario, el extracto acuoso y el aceite esencial (en adelante AE) de romero (Herbalox® Type W), extracto acuoso de romero (Duralox®) y extracto oleoso de romero (Herbalox® Type HTO) presentan inhibición frente a estas dos cepas bacterianas, siendo mayor el efecto con el extracto oleoso de romero (Fernández-López et al., 2005).

Targino de Souza Pedrosa et al. (2019) utilizaron AE de *Citrus lemon* y *Citrus reticulata* para el control de BAL autóctonas (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc mesenteroides*) en jugos de manzana y naranja, combinados con tratamientos térmicos suaves; logrando disminuir los recuentos de todas las cepas (Targino de Souza Pedrosa et al., 2019).

Leuconostoc mesenteroides también está presente como una de las bacterias autóctonas de la masa idli, que es un alimento fermentado. Regubalan et al. (2018) descubrieron que el AE de mostaza es el mejor bioconservante que mostró un efecto biocida contra cepas BAL, logrando extender la vida útil del producto (Regubalan y Ananthanarayan, 2018). Cabe aclarar que los bioconservantes se pueden definir como compuestos, de fuentes naturales o formados en los alimentos, capaces de prevenir o retrasar el deterioro relacionado con el deterioro químico o biológico que prolongan la vida útil del producto (Mani-lópez et al., 2018).

Según el trabajo realizado por Marchese et al. (2016), el timol inhibe el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, además de otras BAL. En la investigación llevada a cabo por Moosavi-Nasab et al. (2016) se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana sobre *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* utilizando AE de *Satureja hortensis* (cogollos florales de marze), *Trachyspermum ammi* (ajowan), *Mentha piperita* (menta), *Aloysia citrodora* (cedrón), *Foeniculum vulgare* (hinojo). Tanto *Satureja hortensis* como *Trachyspermum ammi* redujeron eficazmente el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Moosavi-Nasab et al., 2016).

Khorsandi et al. (2018) encontraron que una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* fue la más susceptible frente al AE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y al AE de curcuma (*Curcuma longa*) (Khorsandi et al., 2018).

Es interesante destacar los resultados que obtuvieron Schirmer et al. (2010) al aplicar timol, cinamaldehído, isotiocianato de alilo, ácido cítrico, ácido ascórbico, extracto de romero y extracto de semilla de pomelo, contra varias bacterias entre las que se encuentra *Leuconostoc mesenteroides*. Las concentraciones de antimicrobianos de hasta 10 veces los valores de CIM no mostraron ningún efecto sobre el crecimiento bacteriano total en la carne de cerdo envasada al vacío, lo que significa que, aunque la mayoría de los antimicrobianos inhibieron el crecimiento de bacterias de descomposición *in vitro*, los resultados no se pudieron transferir al sistema natural. La mayoría de los antimicrobianos naturales poseen fuerte olor y sabor que limitan su uso como conservante de alimentos, como ya hemos mencionado en la sección 2.3.1.4 (Efectos sensoriales), lo que concuerda con la opinión de la mayoría de los especialistas en el tema (Schirmer et al., 2010).

8.6 Ejemplos de aplicación de conservantes químicos y bacteriocinas contra *Leuconostoc mesenteroides*

Con respecto al uso de aditivos, se ha observado que la adición de sales orgánicas da como resultado una vida útil más prolongada del producto (Badia et al., 2019; Diez et al., 2009). En este sentido, la influencia del pH y la temperatura en el crecimiento y acción bactericida frente a *Leuconostoc mesenteroides* L124 fue evaluada por Mataragas et al. (2003). Otros autores (Blaszyk y Holley, 1998) han encontrado que la combinación de monolaurina, eugenol y citrato de sodio ha sido más efectiva que cada uno de los componentes por separado contra el crecimiento de *Leuconostoc mesenteorides*. Otro estudio (Gill y Holley, 2000) reportó que los tratamientos combinados con lisozima (500 mg/kg), nisina (1:3) y EDTA (500 mg/kg) pueden ser usados para control de la colonización y del crecimiento de esta bacteria entre otras. Lozano Rodríguez et al. (1992), por su parte, evaluaron y analizaron el desarrollo antimicrobiano de *Leuconostoc mesenteroides* bajo diferentes combinaciones de nisina, ácido láctico, ácido cítrico, mezcla nisina-ácido láctico y mezcla nisina-ácido cítrico. Ángel et al. (2009) establecieron que las sales CaCl_2 , NaClO , EDTA, NaNO_2 , Na_2SO_3 y $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ son un buen agente de control en las fermentaciones por *Leuconostoc mesenteroides*, y mostraron eficiencia en su inhibición.

Con respecto a la utilización de microorganismos bactericidas, se observó que la bacteria *Lactobacillus sakei* 10 A, de metabolismo homofermentativo, en alimentos cárnicos envasados al vacío inhibe el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, entre otras bacterias de metabolismos heterofermentativos (Vermeiren et al., 2006)

Cabezas-pizarro et al. (2017) han obtenido que las sales de sodio son más inhibitorias que las sales de potasio, frente a *Leuconostoc mesenteroides*.

Yost y Vandemark (1978) obtuvieron una disminución de la tasa de crecimiento menor en *Leuconostoc mesenteroides*, que en *Streptococcus mutans*, frente a fluoruro de sodio.

Según lo informado por De Paula et al. (2014) el género *Leuconostoc* es sensible al etanol, como hemos verificado en los ensayos de sensibilidad antimicrobiana.

La nisina, aparece como otro bactericida para salchichas cocidas y contra el género *Leuconostoc* (Pisoschi et al., 2018). En este sentido, en el estudio realizado por Lozano Rodriguez et al. (1992), la adición de nisina y ácido orgánicos (ácido láctico y ácido cítrico) en la formulación de salchichas, representa una medida de control sobre el desarrollo de *Leuconostoc mesenteroides*. El ácido láctico y sus sales se han utilizado ampliamente en la industria cárnica para aumentar el sabor y, en gran medida, la vida útil del producto (Aymerich et al., 2008).

Blaszyk y Holley (1998) investigaron las interacciones de monolaurina, eugenol y citrato de sodio (quelante) en el crecimiento de seis organismos, entre ellos *Leuconostoc mesenteroides*. Obtuvieron que monolaurina y eugenol inhibieron el crecimiento de esta especie, pero el citrato de sodio promovió significativamente el crecimiento.

8.7 Conclusiones

En este capítulo se llevaron a cabo los recuentos de células viables (MRS agar) en salchichas esterilizadas e inoculadas con *Leuconostoc mesenteroides* MS1. A la muestra de salchicha tipo Viena esterilizada, se le realizaron diferentes tratamientos, a saber: i) a) salchichas esterilizadas sin inóculo y sin agregado de antimicrobiano; i) b) salchichas esterilizadas sin inóculo y con antimicrobiano (se adicionó 0.1 mL de *Aloysia polystachya*, 0.5 mL de *Eucalyptus cinerea*, 0.5 mL de *Laurus nobilis* o 0.1 mL de L-carvona); i) c) salchichas esterilizadas e inoculadas pero sin agregado de antimicrobiano; i) d) salchichas esterilizadas e inoculadas con agregado de antimicrobiano (*Aloysia polystachya*, 0.1; 0.5 o 0.7 mL; *Eucalyptus cinerea*, 0.5 mL; *Laurus nobilis*, 0.5 mL; L-carvona, 0.1; 0.5 o 0.7 mL). Las muestras i) a), i) b) y i) c) son tomadas como controles del proceso de esterilización, de la carga bacteriana inicial del antimicrobiano y del crecimiento normal del inóculo, respectivamente. Los recuentos se realizaron a 0, 2, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días.

Además, se realizó el estudio en salchichas de la planta productora de elaboración, es decir, con la microbiota natural del producto, sin esterilizar y sin inocular. Para este caso, a la muestra de salchicha tipo Viena se le realizaron los siguientes tratamientos: ii) a) salchichas envasadas con ácido láctico; ii) b)

salchichas envasadas sin ácido láctico y sin el agregado de antimicrobiano; ii) c) salchichas envasadas sin ácido láctico, con diferentes cantidades de antimicrobiano (Aceite esencial de *Aloysia polystachya*, 0.7 mL o 0.025 – 0.028 g por aspersion; L-carvona, 0.5 mL o 0.21 – 0.22 g por aspersion). En estas muestras, el recuento se llevó a cabo hasta el día 21, debido al inicio de la pandemia por Covid19 y que impidió acceder a los laboratorios. Sin embargo, existen pruebas en matrices alimentarias con recuentos en placa, en esa cantidad de días, como es el caso de Schirmer (2010), autor citado en este capítulo.

Como se puede apreciar en los recuentos realizados, el aceite esencial de *Aloysia polystachya* y el compuesto puro L-carvona mantienen los recuentos de bacterias ácido lácticas, que desarrollan en agar MRS, en las salchichas, en un orden menor al de las muestras de salchichas sin ácido láctico. Por lo que podrían ser utilizados, en un futuro, como antimicrobianos naturales.

También se muestran algunos ejemplos de aplicación de aceites esenciales en salchichas tipo Viena, y estudios realizados específicamente, sobre el género *Leuconostoc*.

Capítulo IX

9. Conclusiones y trabajo a futuro

9.1 Conclusiones generales

Los aceites esenciales son productos naturales que consisten en mezclas complejas de muchas moléculas volátiles. Se han utilizado para diversas aplicaciones en las industrias farmacéutica, cosmética, agrícola y alimentaria. La extracción podría realizarse mediante diversas técnicas. Los métodos innovadores evitan las deficiencias de las técnicas convencionales, como el riesgo de alteración química, el largo tiempo de extracción y el elevado aporte de energía. A pesar de sus numerosas aplicaciones, los aceites esenciales son muy sensibles a los factores ambientales cuando se usan como tales. La encapsulación ha surgido como una alternativa relevante que podría mejorar la estabilidad de los aceites esenciales. Se han utilizado con éxito varias técnicas para lograr este propósito con resultados interesantes, como ser eficacia mejorada y liberación sostenida (Asbahani et al., 2015; Dima y Dima, 2015).

Algunos aceites esenciales exhiben actividades limitadas y actúan contra una clase de microorganismos; es decir, son activos solo en un sistema de prueba específico contra un grupo definido de microorganismos. Varias razones pueden ser responsables de que los resultados de diversos autores no puedan ser comparables: variabilidad natural en la composición de los aceites esenciales, variabilidad natural en la susceptibilidad de microorganismos, diferentes parámetros en los métodos de análisis microbiológicos, entre otros (Can Baser y Buchbauer, 2010).

La composición de los aceites esenciales depende de varios factores: parte de la planta utilizada, lugar de crecimiento, clima, variación natural (variedades, subespecies y quimiotipos), tiempo de recolección, producción, condiciones de almacenamiento y parámetros de análisis en la identificación de compuestos. Debido a que algunos de estos factores de influencia difieren de un año a otro, no se puede esperar una composición constante de un elemento esencial, incluso cuando se cultiva y produce en el mismo lugar. Los quimiotipos poseen en parte una composición completamente diferente. La caracterización de los aceites esenciales con propiedades físicas por sí solas (por ejemplo,

densidad y solubilidad) no es suficiente para una definición inequívoca de sus componentes. En el mejor de los casos, la destilación, el análisis y el examen farmacológico de un aceite esencial se realizan en estrecha relación (Can Baser y Buchbauer, 2010)

En resumen, muchos AE exhiben actividad contra patógenos transmitidos por los alimentos y organismos de descomposición *in vitro*, y en menor grado, en los alimentos. Los organismos Gram positivos parecen ser mucho más susceptibles a los AE que los organismos Gram negativos. Las investigaciones futuras deberían centrarse en la eficacia de diferentes AE en diversas matrices alimentarias. También será necesario investigar la sinergia entre los AE y otros compuestos o con otras técnicas de procesamiento antes de que puedan aplicarse comercialmente (Calo et al., 2015). Además, se deben realizar mayor cantidad de estudios toxicológicos sobre aceites esenciales y su efecto en la salud del consumidor (Dima y Dima, 2015).

De los ensayos de sensibilidad microbiana se ha encontrado que los aceites esenciales obtenidos de la cáscara de *Citrus lemon* (limón), de las hojas de *Aloysia polystachya* (burro), *Eucalyptus cinerea* (eucalipto), *Laurus nobilis* (laurel) y *Mentha pulegium* (poleo) pueden ser utilizados como potenciales inhibidores frente al crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Además, se ha encontrado que concentraciones pequeñas de eugenol en aceite de girasol, soluciones acuosas de hidroquinona y ácido salicílico poseen propiedades bactericidas frente a la misma (Serra et al., 2018).

Como resultado de la etapa de macrodilución en caldo, se han encontrado valores pequeños de CIM y CBM de los extractos evaluados, lo que significa que la cepa en estudio es sensible a los mismos. La CIM de los aceites esenciales y del compuesto puro se encontró entre los valores 0.64 y 1.89 mg/mL mientras que la CBM de los mismos se encontró entre los valores 0.76 y 2.41 mg/mL.

Se ha encontrado que la adición de 0.5 mL de L-carvona, 0.5 mL de *Eucalyptus cinerea*, 0.5 mL de aceite de *Laurus nobilis* y 0.7 mL de aceite de *Aloysia polystachya*, en una muestra de 2.5 g de salchicha estéril, es capaz de inhibir a *Leuconostoc mesenteroides* MS1, manteniendo el recuento inicial de células viables en el nivel de 10^3 UFC/g. Cabe mencionar que estas pruebas se realizaron con las salchichas envasadas al vacío con una semana desde la fecha de envasado.

En los análisis realizados en muestras de salchichas extraídas de la planta de producción, con su microbiota natural, y la adición de AE de *Aloysia polystachya* y el compuesto puro L-carvona, se logró mantener el recuento de bacterias ácido lácticas, que desarrollan en agar MRS, en un orden inferior al recuento en la muestra de salchicha sin ácido láctico y sin adición de antimicrobianos. Por lo tanto, se puede concluir que es un paso muy importante hacia el uso de estos extractos contra *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

9.2 Trabajo a futuro

Una de las líneas de investigación que nuestro grupo InProSus (Ingeniería de Procesos Sustentables) viene realizando durante los últimos diez años consiste en diseñar y desarrollar técnicas de extracción alternativas para aislar y purificar sustancias con actividad específica (aromas, antioxidantes, biocidas, antivirales, antitumorales, etc.) a partir de productos naturales, basándose en nuevas tecnologías, más respetuosas con el medio ambiente y que garanticen una calidad superior de los productos. En este sentido, ya hemos evaluado aceites esenciales y extractos obtenidos de semillas, por las técnicas de arrastre con vapor de agua, extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas; frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1, *Lactiplantibacillus plantarum* ES147 y ATCC 8014, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Además, esta línea de investigación ha llevado a cabo las técnicas microbiológicas para aislamiento, purificación, conservación, recuento en placa, estudios de sensibilidad por difusión en agar en disco, macrodilución en caldo. Se ha profundizado el estudio en salchichas tipo Viena con la microbiota natural del producto, además de esterilizar e inocular la matriz, con *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

En este sentido, y dada la experiencia adquirida durante el desarrollo de mi Tesis Doctoral, sería interesante continuar en la línea de investigación desarrollada por el grupo InProSus de la Dra. Alfonsina E. Andreatta, del Departamento de Ingeniería Química de la UTN Fac. Reg. San Francisco, para lograr incorporar los aceites esenciales estudiados y el compuesto puro L-carvona a la salchicha tipo Viena para evitar su deterioro previo a la fecha de caducidad.

Para llevar a cabo esta etapa se debe realizar el análisis sensorial, con un panel entrenado, del producto en estudio con el agregado, en diferentes cantidades, de los aceites esenciales de *Aloysia polystachya*, *Laurus nobilis*, *Eucalyptus cinerea* y el compuesto puro L-carvona. En este sentido, se trabajará con el grupo de INLAIN a cargo del Dr. Facundo Cuffia cuyas áreas de experiencia son la Ciencia y Tecnología de Lácteos, Análisis Sensorial y Ciencias del Consumidor.

Posteriormente, se deben realizar ensayos de toxicidad, para comprobar si los aditivos estudiados en las concentraciones usadas, son aptos para consumo humano. Algunos datos sobre este tema han sido vistos en la presente tesis; en la sección 2.3.1.1 (Situación regulatoria) se menciona que los aceites de laurel y de eucalipto y el compuesto L-carvona están aprobados para utilizar como aditivos en alimentos.

Todo ello nos permitiría conocer y profundizar si alguno de los aceites esenciales o el compuesto puro podrían ser adicionados por aspersion o microencapsulados, previo al envasado, a las salchichas tipo Viena.

Anexo I

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la beca doctoral obtenida en el marco de la Convocatoria 2014 – “Becas de formación de doctores para fortalecer las áreas de I+D+i”, de la Universidad Tecnológica Nacional, en base a la Resolución C. S. N° 1629/13. Por Resolución N° 476/14 del Consejo Superior, se obtuvo el décimo tercer lugar del orden de mérito de un total de dieciocho aspirantes.

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el marco de los proyectos de investigación, financiados con fondos públicos, que se detallan a continuación:

- “Inhibición de bacterias del género *Leuconostoc* a partir del uso de extractos vegetales naturales”, Res. 144/2018. PID2018 Mincyt Córdoba. Dirigido por la Dra. Alfonsina E. Andreatta, desde 01/04/2019 hasta el 31/10/2020.
- “Valorización de biomasa para la obtención de materiales activos y biodegradables”, código: IPUTI0004771TC, con incorporación en Programa de incentivos; dirigido por la Dra. Alfonsina E. Andreatta, homologado por Resolución de C.S. N° 317/2017, desde 01/01/2018 hasta el 31/12/2020.
- “Inhibición de bacterias del género *Leuconostoc* a partir del uso de extractos vegetales naturales”, código: IPUTNSF0003486TC, sin incorporación en Programa de Incentivos. Dirigido por la Dra. Alfonsina E. Andreatta, homologado por Resolución de C.S. N° 599/2014, desde 01/01/2015 hasta el 31/12/2017.

Publicaciones

Parte de los resultados de la presente tesis han sido divulgados a través de las siguientes publicaciones:

Publicaciones en revistas con referato

- Actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales en bacterias benéficas, patógenas y alterantes de alimentos – Revista Tecnología y Ciencia – Universidad Tecnológica Nacional. Abril 2020 / Año 18 – N° 37. Vignola M. B., Serra M. A., Andreatta A. E.

- Assessment of natural vegetal extracts in the inhibition of *Leuconostoc mesenteroides* MS1. – AgriScientia – Facultad de Ciencias Agropecuarias – Universidad Nacional de Córdoba. Vol.1, núm.35 (julio 2018). Serra M. A.; Garnero J.; Nicolau V.; Andreatta A. E.

Publicaciones en eventos científicos y de difusión

- Efectos antimicrobianos de aceites esenciales de *Laurus nobilis* y *Eucalyptus cinerea* aplicados en salchichas tipo Viena, inoculadas con *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Serra M. A., Quiberoni A. del L., Andreatta A. E. Jornadas CyT 2021 de la UTN Facultad Regional San Francisco. 27 y 28 de octubre de 2021. ISBN: en trámite. Trabajo completo
- Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Aloysia polystachya* y de R (-) carvona en salchichas tipo Viena. Serra M. A., Garnero J., Quiberoni A. del L., Andreatta A. E. Jornadas CyT 2020 “50 aniversario” de la UTN Facultad Regional San Francisco. 23 y 24 de setiembre de 2020. ISBN:978-950-42-0201-1. Resumen extendido.
- Uso de aceites esenciales como antimicrobianos naturales en alimentos. Serra M. A. Colegio de Ingenieros Especialistas de la Provincia de Córdoba. 5 de agosto de 2020. Taller, con modalidad virtual.
- Estudio de la sensibilidad del aceite esencial de *Aloysia polystachya* y de carvona en salchichas tipo Viena. Serra M. A., Tejero Y., Garnero J., Quiberoni A. del L., Andreatta A. E. Jornadas CyT de la UTN Facultad Regional San Francisco. 9 y 10 de octubre de 2019. Artículo breve. ISBN: 978-950-42-0193-9.
- Ensayos de sensibilidad del aceite esencial de burro y de la carvona en salchichas tipo Viena. Serra M. A., Tejero Y., Quiberoni A. del L., Andreatta A. E. X Congreso Argentino de Ingeniería Química – CAIQ 2019, 4 al 7 de agosto de 2019. Presentación oral.
- Actividad antibacteriana de aceites esenciales y R(-)carvona frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Serra M. A., Pairone M., Testa

A., Pisani M., Lubatti G. Andreatta A. E. Jornada de Jóvenes Investigadores Tecnológicos (JIT) 2018. UTN Fac. Regional Rafaela. 25y 26 de octubre 2018. Además, se presentó en Jornada de Ciencia y Tecnología UTN Facultad Regional San Francisco 30,31 de octubre, 1 de noviembre 2018. ISBN: 978-950-42-0186-1. Trabajo completo.

- Actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales en bacterias benéficas, patógenas y alterantes de alimentos. Vignola M. B., Serra M, Andreatta AE. CICyTAC 2018. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los alimentos. 1-3 octubre 2018. Córdoba. Argentina. Resumen. ISBN: 978-987-45380-9-3
- Análisis antimicrobiano de películas a base de quitosano. M.B. Vignola, M. Serra, M. Raspo, M. Pairone, A. Testa, L. Genero, L. Funes y A.E. Andreatta. IV Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos – RITeQ 2018, 29 de mayo al 1 de junio de 2018. Carlos Paz, Cba. Resumen extendido. ISBN: 978-950-33-1433-3.
- Estudio de la sensibilidad de bacterias del género *Leuconostoc* a diferentes extractos vegetales naturales. Serra M., Sanmartino M., Pairone M. Ferrero N., Boeri A., Zarate A., Pisani M., Garnero J., Andreatta A.E. CICyTAC 2016 VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 2-4 noviembre 2016. Córdoba. Argentina. Resumen
- Evaluación de extractos vegetales naturales en la inhibición de bacterias del género *Leuconostoc*. Serra M., Sanmartino M., Pairone M., Garnero S., Garnero J., Andreatta A. E. VII Jornadas de Ciencia y Tecnología para Alumnos de la Fac. Reg. Villa María. 7° CyTAL 2016. UTN Fac. Reg. Villa María. Villa María. Córdoba. Argentina. 12-14 de octubre de 2016. Trabajo completo. ISBN: 978-987-1896-61-5.

Referencias bibliográficas

- Aguilera Márquez, J., Solorio Alvarado, C., Zapata Morales, J.-, Ruiz Padilla, A., y Ramirez Morales, M. (2017). Emulsión de aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*. *Jóvenes de la Ciencia, Revista de divulgación científica*, 1, 695–699.
- Aiyegoro, O. A. (2014). Microbial Contamination of Processed Meat. En *Encyclopedia of Meat Sciences* (Vol. 2). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00249-X>
- Akgül, A., Kivanç, M., y Bayrak, A. (1989). Chemical Composition and Antimicrobial Effect of Turkish Laurel Leaf Oil. *Journal of Essential Oil*, 1(May 2015), 37–41. <https://doi.org/10.1080/10412905.1989.9697798>
- Al-jabri, N. N., y Hossain, M. A. (2014). Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2014.10.011>
- Albaladejo Meroño, Q. (1999). El aceite esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales. Universidad de Murcia - Facultad de Veterinaria.
- Alfonzo, A., Martorana, A., Guarrasi, V., Barbera, M., Gaglio, R., Santulli, A., Settanni, L., Galati, A., Moschetti, G., y Francesca, N. (2017). Effect of the lemon essential oils on the safety and sensory quality of salted sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792). *Food Control*, 73, 1265–1274. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.046>
- Allaf, T., Tomao, V., Besombes, C., y Chemat, F. (2013). Thermal and mechanical intensification of essential oil extraction from orange peel via instant autovaporization. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 72, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2013.06.005>
- Álvarez, O., Herman, C., Castro, M., Cayré, M., y Garro, O. (2014). Evaluación de la capacidad bioprotectora de *Lactobacillus sakei* en productos cárnicos cocidos.
- Andreatta, A., Longo, M. B., Utrera, C., Saavedra, M., y Foco, G. (2009). Caracterización de Aceites Esenciales del departamento San Justo (Córdoba). <https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.012>
- Ángel, J., Cuervo Mulet, R., Cárdenas, H., Antonio Durán, J., Mejía, L. F., y Rodríguez de la Pava, G. (2009). Efecto de las concentraciones salinas en la inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* en un ingenio azucarero. *Revista Científica Guillermo de Ockham*, 7(1), 13–18.
- Araújo, M. K., Gumiel, A. M., Bordin, K., Luciano, F. B., y Macedo, R. E. F. de. (2018). Combination of garlic essential oil, allyl isothiocyanate, and nisin Z as bio-preservatives in fresh sausage. *Meat Science*, 143(January), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.05.002>
- Arencibia Arrebola, D. F., Rosario Fernández, L. A., y Gámez Menéndez, R.

- (2008). Métodos generales de conservación de microorganismos. En *I Taller Científico de los Laboratorios LIORAD, VI Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos y otros Materiales Biológicos* (Finlay Edi). https://www.researchgate.net/publication/262724715_Metodos_generales_de_conservacion_de_microorganismos
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., y Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1–2), 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Assami, K., Pingret, D., Chemat, S., Meklati, B. Y., y Chemat, F. (2012). Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 62, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.09.003>
- Aymerich, T., Picouet, P. A. A., y Monfort, J. M. M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78(1–2), 114–129. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.007>
- Badia, V., de Oliveira, M. S. R., Polmann, G., Milkiewicz, T., Galvão, A. C., y da Silva Robazza, W. (2019). Effect of the addition of antimicrobial oregano (*Origanum vulgare*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on lactic acid bacteria growth in refrigerated vacuum-packed Tuscan sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00146-7>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Balestra, F., y Petracci, M. (2019). Technofunctional Ingredients for Meat Products. En *Sustainable Meat Production and Processing*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814874-7.00003-1>
- Balouiri, M., Sadiki, M., y Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bandoni, A., Baldemarra Idina, J. L., Cañigueral, S., Cerimele, E., González, N., Combariza, Y., Dellacassa, E., Flores Martines, H., Grassetti, C. M., Hasegawa, M., López, C. M., Machado, F., Martínez Sosa, M. A., Montes Guyot, M. A., Ocampo, R. A., Orozco Avila, I., Puente, A. M., Puertas, M. A., Ringuélet, J. A., Rodríguez Glez, E., Stashenko, E. E., Tillet, S., Vargas Hernández, M., Vera Virrueta, A., y Zambrana, M. E. (2003). *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica - Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores* (A. Bandoni (Ed.); Segunda Ed). CYTED Ciencia y Tecnología para el desarrollo - Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Barry-Ryan, C. (2014). Physical and chemical methods for food preservation using natural antimicrobials. En *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034->

7.00010-4

- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., y Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12), 2166–2174. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008>
- Bazet Ugalde, C., Anzalone Cantoni, L., Blanco Toloza, J., Rodríguez Cuns, G., Seija, V., Legnani Cardoso, M., y Arenas, C. (2004). Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. *Departamento de Laboratorio Clínico. Hospital de Clínicas*, 1–69.
- Beliitz, H. D., y Grosch, W. (1997). *Química de los alimentos* (Acribia (Ed.); 2° edición).
- Benzi, V., Chopra, C. S., y Ferrero, A. A. (2009). Comparación del efecto insecticida de dos especies de *Aloysia* (Verbenaceae) sobre *Rhizopertha dominica* (Insecta, Coleoptera, Bostrichidae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(2), 151–153.
- Bergey, D. H. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3: The Firmicutes. En *Springer-Verlag New York Inc.* (2° Edición). <https://doi.org/10.1007/b92997>
- Bhattacharya, S. (2016). Chapter 3: Cultivation of Essential Oils. En *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (Número 1999, pp. 19–29). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00003-1>
- Biondi, D., Cianci, P., Geraci, C., Ruberto, G., y Piattelli, M. (1993). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from sicilian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 8(6), 331–337. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730080608>
- Blaszyk, M., y Holley, R. A. (1998). Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), 175–183. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00134-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00134-7)
- Borch, E., Kant, M., y Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 103–120. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01135-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01135-X)
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Número 8). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Buelvas Salgado, G. A. (2013). *Desarrollo y validación de modelos matemáticos predictivos del crecimiento microbiano para estimación de la vida útil en jamón lonchado empacado al vacío*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín - Facultad de Ciencias Agrarias.
- Burdyn, L., Luna, C., Tarragó, J., Sansberro, P., Dudit, N., González, A., y Mroginski, L. (2006). Direct shoot regeneration from leaf and internode explants of *Aloysia polystachya* [Gris.] mold. (Verbenaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42(3), 235–239.

<https://doi.org/10.1079/IVP2006751>

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cabezas-pizarro, J., Redondo-solano, M., y Uma, C. (2017). *Antimicrobial activity of different sodium and potassium salts of carboxylic acid against some common foodborne pathogens and spoilage-associated bacteria. xx.*
- CAICHA, C. A. de la I. de C. y A. (2017). *Industria de chacinados.* <https://www.caicha.org.ar/wp-content/uploads/INDUSTRIA-DE-CHACINADOS-Y-AFINES-2017.pdf>
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., y Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., y Velázquez, O. (2009). *Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos.*
- Can Baser, K. H., y Buchbauer, G. (2010). Handbook of Essential Oils. En *CRC Press Taylor and Francis Group*. <https://doi.org/10.1201/b19393>
- Cano Ruera, S. (2006). Métodos de análisis microbiológico. En *Grupo Analiza calidad - Departamento de Formación.*
- Carr, F. J., Chill, D., y Maida, N. (2008). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Carvalho, R. J. de, Souza, G. T. de, Honório, V. G., Sousa, J. P. de, Conceição, M. L. de, Maganani, M., y Souza, E. L. de. (2015). Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology*, 52, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.003>
- Cavaliere, S. J., Rankin, I. D., Harbeck, R. J., Sautter, R. L., McCarter, Y. S., Sharp, S. E., Ortez, J. H., y Spiegel, C. A. (2006). Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. En M. B. Coyle (Ed.), *American Society for Microbiology.*
- Ceja Farias, T. K., Ávila Novoa, M. G., Gutiérrez Lomeli, M., Navarro Villarruel, C. L., y Padilla Frausto, J. J. (2018). *Parámetros biocinéticos de BAL tras la reproducción del deterioro de salchichas empacadas al vacío.*
- Celikel, N., y Kavas, G. (2008). Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms. *Czech J. Food Sci.*, 26(3), 174–181.
- Cervantes-Cardoza, V., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Rosales-Castro, M., Medina-Torres, L., y González-Laredo, R. F. (2010). Actividad antioxidante de extractos de semilla de tres variedades de manzana (*Malus domestica* Borkh -Rosaceae-). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 9(6), 446–456.

- Chivandi, E., Dangarembizi, R., Nyakudya, T. T., y Erlwanger, K. H. (2016). Use of Essential Oils as a Preservative of Meat. En *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00008-0>
- Cibik, R., Lepage, E., y Tailliez, P. (2000). Molecular Diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* Isolated from Traditional French Cheeses as Revealed by RAPD Fingerprinting, 16S rDNA Sequencing and 16S rDNA Fragment Amplification. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(2), 267–278. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80014-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80014-4)
- Cockerill, F. R., Wikler, M., Alder, J., Dudley, M., Eliopoulos, G., Ferraro, M. J., Hardy, D., Hecht, D., Hindler, J., Patel, J., Powell, M., Swenson, J., Thomson, R., Traczewski, M., Turnidge, J., Weinstein, M., y Zimmer, B. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. En *Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS* (Vol. 32, Número 2). <https://doi.org/10.4103/0976-237X.91790>
- Cockerill, F. R., Wikler, M., Alder, J., Dudley, M., Eliopoulos, G., Ferraro, M. J., Hardy, D., Hecht, D., Hindler, J., Patel, J., Swenson, J., Thomson, R., Traczewski, M., Weinstein, M., y Zimmer, B. (2012). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; approved atandard. En *Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS* (Vol. 32, Número 1). <https://doi.org/M02-A11>
- Cuervo Mulet, R., Ledesma, J. A., Duran Vanegas, J. A., y Argote Vega, F. E. (2010). *Aislamiento y control microbiológico de Leuconostoc mesenteroides, en un ingenio para optimizar el rendimiento de azúcar y etanol*.
- Cuspinera, J. (1951). Aceite Esencial de Limón. En *Revista de Comercio Exterior* (Vol. 6).
- Davidson, P. M., Cekmer, H. B., Monu, E. A., y Techathuvanan, C. (2014). The use of natural antimicrobials in food: An overview. En *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (Número 3). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034-7.00001-3>
- De Paula, A. T., Jeronymo-Ceneviva, A. B., Silva, L. F., Todorov, S. D., Gombossy de Melo Franco, B. D., Choiset, Y., Haertlé, T., Chobert, J. M., Dousset, X., y Barretto Penna, A. L. (2014). *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A Bacteriocinogenic Strain Isolated from Brazilian Water Buffalo Mozzarella Cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(3–4), 186–197. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9163-5>
- Di Leo Lira, P., Retta, D., Tkacik, E., Ringuélet, J., Coussio, J. D., van Baren, C., y Bandoni, A. L. (2009). Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. *Industrial Crops and Products*, 30(2), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.04.005>
- Diez, A. M., Jaime, I., y Rovira, J. (2009). The influence of different preservation methods on spoilage bacteria populations inoculated in morcilla de Burgos during anaerobic cold storage. *International journal of food microbiology*, 132(2–3), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.019>

- Dima, C., y Dima, S. (2015). Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.003>
- Dussault, D., Vu, K. D., y Lacroix, M. (2014). In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Science*, 96(1), 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.015>
- Dwivedy, A. K., Kumar, M., Upadhyay, N., Prakash, B., y Dubey, N. K. (2016). Plant essential oils against food borne fungi and mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, 11, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.08.010>
- Dykes, G. A., Eugene Cloete, T., y von Holy, A. (1991). Quantification of microbial populations associated with the manufacture of vacuum-packaged, smoked Vienna sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 13(4), 239–248. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90081-Y](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90081-Y)
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, E., Blöcker, H., Emde, M., y Böttger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes - Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Erlangen Nuernberg University*, 17(19), i–i. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1405>
- Elechosa, M. A. (2009). Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina. En *INTA*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- FAO, F. and A. A., y PRODAR, P. C. de D. A. R. (2014). Fichas técnicas - Procesados de carnes. En *IICA, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura* (Número 1). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Fennema, O., Samodaran, S., y Parkin, K. (2010). *Química de los alimentos* (Acribia (Ed.); 3° edición).
- Fernández-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pérez-Alvarez, J. A., y Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69(3), 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.004>
- Figmay. (2017). *Manual de usuario - Extractor de aceites esenciales por arrastre de vapor - Escala laboratorio* (Número 54).
- Fisher, K., y Phillips, C. A. (2006). *The effect of lemon , orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni , Escherichia coli O157 , Listeria monocytogenes , Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems*. 101, 1232–1240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03035.x>
- Freire Fierro, A. (2004). *Botánica Sistemática Ecuatoriana*. https://www.researchgate.net/publication/290435567_Botanica_Sistemica_a_Ecuatoriana

- García Martínez, E., Fernández Segovia, I., y Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. En *Etsiamn*. <http://hdl.handle.net/10251/52056>
- García Mora, A. C., Ordoñez Ochoa, I. K., y Mármol Pérez, Z. (2015). Determinación del contenido de polifenoles totales y vitamina C presentes en el melón (*Cucumis melo* L.). *Revista Estudiantil URU*, 2.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., y Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 76(1), 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.026>
- Gill, A. O., y Holley, R. a. (2000). Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research International*, 33(2), 83–90. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00152-0)
- Gleiser, R. M., Bonino, M. A., y Zygodlo, J. A. (2011). Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 108(1), 69–78. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2042-4>
- Gómez Carrion, D. (2020). *Jardín Botánico*. <https://jardinbotanicoffybb.jimdofree.com/clasificación-por-familia/rutaceae/>
- Gonzalez, Y., Arrua, R. D. De, Rojas, G. D. De, y García, M. G. De. (2014). Etnofarmacobotánicafoliar de “burrito”, *Aloysia polystachya* (Griseb .) Moldenke (Verbenaceae), cultivado en Paraguay. *Rojasiana*, 13(1), 31–41.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., y Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985–990. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>
- Hellión-Ibarrola, M. C., Ibarrola, D. A., Montalbetti, Y., Kennedy, M. L., Heinichen, O., Campuzano, M., Ferro, E. A., Alvarenga, N., Tortoriello, J., De Lima, T. C. M., y Mora, S. (2008). The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. *Phytomedicine*, 15(6–7), 478–483. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.11.018>
- Herrera, J. M., Zunino, M. P., Massuh, Y., Pizzollito, R. P., Dambolena, J. S., Gañan, N. A., y Zygodlo, J. A. (2014). Fumigant toxicity from five essential oils rich in ketones against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). *Agriscientia*, 31(1), 35–41.
- Hultman, J., Rahkila, R., Ali, J., Rousu, J., y Björkroth, K. J. (2015). Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged cooked sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7088–7097. <https://doi.org/10.1128/AEM.02228-15>
- International Organization for Standardization. (2021). *ISO 9235:2021 Aromatic natural raw materials — Vocabulary*. <https://www.iso.org/obp/ui/es/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:en:sec:3.11>

- INTI. (2010). Programa Pruebas de desempeño de productos Salchichas tipo Viena. *Ministerio de Industria Secretaria de Industria y Comercio*.
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Ivanova, V., Dörnyei, Á., Márk, L., Vojnoski, B., Stafilov, T., Stefova, M., y Kilár, F. (2011). Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions. *Food Chemistry*, 124(1), 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.039>
- Khorsandi, A., Ziaee, E., Shad, E., Razmjooei, M., Eskandari, M. H., y Aminlari, M. (2018). Antibacterial effect of essential oils against spoilage bacteria from vacuum-Packed cooked cured sausages. *Journal of Food Protection*, 81(8), 1386–1393. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-474>
- Kivanç, M., Akgül, A., y Doğan, A. (1991). Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Food Microbiology*, 13(1), 81–85. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90140-K](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90140-K)
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., y Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Korkeala, H., Alanko, T., Mäkelä, P., y Lindroth, S. (1989). Shelf-life of vacuum-packed cooked ring sausages at different chill temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 9(3), 237–247. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90093-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90093-7)
- Korkeala, H., y Björkrot, J. (1997). Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. *Journal of Food Protection*, 60(6), 724–731.
- Korkeala, H., Suortti, T., y Mäkelä, P. (1988). Ropy slime formation in vacuum-packed cooked meat products caused by homofermentative lactobacilli and a *Leuconostoc* species. *International Journal of Food Microbiology*, 7(4), 339–347. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90060-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90060-8)
- Laboratorio Britania S.A. (2016). *M.R.S. Caldo*.
- Lang, G., y Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 13–39. <https://doi.org/10.1002/ffj.2082>
- Lara-Lledó, M., Olaimat, A., y Holley, R. A. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on bologna sausages by an antimicrobial film containing mustard extract or sinigrin. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.018>
- Lonvaud-Funel, A. (2014). *Leuconostocaceae* Family. En *Encyclopedia of Food*

Microbiology (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00185-3>

- López-Jácome, L., Hernández, M., Colín-Castro, A., Ortega, S., Cerón, G., y Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidades*, 3(1), 10–18. <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdisc/ir-2014/ir141b.pdf>
- Lopez, A. G., Salvucci, E., & R., C. (Eds.). (2014). *Investigaciones y avances en Microbiología de los alimentos: trabajos completos del V CICYTAC 2014* (Ministerio).
- Lozano Rodriguez, A. G., Arvizu Medrano, S., Padilla Frausto, J. J., Pérez, A. G., y Ibarra Vallejo, J. L. (1992). *Evaluación del desarrollo microbiano y comportamiento a diferentes condiciones de Leuconostoc mesenteroides* (Número 1).
- Lozano Rodríguez, A. G., Arvizu Medrano, S., Padilla Frausto, J. J., Pérez, A. G., y Ibarra Vallejo, J. L. (1992). Evaluación del desarrollo microbiano y comportamiento a diferentes condiciones de *Leuconostoc carnosum*. *Universidad Autónoma de Queretaro*, 1, 1–4.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., y Nobile, M. A. Del. (2012). *Food applications of natural antimicrobial compounds*. 3(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00287>
- Lulietto, M. F., Sechi, P., Borgogni, E., y Cenci-goga, B. T. (2015). Meat Spoilage : A Critical Review of a Neglected Alteration Due to Ropy Slime Producing Bacteria. *Italian Journal of Animal Science*, 14. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.4011>
- Mabrouk, S., Salem, N. A. Ben, Rouis, Z., Elaissi, A., Chemli, R., Farhat, F., Khouja, M. L., Harzallah-Skhiri, F., Aouni, M., Salah, K. B. H., y ben Salem, Y. (2012). Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 15. *BMC Complementary and Alternative Medicine*
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (2004). *Brock Biología de los microorganismos* (10a ed.). Pearson Educación.
- Mani-lópez, E., Palou, E., y López-Malo, A. (2018). Biopreservatives as Agents to Prevent Food Spoilage. En *Microbial Contamination and Food Degradation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2/00008-1>
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., y Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402–414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Mariod, A. A. (2016). Effect of essential oils on organoleptic (smell, taste, and texture) properties of food. En *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00013-4>

- Marques, A., Teixeira, B., y Nunes, M. L. (2015). Bay laurel (*Laurus nobilis*) oils. En *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00026-2>
- Martín Gordo, D. A. (2018). Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., y Drosinos, E. H. (2003). Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64, 265–271. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020291.01957.a2>
- Mello da Silveira, S., Bittencourt, F., Fronza, N., Cunha, A., Neud, G., Rosana, C., y Vieira, W. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. *LWT Food Science and Technology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.032>
- Mello Da Silveira, S., Cunha Júnior, A., Neudi Scheuermann, G., Luiz Secchi, F., y Werneck Vieira, C. R. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Ciencia Rural*, 42(7), 1300–1306.
- Michelena, G., Almeida, G., Altuna, B., Eng, F., Legrá, S., Oliveros, M., y Armenteros, S. (2005). Efecto inhibitor del ácido jasmónico sobre el crecimiento de bacterias y hongos. *Redalyc*, XXXIX(0138–6204), 6.
- Militello, M., Settanni, L., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G., Giammanco, G. M., Blázquez, M. A., Carrubba, A., Bla, M. A., Blázquez, M. A., y Carrubba, A. (2011). *Chemical Composition and Antibacterial Potential of Artemisia arborescens L. Essential Oil*. 62(4), 1274–1281. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9855-3>
- Millet, Y., Jouglard, J., y Steinmetz, M. D. (1981). Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. *Veterinary and Human Toxicology*, 24(Suppl.), 149.
- Montoya, G. (2010). Una Alternativa de Diversificación para el Eje Cafetero. *Universidad Nacional de Colombia*, 1, 12–174. <http://bdigital.unal.edu.co/50956/7/9588280264.pdf>
- Moosavi-Nasab, M., Saharkhiz, M. J., Ziaee, E., Moayedi, F., Koshani, R., y Azizi, R. (2016). Chemical compositions and antibacterial activities of five selected aromatic plants essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria. *Journal of Essential Oil Research*, 28(3), 241–251. <https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1119762>
- Mora, S., Díaz-Véliz, G., Millán, R., Lungenstrass, H., Quirós, S., Coto-Morales, T., y Hellión-Ibarrola, M. C. (2005). Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 82(2), 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.09.007>

- Morcía, C., Tumino, G., Ghizzoni, R., y Terzi, V. (2015). Carvone (*Mentha spicata* L.) oils. En *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00035-3>
- Moreira, M. R., Alvarez, M. V., y Ponce, A. G. (2016). Chapter 7 - Essential Oils. En *Postharvest Management Approaches for Maintaining Quality of Fresh Produce* (pp. 113–124). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23582-0_7
- Morrison, R., y Boyd, R. (1990). *Química Orgánica* (Quinta Edición). Addison-Wesley Iberoamericana.
- Mourad, K., Nour-Eddine, K., y Halima, Z.-K. (2004). Isolation of lactic acid bacteria for its possible use in the fermentation of green algerian olives. *Grasas y Aceites*, 55(4), 385–393. <https://doi.org/10.3989/gya.2004.v55.i4.205>
- National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. (2016). 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA.
- Nehir El, S., Karagozlu, N., Karakaya, S., y Sahin, S. (2014). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Extracted from *Laurus nobilis* L. Leaves by Using Solvent-Free Microwave and Hydrodistillation. *Food and Nutrition Sciences*, 05(02), 97–106. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.52013>
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., y Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat science*, 78(1–2), 77–89. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020>
- OBRA. (2017). Informe sector Porcino. En *Observatorio Rural Argentino*.
- Obsingrer, O. (2012). Disposición 6365-2012. En *Ministerio de Salud de la Nación, Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos ANMAT* (pp. 1–48).
- Ordoñez, E. S., Leon-Arevalo, A., Rivera-Rojas, H., y Vargas, E. (2019). Quantification of total polyphenols and antioxidant capacity in skins and seeds from cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), grape (*Vitis Vinífera*) and uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 175–183. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.02>
- Oseni, O. A., y Okoye, V. I. (2013). Studies of Phytochemical and Antioxidant properties of the Fruit of Watermelon (*Citrullus lanatus*). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 27(14), 508–514. <https://doi.org/10.1201/9780429324253-1>
- Padilla-Frausto, J. J., Cepeda-Marquez, L. G., Salgado, L. M., Iturriaga, M. H., y Arvizu-Medrano, S. M. (2015). Detection and Genotyping of *Leuconostoc* spp. in a Sausage Processing Plant. *Journal of Food Protection*, 78(12), 2170–2176. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-192>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 5.
- Pérez Zamora, C. M., Torres, C. A., Aguado, M. I., Bela, A. J., Nuñez, M. B., y Bregni, C. (2016). Antibacterial activity of essential oils of *Aloysia*

- polystachya and Lippia turbinata (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 15(4), 199–205.
- Peter, K. V., Shylaja, M. R., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E., y Skandamis, P. N. (2004). *Handbook of herbs and spices* (K. V. Peter (Ed.)). Woodhead Publishing Limited.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A., y Chemat, F. (2013). *Natural product extraction: principles and applications - Chapter 3 Ultrasound-assited Extraction* (M. Rostagno & J. Prado (Eds.)). Royal Society of Chemistry - Green Chemistry Series.
- Pírez, M. C., y Mota, M. I. (2008). Morfología y estructura bacteriana. En F. de M. I. de H. O. del libro- FEFMUR (Ed.), *Temas de bacteriología y virología médica* (3a ed., pp. 48–60).
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K., y Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922–935. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
- Radha Krishnan, K., Babuskin, S., Azhagu Saravana Babu, P., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G., Sivarajan, M., y Sukumar, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.011>
- Regubalan, B., y Ananthanarayan, L. (2018). Shelf life improvement of idli batter by addition of mustard essential oil as bio-preservative. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3417–3426. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3247-2>
- Ríos, J.-L. (2016). Essential Oils : What They Are and How the Terms Are Used and Defined. En *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 1–10). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8>
- Rivas, F. P., Castro, M. P., y Campos, C. A. (2014). *Funcionalidad de la bacteriocina sakacina Q-aplicada mediante inmersión- sobre salchichas tipo Viena*.
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Third ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Samelis, J., y Georgiadou, K. G. (2000). The microbial association of Greek taverna sausage stored at 4 and 10 degrees C in air, vacuum or 100% carbon dioxide, and its spoilage potential. *Journal of applied microbiology*, 88(1), 58–68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00936.x>
- Sariego, S., Marin, J. E., Ochoa, A., y Viera, Y. (2013). *Petiveria alliacea L. : distintas condiciones experimentales en la elaboración de extractos con actividad antimicrobiana*. 274–287.
- Sathya, J., y Shoba, F. G. (2014). A study on the phytochemistry and antioxidant effect of methanolic extract of Citrullus lanatus seed. *Pelagia Research Library Asian Journal of Plant Science and Research*, 4(5), 35–40.

- Saurabh, K., Heintz, E., Sijtsma, G., y Schuddemat, J. (2017). *US2017295829A1 Preservation of meat products*.
- Schirmer, B. C., y Langsrud, S. (2010). Evaluation of Natural Antimicrobials on Typical Meat Spoilage Bacteria In Vitro and in Vacuum-Packed Pork Meat. *Journal of Food Microbiology and Safety*, 75(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01485.x>
- Selim, S. (2011). Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Vancomycin-Resistant Enterococci (Vre) and Escherichia Coli O157:H7 in Feta Soft Cheese and Minced Beef Meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 187–196. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100023>
- Serra, M., Garnero, J., Nicolau, V., y Andreatta, A. E. (2018). Assessment of natural vegetal extracts in the inhibition of *Leuconostoc mesenteroides* MS1. *Agriscientia*, 35, 51–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.31047/1668.298x.v1.n35.20454>
- Settanni, L., Palazzolo, E., Guarrasi, V., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G., y Germanà, M. A. (2012). *Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily*. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.050>
- Settanni, L., Randazzo, W., Palazzolo, E., Moschetti, M., Aleo, A., Guarrasi, V., Mammina, C., San Biagio, P. L., Marra, F. P., Moschetti, G., y Germanà, M. A. (2014). *Seasonal variations of antimicrobial activity and chemical composition of essential oils extracted from three Citrus limon L. Burm. cultivars*. 28(6), 383–391. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.871544>
- Shelef, L. A. (1983). Antimicrobial effects of spices. *Physical Review*, 51(3), 182–186. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.51.182>
- Si Said, Z. B., Haddadi-guemghar, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Rigou, P., Remini, H., Adjaoud, A., Khaled, N., Bey-Ould Si Said, Z., Haddadi-guemghar, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Rigou, P., Remini, H., Adjaoud, A., Khoudja, N. K., y Madani, K. (2016). Essential oils composition , antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of Eucalyptus globulus fruits. *Industrial Crops & Products*, 89, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.018>
- Silva, S., Abe, S., Murakami, F., Frensch, G., Marques, F. A., y Nakashima, T. (2011). Essential oils from different plant parts of Eucalyptus cinerea F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a source of 1,8-Cineole and their bioactivities. *Pharmaceuticals*, 4(12), 1535–1550. <https://doi.org/10.3390/ph4121535>
- Siripatrawan, U., y Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.011>
- Šojić, B., Tomović, V., Kocić-Tanackov, S., Škaljac, S., Ikonić, P., Džinić, N., Živković, N., Jakanović, M., Tasić, T., y Kravić, S. (2015). Effect of nutmeg

- (*Myristica fragrans*) essential oil on the oxidative and microbial stability of cooked sausage during refrigerated storage. *Food Control*, 54, 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.007>
- Sonwa, M. M. (2000). Isolation and structure elucidation of essential oil constituents . Comparative Study of the Oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus*, and *Cyperus rotundus*. *Dissertation for the Fulfillment of the Requirements for the degree of Dr. rer. nat.*
- Sperber, W., Ledenbach, L., Marshall, R., Cervený, J., Meyer, J., Hall, P., Gram, L., Shebuski, J., Freier, T., Barth, M., Hankinson, T., Zhuang, H., Breidt, F., Evancho, G., Tortorelli, S., Scott, V., Cook, F., Johnson, B., Lawlor, K., Schuman, J., Simpson, P., y Taormina, P. (2009). *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (W. H. Sperber & M. P. Doyle (Eds.)). Springer.
- Stratakos, A. C., y Koidis, A. (2016). Methods for Extracting Essential Oils. En *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>
- Swiss Just.* (2016). <https://www.justargentina.com/>
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., y Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
- Targino de Souza Pedrosa, G., Julliane de Carvalho, R., Berdejo, D., Leite de Souza, E., Pagán, R., y Magnani, M. (2019). Control of Autochthonous Spoilage Lactic Acid Bacteria in Apple and Orange Juices by Sensorially Accepted Doses of Citrus Spp. Essential Oils Combined with Mild Heat Treatments. *Journal of Food Science*, 84(4), 848–858. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14474>
- Tassou, C. C., Chorianopoulos, N. G., Skandamis, P. N., y Nychas, G. J. E. (2012). Herbs, spices and their active components as natural antimicrobials in foods. En *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition* (Vol. 2, pp. 17–50). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1533/9780857095688.17>
- Tolozá, A. C., Zygadlo, J., Mougabure Cueto, G., Biurrun, F., Zerba, E., y Picollo, M. I. (2006). Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *Journal of Medical Entomology*, 43(5), 889–895. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)43\[889:FARPOE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[889:FARPOE]2.0.CO;2)
- Tongnuanchan, P., y Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), 1231–1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R. K., y Kumar, A. (2015). Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(10), 1320–1323. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.692127>
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I., Rajtak, U., y Debevere, J.

- (2006). The sensory acceptability of cooked meat products treated with a protective culture depends on glucose content and buffering capacity: A case study with *Lactobacillus sakei* 10A. *Meat Science*, 74(3), 532–545. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.05.003>
- von Holy, A., Cloete, T. E., y Holzapfel, W. H. (1990). Quantification and characterization of microbial populations associated with spoiled, vacuum-packed Vienna sausages. *Food Microbiology*, 8(2), 95–104. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(91\)90002-J](https://doi.org/10.1016/0740-0020(91)90002-J)
- Werdirn González, J. O., Gutiérrez, M. M., Murray, A. P., Ferrero, A., y Nezara, P. (2010). *Biological Activity of Essential Oils from Aloysia polystachya*.
- Yost, K. G., y Vandemark, P. J. (1978). Growth inhibition of *Streptococcus mutans* and *Leuconostoc mesenteroides* by sodium fluoride and ionic tin. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(5), 920–924. <https://doi.org/10.1128/aem.35.5.920-924.1978>
- Zarate Sarapura, E. (2007). Efecto de la concentración de cloruro de sodio y del pH sobre el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* en embutidos cocidos envasados al vacío usando modelos matemáticos. *Ciencia y Tecnología N° 9 - Universidad Nacional del Callao*, 87–96.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., y Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zuloaga, F. O., Belgrano, M. J., y Anton, A. M. (2018). *Flora Argentina y del Cono Sur*. <http://buscador.floraargentina.edu.ar/families/details/Lamiaceae>