

T.539



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICO-QUIMICAS Y NATURALES**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA**  
**ORIENTACION MICROBIOLOGIA GENERAL**  
**ORIENTACION MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CONSERVACIÓN DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS A  
TRAVÉS DEL USO DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS  
DE PLANTAS AROMÁTICAS**

**Tesis de MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Microbióloga Daniela M. Lombardo**

**2008**

Trabajo de Tesis para optar al título de **MASTER EN BIOTECNOLOGIA**, bajo la dirección de la Dra. Mirta Demo, y la co-dirección de la Dra. Cecilia Frigerio. Realizado en la Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología General y Orientación Microbiología de Alimentos.

Tesista

Microbióloga Daniela M. Lombardo


LOMBARDO, D. M.  
Conservación de Prod

Directora

Dra. Mirta Demo

2008

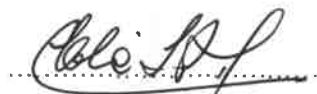
65869



.....  
.....

Co-Directora

Dra. Cecilia Frigerio



.....

Miembros del Jurado

Dr. Julio Zygodlo




.....  
AZGARD

Dr. Rubén N. Grosso

.....

MSc. Jorge Daghero



.....  
J. DAGHERO



*Dedicado  
a mis dos amores  
Carlos y Giuliana*

65869

MFN:
Clasif:
T-539

---

## AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por bendecirme con su fuerza en cada momento que lo necesité iluminando mi mente y mi corazón, y por poner en mi camino a personas que fueron y son mi soporte en la vida .....
- A Carlos, mi compañero de vida, mi bastón y pilar, por llegar a mi vida y transformarla por completo, compartir en estos 14 años juntos idas y venidas, darme su amor incondicional y lo más importante, darme la oportunidad de cumplir uno de mis sueños ..... ser mamá .....
- A mi solcito hermoso, Giuliana, que llegó hace casi cuatro años llenándome con su luz y que permanentemente me enseña a vivir la vida .....
- A mis padres, Susana y Juan José (que me sigue acompañado con su gran espíritu), gracias por darme la vida y enseñarme valores para ser una mejor persona día a día..... soy lo que soy gracias a ustedes .....
- A mis hermanos, Ana y Darío, por todo el aguante en las buenas y en las malas, a mi cuñado Pablo y a mi sobrino Benjamín ..... los quiero!!!!!! .....
- A la Universidad Nacional de Río Cuarto y sus dependencias, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales y Departamento de Microbiología e Inmunología, por educarme desde hace 16 años y darme la posibilidad de desarrollarme como profesional .....
- A mi directora de tesis, Mirta, por depositar en mí su confianza para la realización de este trabajo, por su apoyo, cariño y paciencia, y por darme la posibilidad de seguir creciendo como profesional y como persona.....
- A mi co-directora, Cecilia, por su apoyo incondicional en este trabajo y a quien debo también mi formación profesional y personal .....
- A la Orientación Microbiología de Alimentos, por formarme en una de las áreas más importantes y desafiantes de la microbiología, Susana y Cecilia, por transmitirme sus conocimientos y experiencias en el campo de nuestra profesión y por la calidez humana, una de las virtudes más importantes que puede tener el ser humano; y a mis compañeros de trabajo, algunos de los cuales ya no trabajan en este laboratorio, Sebastián, Elyzabeth, Graciela, Jorgelina, Cristian, Alfonsina, Paola, Ivana, Balbina, Laurita por todo el cariño y por compartir todos los días nuestras vivencias personales, aportando a mi crecimiento como persona.....



- 
- A la Orientación Microbiología General, por permitirme la utilización de su lugar físico y a su gente, Flavio, Mechi, Nicolás, Eugenia, Mariana y Juliana por compartir experiencias que me ayudaron en la realización de este trabajo y tan gratos momentos .....
  - Al Dr. Julio Zygado, Dr. Nelson Grosso y al MSc. Jorge Daghero por aceptar ser el jurado y por sus aportes a este trabajo de investigación .....
  - Al MSc. Jorge Daghero, por cederme parte del material de trabajo de esta tesis, sin el cual me hubiese sido imposible iniciar mis experiencias .....
  - A la familia Marchesi, por colaborar cediendo sus productos y mostrando abiertamente sus condiciones de procesamiento lo cual fue de suma utilidad en este trabajo .....
  - Al personal no docente del Departamento de Microbiología en Inmunología, Lilia, Miguel, Laura, Iris y Doña Clementina, por el apoyo con el lavado de material de laboratorio y trámites administrativos .....
  - A Andrea, por bancarme en todos los momentos de mi vida, desde hace más de 20 años .....
  - A todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis de maestría, desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme dado la fuerza, el apoyo, el ánimo y sobre todo el cariño y la amistad .....

## RESUMEN

Las plantas medicinales y aromáticas tienen la capacidad de sintetizar compuestos aromáticos tales como aceites esenciales, los cuales constituyen una mezcla compleja de metabolitos secundarios altamente enriquecidos en compuestos orgánicos volátiles llamados terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos). Los monoterpenos son los responsables químicos de la fragancia y las propiedades biológicas de las plantas. Actualmente ha resurgido el interés científico en el estudio de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales debido a que se ha incrementado la preocupación en el consumo de alimentos más naturales, sustituyendo conservantes químicos por sustancias oleosas como conservantes para controlar el crecimiento de patógenos de origen alimentario (bacterias, hongos filamentosos toxicogénicos) o retrasando el proceso de deterioro iniciado por contaminantes microbianos. El uso de aceites esenciales de especias como orégano, romero, salvia y tomillo, abundantes en nuestras serranías cordobesas y cultivadas para su uso comercial en nuestra provincia, podrían ser adicionados a diferentes alimentos con el propósito de preservar su vida útil y ser consumidos con sus características organolépticas e higiénicas adecuadas. Una alternativa para la conservación de alimentos derivados de la soja es la incorporación de conservantes naturales. En este trabajo de investigación se planteó la siguiente hipótesis: el agregado de aceites esenciales a productos alimenticios derivados de la soja tales como milanesas de soja, prolonga su vida útil disminuyendo el desarrollo de microorganismos patógenos y/o de alteración. Para demostrar esta hipótesis se obtuvieron aceites esenciales a partir de las plantas aromáticas de orégano, romero, salvia y tomillo y se determinó la composición química de cada uno de ellos. Se aislaron cepas patógenas de diferentes alimentos (*Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Se determinó la actividad antimicrobiana de estos aceites esenciales sobre las cepas aisladas. Se elaboró un alimento derivado de soja, al cual se lo analizó microbiológicamente con y sin agregado de aceites esenciales para determinar los cambios producidos en el mismo durante su almacenaje. Los resultados obtenidos permitieron establecer las siguientes conclusiones.

Todas las especies bacterianas, con excepción de *P. aeruginosa*, fueron inhibidas por las muestras oleosas de orégano, romero y tomillo.

El aceite esencial de tomillo exhibió la mejor actividad antimicrobiana frente a las cepas ensayadas y presentó actividad bactericida sobre *Salmonella* sp. y *E. coli*, mientras que el aceite esencial de orégano presentó una buena actividad antimicrobiana, destacándose actividad bactericida sobre *S. aureus* y *Salmonella* sp.

La carga microbiana inicial de las milanesas de soja analizadas fue moderada en los ensayos realizados y no se observó desarrollo de microorganismos patógenos en ninguna de las muestras analizadas.

Los aceites esenciales de orégano y tomillo agregados a productos alimenticios derivados de soja mostraron inhibición del desarrollo de la flora microbiana existente en el alimento, particularmente de hongos, levaduras y coliformes totales.

Por lo tanto se sugiere: a) utilizar un método de envasado que permita mantener el aceite esencial a las concentraciones deseadas en el producto alimenticio por un periodo de tiempo prolongado; b) realizar experiencias con el alimento derivado de soja esterilizado y agregar en él un inóculo microbiano de concentración conocida y establecer las variaciones de la misma, evaluando distintos tiempos, temperaturas de conservación y concentraciones de aceites esenciales de orégano y tomillo; c) incorporar combinaciones de aceites esenciales con conservantes tradicionales para potenciar los efectos antimicrobianos y d) analizar la actividad antioxidante de aceites esenciales a fin de prolongar la vida útil del alimento.

## ABSTRACT

Medicinal and aromatic plants are able to synthesize aromatic compounds such as essential oils. They are constituted by a complex mixture of secondary metabolites rich in volatile organic compounds called terpenes (monoterpenes and sesquiterpenes). The monoterpenes are responsible for the fragrance and the biological properties of the plants. The scientific interest in the study of the antimicrobial activity of the essential oils has increased, because it has increased the interest in the consumption of natural foods, replacing chemical preservatives with these oily substances which are able to avoid the growth of pathogenic microorganisms of food origin (bacteria, toxicogenic filamentous fungi) or delaying the process of deterioration initiated by pollutants microbials. An alternative for the conservation of foods derived from soya is the incorporation of natural preservatives. Spices like oregano, rosemary, sage and thyme are abundant in the region of Córdoba and cultivated for their commercial use. Their essential oils should be added to different foods in order to improve the organoleptic characteristics and to extend the useful life of them. The hypothesis of this research work was: the aggregation of essential oils to foodstuff derived from soya such as soya hamburgers extends the useful life and diminishes the development of pathogenic microorganisms. To demonstrate these hypothesis essential oils from aromatic plants of oregano, rosemary, sage and thyme were obtained and the chemical composition of each of them was analyzed. Microorganisms from different foods were isolated (*Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*) and the antimicrobial activity of the essential oils was tested on the isolated strains. It was prepared a soya derived food with and without the addition of essential oils and it was microbiologically analyzed to determine the changes produced in the same one during the storage. The results obtained allowed to establish the following conclusions.

All the bacterial species, except *P. aeruginosa*, were inhibited by the oily samples of oregano, rosemary and thyme.

The thyme essential oil exhibited the best antimicrobial activity against the tested strains, and presented bactericidal activity on *Salmonella* sp. and *E. coli*, while the oregano essential oil presented a good antimicrobial activity, with bactericidal activity on *S. aureus* and *Salmonella* sp.

The initial microbial load of the analyzed soya hamburgers was moderated and it was not observed the growth of pathogenic microorganisms in any sample.

The essential oils of oregano and thyme added to foodstuff derived from soya inhibited the development of the microbial flora present in the food, particularly of fungi, yeasts and total coliforms.

It is suggested: a) to use a method of packaging that allows to get and maintain the active concentration of the essential oil in the foodstuff for long period of time; b) to sterilize the food derived from soya and add a microbial inoculum of well-known concentration in order to establish possible changes in the food, evaluating different times, temperatures of conservation and essential oils concentrations of oregano and thyme; c) to make combinations of essential oils and traditional preservatives to promote the antimicrobial effects and d) to analyze the antioxidant activity of essential oils in order to extend the useful life of the food.



---

# **INDICE**

---

---

## INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>1. Plantas aromáticas y aceites esenciales</b> .....	1
1.1 Las plantas aromáticas .....	1
1.2 Especies y Hierbas: conceptos básicos .....	1
<b>2. Aceites esenciales</b> .....	2
<b>3. Caracterización de los aceites esenciales</b> .....	3
<b>4. Historia de los aceites esenciales</b> .....	4
<b>5. Los aceites esenciales y la actualidad</b> .....	4
<b>6. Propiedades de los aceites esenciales</b> .....	7
<b>7. Modo de acción antibacteriana</b> .....	8
7.1 Carvacrol y timol .....	10
7.2 Susceptibilidad de organismos Gram-negativo y Gram-positivo.....	12
<b>8. Métodos utilizados para estimar/determinar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales</b> .....	13
8.1 Estudios “in vitro” .....	13
8.2 Estudios “in situ”.....	13
<b>9. Actividad antioxidante de los aceites esenciales</b> .....	17
<b>10. Tecnologías de conservación de productos alimenticios</b> .....	18
<b>11. Sinergismo entre aceites esenciales, sus componentes y otros agentes</b> .....	19
11.1 Sinergismo y antagonismo entre componentes de aceites esenciales y conservantes alimenticios.....	20
<b>12. Plantas aromáticas utilizadas en la industria alimentaria y sus derivados</b> .....	20
12.1 Producción de especies aromáticas en la provincia de Córdoba y el mundo.....	20
12.2 Orégano.....	22
12.3 Romero.....	23
12.4 Salvia.....	24
12.5 Tomillo .....	25
<b>13. Soja y sus productos derivados</b> .....	26
13.1 Generalidades.....	27
13.2 Valor nutricional de la soja .....	27
<b>II. HIPOTESIS</b> .....	29
<b>III. OBJETIVO GENERAL</b> .....	29
<b>1. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	29

<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>1. Soluciones, Medios de Cultivo y Reactivos</b> .....	<b>30</b>
<b>2. Material vegetal</b> .....	<b>38</b>
2.1 Recolección del material vegetal.....	38
2.2 Obtención de aceites esenciales.....	38
2.3 Composición química de los aceites esenciales .....	39
<b>3. Cepas Microbianas</b> .....	<b>39</b>
3.1 Aislamiento e identificación de cepas microbianas .....	39
3.2 Conservación y propagación de cepas asiladas .....	40
3.3 Preparación del inóculo microbiano.....	40
<b>4. Ensayos de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales</b> .....	<b>40</b>
4.1 Determinación de actividad antibacteriana de los aceites esenciales por técnica de Difusión en Disco .....	40
4.2 Análisis de la concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales por técnica de Microdilución en Caldo.....	40
4.3 Determinación de la concentración bactericida mínima de los aceites esenciales .....	41
<b>5. Determinación de asociaciones entre aceites esenciales</b> .....	<b>42</b>
<b>6. Elaboración del producto alimenticio</b> .....	<b>43</b>
<b>7. Análisis microbiológico del producto alimenticio</b> .....	<b>43</b>
7.1 Condiciones de almacenamiento del producto alimenticio .....	45
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	<b>46</b>
<b>1. Material vegetal</b> .....	<b>46</b>
1.1 Recolección del material vegetal.....	46
1.2 Obtención de aceites esenciales por hidrodestilación .....	46
1.3 Determinación de la composición química de los aceites esenciales .....	47
<b>2. Cepas microbianas</b> .....	<b>49</b>
2.1 Aislamiento e identificación de cepas microbianas.....	49
<b>3. Ensayos de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales</b> .....	<b>50</b>
3.1 Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales por técnica de difusión en disco .....	50
3.2 Análisis de la concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales por técnica de Microdilución en Caldo.....	52
3.3 Determinación de la concentración bactericida mínima de los aceites esenciales .....	56
<b>4. Determinación de asociaciones entre aceites esenciales</b> .....	<b>57</b>
<b>5. Análisis microbiológico del producto alimenticio almacenado</b> .....	<b>59</b>
5.1 Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de orégano – Ensayo N° 1 .....	59

---

5.2 Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de orégano – Ensayo N° 2.....	61
5.3 Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales entre ensayos 1 y 2 con aceite esencial de orégano .....	62
5.3.1 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a 25 °C .....	62
5.3.2 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a 4 °C .....	63
5.3.3 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a -20 °C .....	64
5.4 Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras entre ensayos 1 y 2 con aceite esencial de orégano .....	66
5.4.1 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a 25 °C .....	66
5.4.2 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a 4 °C .....	67
5.4.3 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a -20 °C .....	68
5.5 Análisis comparativo de recuento de coliformes totales entre ensayos 1 y 2 con aceite esencial de orégano.....	69
5.5.1 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a 25 °C .....	69
5.5.2 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a 4 °C .....	70
5.5.3 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a -20 °C .....	71
5.6 Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de tomillo – Ensayo N° 1 .....	72
5.7 Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de tomillo – Ensayo N° 2 .....	73
5.8 Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales entre ensayos 1 y 2 con aceite esencial de tomillo .....	75
5.8.1 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a 25 °C .....	75
5.8.2 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a 4 °C .....	76
5.8.3 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a -20 °C .....	77
5.9 Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras entre los ensayos 1 y 2 con aceite esencial de tomillo .....	78
5.9.1 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a 25 °C .....	78
5.9.2 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a 4 °C .....	79
5.9.3 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a -20 °C .....	79

---

5.10 Análisis comparativo de recuento de coliformes totales entre ensayos 1 y 2 con aceite esencial de tomillo .....	81
5.10.1 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a 25 °C .....	81
5.10.2 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a 4 °C .....	82
5.10.3 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a -20 °C .....	82
<b>6. Calidad microbiológica del alimento, tiempos y temperaturas de almacenamiento ..</b>	<b>84</b>
<b>7. Actividad antimicrobiana, envasado del producto alimenticio y aceites esenciales .</b>	<b>85</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>89</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>92</b>





---

## **INDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

---

---

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Lugares y mecanismos de acción de los aceites esenciales sobre la célula bacteriana: degradación de la pared celular, daño en las proteínas de la membrana celular, pérdida del contenido celular, coagulación del citoplasma e inhibición de la fuerza protón motriz. Fuente: Burt, S., 2004 .....	8
<b>Figura 2.</b> Estructura química de timol y carvacrol. Fuente: Kalemba and Kunicka, 2003. ....	10
<b>Figura 3.</b> Planta de <i>Origanum vulgare</i> .....	23
<b>Figura 4.</b> Planta de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	24
<b>Figura 5.</b> Planta de <i>Salvia officinalis</i> .....	25
<b>Figura 6.</b> Planta de <i>Thymus vulgaris</i> .....	26
<b>Figura 7.</b> Composición química del grano de soja .....	28
<b>Tabla 1.</b> Condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento .....	45
<b>Tabla 2.</b> Composición química de los aceites esenciales de orégano, romero, salvia y tomillo .....	47
<b>Tabla 3.</b> Especies bacterianas aisladas de distintos alimentos .....	49
<b>Tabla 4.</b> Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales sobre cepas bacterianas aisladas de alimentos por técnica de Difusión en Disco (10µl/disco) .....	50
<b>Figura 8.</b> Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de orégano y tomillo por método de difusión en disco sobre <i>S.aureus</i> , <i>Salmonella</i> sp. y <i>E.coli</i> .....	51
<b>Tabla 5.</b> Determinación de concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales de orégano, romero y tomillo por técnica de microdilución en caldo (µg/µl) .....	52
<b>Figura 9.</b> Concentración inhibitoria mínima de aceite esencial de tomillo sobre <i>E.coli</i> (TN), <i>S.aureus</i> (LC) y <i>B.cereus</i> (Or).....	53
<b>Figura 10.</b> Concentración inhibitoria mínima de aceite esencial de orégano sobre <i>S.aureus</i> (LC), <i>B.cereus</i> (Or) y <i>E.coli</i> (TN) .....	53
<b>Tabla 6.</b> Determinación de la concentración bactericida mínima de los aceites esenciales de tomillo, orégano y romero, por técnica de microdilución en caldo .....	56
<b>Tabla 7.</b> Asociaciones entre aceites esenciales de tomillo, orégano y romero por técnica de microdilución en caldo .....	57
<b>Figura 12.</b> Antagonismo entre aceites esenciales de orégano y tomillo sobre <i>E.coli</i> .....	58
<b>Figura 13.</b> Antagonismo entre aceites esenciales de orégano y tomillo sobre <i>S.aureus</i> ..	58
<b>Tabla 8.</b> Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de orégano – Ensayo N° 1 .....	60
<b>Tabla 9.</b> Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de orégano – Ensayo N° 2 .....	62

<b>Figura 14.</b> Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2) .....	63
<b>Figura 15.</b> Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2) .....	64
<b>Figura 16.</b> Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2) .....	65
<b>Figura 17.</b> Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2) .....	66
<b>Figura 18.</b> Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2) .....	67
<b>Figura 19.</b> Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2) .....	68
<b>Figura 20.</b> Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2) .....	69
<b>Figura 21.</b> Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2) .....	70
<b>Figura 22.</b> Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2) .....	71
<b>Tabla 10.</b> Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de tomillo – Ensayo N° 1 .....	73
<b>Tabla 11.</b> Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de tomillo – Ensayo N° 2 .....	74
<b>Figura 23.</b> Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2) .....	75
<b>Figura 24.</b> Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2) .....	76
<b>Figura 25.</b> Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2) .....	77
<b>Figura 26.</b> Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2) .....	78
<b>Figura 27.</b> Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2) .....	79
<b>Figura 28.</b> Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2) .....	80
<b>Figura 29.</b> Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2) .....	81

**Figura 30.** Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2) ..... **82**

**Figura 31.** Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2) ..... **83**

---

# **INTRODUCCION**

---

---



# I. INTRODUCCION

## 1. Plantas aromáticas y aceites esenciales

### 1.1 Las plantas aromáticas

Las plantas medicinales son aquellas que elaboran productos llamados *principios activos*, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre un organismo vivo. Las plantas aromáticas son plantas medicinales cuyos principios activos están constituidos, total o parcialmente, por esencias (56).

Las plantas aromáticas han sido cultivadas desde tiempos inmemorables, con el fin de mejorar el sabor de las comidas y perfumar el medio ambiente. En los últimos decenios, la utilización de plantas y hierbas para fines farmacéuticos sufrió un proceso de reducción. El fenómeno se inició cuando los técnicos de las industrias alimenticia y farmacéutica se volcaron al uso de sustitutos sintéticos más aprovechables y, consecuentemente, de menor costo. No obstante, esta situación ha comenzado a revertirse en la actualidad debido a la creciente preferencia de los consumidores por los productos naturales en la medicina (56).

### 1.2 Espicias y Hierbas: conceptos básicos

Las especias constituyen un cierto número de plantas aromáticas que el hombre utiliza por sus características organolépticas, que confieren ciertos aromas, colores y sabores agregados a los alimentos y bebidas, y los hacen más apetitosos, gratos y sabrosos al olfato, vista y paladar (56).

Las partes secas de la planta, como raíces, brotes, cortezas, hojas y semillas, adicionadas a distintos alimentos, otorgan a estos sabor, estímulo y color característicos. Son utilizadas como especias *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Salvia officinalis* (salvia), *Majorana hortensis* (marjorana), etc., pertenecientes a la familia Labiatae (34).

## 2. Aceites esenciales

Las plantas medicinales y aromáticas tienen la capacidad de sintetizar compuestos aromáticos tales como **aceites esenciales** (también llamados aceites volátiles o etéreos) sobre los cuales se han realizado estudios químicos, fisiológicos, agronómicos, económicos, taxonómicos, farmacológicos y biológicos (6, 92).

Estos líquidos aceitosos pueden ser obtenidos de distintas partes de un vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza, frutos, raíces, tallos, exudados) por distintos métodos extractivos (11, 24).

- Extracción por solventes: el aceite esencial es extraído del material vegetal por contacto con un solvente, el cual luego es separado por destilación a presión reducida o con arrastre de vapor (24).

- Extracción supercrítica: similar a la anterior, pero se utiliza como solvente un gas, generalmente CO<sub>2</sub>, en condiciones especiales de presión y temperatura (condiciones supercríticas) (24).

- Extracción por microondas: se utilizan equipos que generan microondas y base acuosa (24).

- Enfleurage: el material vegetal se pone en contacto con grasas semisólidas purificadas durante varias horas y luego, por arrastre con vapor o solvente, se obtiene el aceite esencial (24).

- Hidrodestilación: el método más utilizado en la producción de aceites esenciales es el de arrastre con vapor, conocido también como hidroextracción. Se basa en producir vapor dentro del equipo a través de un generador e inyectarlo por medio de distribuidores a través del material vegetal, el cual no se encuentra en contacto con el agua. El separador posee un retorno al equipo (24).

El término "aceite esencial" se cree que deriva de un nombre acuñado en el siglo XVI por el médico reformista suizo Paracelsus von Hohenheim, quien nombró al componente eficaz de una droga *Quinta essentia*. Se estima que son conocidos en el mundo 3000 aceites esenciales, de los cuales aproximadamente 300 son comercialmente importantes, destinados principalmente al mercado de los saborizantes y las fragancias (6).

### 3. Caracterización de los aceites esenciales

La fracción de una planta medicinal o aromática llamada aceite esencial constituye una mezcla compleja de metabolitos secundarios altamente enriquecidos en compuestos orgánicos volátiles con una base estructural tipo isopreno. Estos son los llamados terpenos, cuya estructura química general es  $C_{10}H_{16}$ , dentro de los cuales podemos encontrar monoterpenos ( $C_{10}$ ) y sesquiterpenos ( $C_{15}$ ). Junto a otros constituyentes de los aceites esenciales, los monoterpenos, son los responsables químicos de la fragancia y las propiedades biológicas de las plantas (16, 20, 23, 34, 44, 56).

Son producidos por las plantas como una protección natural frente al ataque de bacterias, hongos o insectos. Los glúcidos producidos a partir del proceso de fotosíntesis en los cloroplastos de las hojas de las plantas, son utilizados por las mismas de dos formas: una parte de estos compuestos son almacenados en diferentes órganos de la planta como elementos de reserva para formar nuevas células, y otra parte de los glúcidos se transforma en lípidos y sus aceites (terpenos y componentes aromáticos), heterósidos, ácidos orgánicos, etc. (56, 94).

Los aceites esenciales están contenidos en células y tejidos especiales de la planta, y difunden al exterior a través de la epidermis de las hojas y de las flores por canales excretores (34, 56).

El análisis composicional de los aceites esenciales se realiza a través de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa. Los componentes mayoritarios pueden constituir hasta un 85% del aceite esencial completo, mientras que los demás componentes están presentes solo como trazas. Los primeros son los responsables principalmente de las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales (11).

La composición de los aceites esenciales de diferentes partes de la misma planta puede diferir ampliamente. Por ejemplo, el aceite esencial de coriandro obtenido a partir de las semillas tiene una composición bastante diferente al del cilantro que se obtiene a partir de las hojas inmaduras de la misma planta (11).

#### 4. Historia de los aceites esenciales

En el siglo V A.C., Hipócrates mencionó de 300 a 400 plantas medicinales. En el siglo I D.C., Dioscorides escribió *De Materia Medica*, un catálogo de plantas medicinales el cual sería el prototipo de las farmacopeas modernas. La Biblia ofrece descripciones de aproximadamente 30 plantas curativas (16).

Aunque desde la antigüedad se han utilizado especias por su perfume, sabor y propiedades conservantes, de los aceites esenciales conocidos solo el aceite de trementina ha sido mencionado por historiadores griegos y romanos. La destilación fue utilizada por primera vez para la producción de aceites esenciales en Egipto, India y Persia hace más de 2000 años, y fue mejorada en el siglo IX por Arabia. El primer escrito auténtico que describe la destilación de aceites esenciales se atribuye a Villanova (1235–1311), un físico catalán (11).

En el siglo XIII los aceites esenciales comenzaban a producirse en farmacias y sus efectos farmacológicos fueron descritos en las farmacopeas, pero su uso no se extendió a Europa hasta el siglo XVI, época en que se empezaron a comercializar en la ciudad de Londres. Según el físico francés Du Chesne (Quercetanus), la preparación de los aceites esenciales era bien conocida en el siglo XVII, y las farmacias generalmente se abastecían de 15 a 20 aceites diferentes (11).

A fines del siglo XVIII, durante la colonización de Australia, se describió el uso del aceite de árbol de té para propósitos médicos, pero es probable que ya haya sido utilizado por los nativos australianos mucho antes de este acontecimiento. El primer ensayo experimental de las propiedades bactericidas de aceites esenciales fue realizado por De la Croix en 1881. Sin embargo, en el transcurso de los siglos XIX y XX el uso de estas esencias en medicina disminuyó limitándose a saborizar y aromatizar alimentos (11).

#### 5. Los aceites esenciales y la actualidad

En los últimos años se ha evidenciado un resurgimiento de los productos naturales tradicionales en medicina y en la conservación de alimentos y cosméticos. A pesar de que los antibióticos sintéticos han tenido un gran desarrollo, las infecciones bacterianas y fúngicas siguen siendo el principal problema en la medicina actual, y la existencia de numerosas cepas resistentes a estos antibióticos representa un nuevo desafío (44).

Al presente, existe un creciente interés en los aceites esenciales debido a que no existen precedentes de resistencia bacteriana a estos compuestos naturales, no producen reacciones adversas, tienen amplio rango de actividad, baja toxicidad y buena biodegradabilidad (65, 94).

Inouye et al. (2001), investigaron el rol potencial de estos antimicrobianos naturales como terapia de inhalación para tratamiento de bronquitis crónica y aguda y de sinusitis aguda, debido a que son altamente volátiles a temperatura ambiente. La inhalación de vapores de aceites esenciales aumenta la secreción de fluido respiratorio, manteniendo la ventilación y drenaje de los senos nasales, dando un efecto anti-inflamatorio sobre la tráquea y previniendo el asma. Se comprobó que los vapores de aceites esenciales son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de infección respiratoria como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* resistente y susceptible a penicilina, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Las enfermedades transmitidas por alimentos resultantes del consumo de alimentos contaminados con bacterias patógenas han sido una preocupación mayor para la salud pública. Durante el periodo 1993-1997, en Estados Unidos se produjeron un 75% de brotes y un 86% de casos causados por patógenos bacterianos. *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* eran los responsables de la mayoría de los brotes, casos y muertes. En Canadá, el costo del tratamiento de enfermedades transmitidas por alimentos debido al consumo de carne y productos cárnicos se estimó en 500 millones de dólares por año. Por ello, el uso de antimicrobianos naturales constituye un camino interesante para controlar la presencia de bacterias patógenas y extender la vida útil de un alimento procesado, reduciendo el peligro para la salud y la pérdida económica (61).

Los conservantes alimentarios son utilizados para asegurar la producción de un alimento libre de contaminación microbiana. Hoy en día existe un creciente interés en sustituir conservantes químicos (ácido propiónico y sorbato son los más utilizados) alimentarios por conservantes naturales socialmente más aceptables, como son los aceites esenciales. El uso excesivo de conservantes químicos ha creado desconfianza en el consumidor debido al cuestionamiento sobre su seguridad, pues algunos de estos elementos pueden representar un gran potencial carcinogénico, y atributos teratogénicos o toxicidad residual, y otros



pueden ser capaces de convertir ciertos materiales ingeridos en sustancias tóxicas o cancerígenas por incremento de la actividad de enzimas microsomales. Además, algunos de estos productos requieren una elevada precaución en cuanto a su manipuleo debido a que son corrosivos y sus vapores pueden irritar los ojos y el tracto respiratorio (58, 59, 68, 72, 80, 91).

Debido a lo expuesto anteriormente, se ha presionado a autoridades y elaboradores de alimentos para que: (i) se elimine completamente el uso de conservantes químicos en productos alimenticios, (ii) se busquen y desarrollen nuevos tipos de compuestos libres de sustancias tóxicas y/o (iii) se adopten alternativas más "naturales" para la seguridad alimentaria y para mantener y extender la vida útil de los alimentos. La legislación alimentaria restringe el uso de algunos antimicrobianos sintéticos basada en la posible toxicidad para los consumidores. En este panorama, las especias han emergido como compuestos que otorgan seguridad microbiológica a los alimentos, por su alto contenido en sustancias antimicrobianas naturales, los aceites esenciales (59, 81).

La mayoría de los aceites esenciales han sido clasificados por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos como Generalmente Reconocidos Como Seguros (GRAS), indicando que los consumidores pueden ingerirlo "sin miedo". Su utilización como conservantes alimentarios es limitada debido a las consideraciones de sabor, ya que la concentración de aceite esencial que se debe adicionar al alimento para que sea un antimicrobiano efectivo es mayor que la que hay que incorporar en un medio de cultivo, y puede llegar a exceder los niveles organolépticos aceptables, alterando el gusto del alimento (25, 37, 59, 61).

La aplicación tecnológica de los aceites esenciales como agentes sanitizantes naturales para reducir la cantidad de microorganismos patógenos alimentarios en el procesamiento de alimentos, requiere el establecimiento de condiciones óptimas tales como sensibilidad de un patógeno determinado, concentraciones óptimas y tiempo de contacto entre los aceites y el patógeno (55).

Los aceites esenciales derivados de especias también han sido usados por mucho tiempo como agentes saborizantes para incrementar las características sensoriales en los alimentos y bebidas y para extender la vida útil de los mismos. Por ello, se ha evaluado su actividad antioxidante cuando se los adiciona a una gran variedad de alimentos (10, 73).

Los estudios *in situ* sobre las propiedades de los aceites esenciales son considerados sumamente laboriosos y se necesita una investigación completa sobre el modo de aplicación de estas sustancias crudas en alimentos. Por ejemplo, inmersión, mezclado, encapsulación, rociado en superficie, evaporación en envasado activo, son métodos prometedores para adicionar estos compuestos en los alimentos, y están pobremente investigados (59).

## 6. Propiedades de los aceites esenciales

Las cualidades antisépticas de plantas aromáticas y medicinales y sus extractos han sido reconocidas desde la antigüedad, por lo cual se han intentado caracterizar estas propiedades en el laboratorio desde principios del siglo XX (23).

Los aceites esenciales o sus componentes puros poseen propiedades antibacterianas, antivirales, antitoxigénicas, antiparasitarias, antifúngicas, insecticidas, sedativas y antidepresivas, analgésicas, ansiolíticas y antimalarías. Estas características posiblemente están estrechamente relacionadas a la función que cumplen estos compuestos en las plantas (11, 71). Varios aceites esenciales producen efectos farmacológicos, demostrando propiedades anticancerígenas, antioxidantes, anti-inflamatorias y antimutagénicas (42, 44, 97).

También se ha evaluado el posible efecto selectivo benéfico de aceites esenciales frente a microorganismos del rumen. Los monoterpenos hidrocarbonados son menos tóxicos y, a veces, su actividad antimicrobiana es comparable a la de los compuestos oxigenados, los monoterpenos alcohólicos y los aldeídos. Los aceites esenciales tiene un efecto benéfico potencial como manipuladores de la fermentación del rumen, pues ejercen su actividad antimicrobiana sobre distintos miembros de la microflora del rumen, con lo cual puede ser beneficioso para la salud del animal (94).

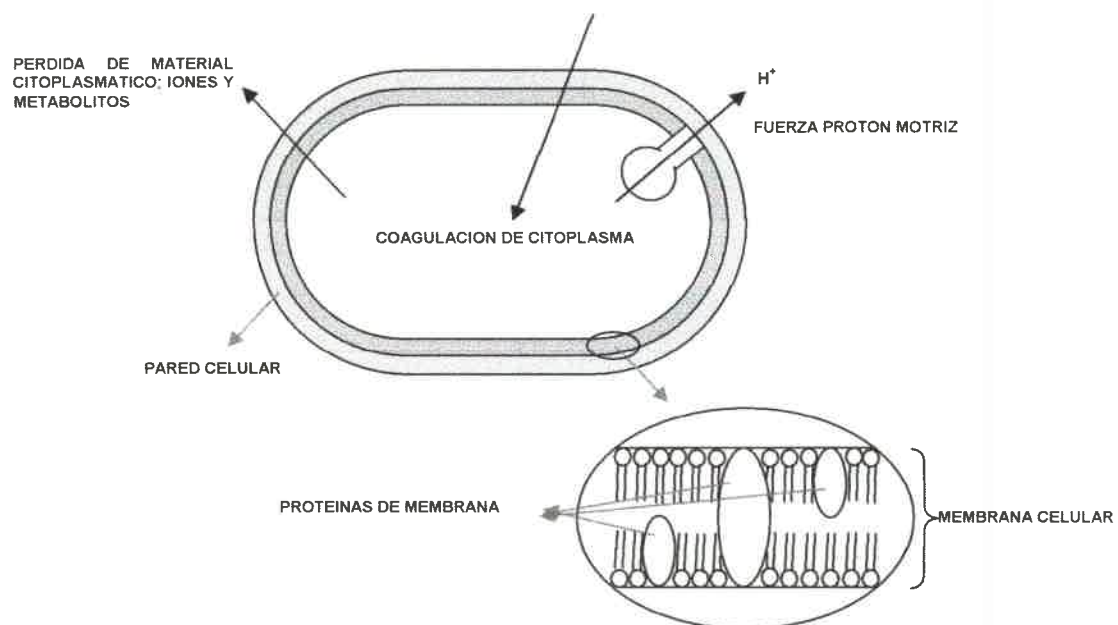
Actualmente ha resurgido el interés científico en el estudio de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, debido a que se ha incrementado la preocupación en el control de enfermedades de origen microbiano en humanos, animales y vegetales, y en el consumo de alimentos más naturales, sustituyendo conservantes químicos por estas sustancias como conservantes naturales, pudiendo evitar el crecimiento de patógenos de origen alimentario (bacterias, hongos filamentosos toxicogénicos y virus de plantas y animales) o retrasando el

proceso de deterioro iniciado por contaminantes microbianos (hongos, levaduras, bacterias) (11, 23, 73, 88, 89).

## 7. Modo de acción antibacteriana

Existen muchos estudios sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes, pero se sabe muy poco acerca de su mecanismo de acción (11).

Considerando la gran cantidad de compuestos químicos de diferentes grupos que están presentes en los aceites esenciales, es evidente que su actividad antibacteriana no puede ser atribuida a un único mecanismo de acción específico, ya que los sitios blanco en la célula bacteriana son varios (fig. 1) (11).



**Figura 1. Lugares y mecanismos de acción de los aceites esenciales sobre la célula bacteriana:** degradación de la pared celular, daño en las proteínas de la membrana celular, pérdida del contenido celular, coagulación del citoplasma e inhibición de la fuerza protón motriz.

Fuente: Burt, S., 2004.

El modo de acción general de los aceites esenciales depende de su concentración. Bajas concentraciones de compuestos activos pueden afectar la actividad de enzimas involucradas en la producción de energía y síntesis de componentes estructurales, mientras que altas concentraciones pueden causar una precipitación de proteínas en la célula (59).

La hidrofobicidad es una característica importante de los aceites esenciales y sus componentes, porque les permite unirse a los lípidos de la membrana celular bacteriana y mitocondrial, desestabilizando su estructura y provocando un aumento de su permeabilidad, produciéndose la pérdida de iones y otros componentes celulares de gran importancia como ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos como el glutamato, induciendo así la muerte celular. Este daño en la membrana celular puede estar cuantitativamente relacionado a la cantidad de compuestos antimicrobianos activos a la cual está expuesta (11, 33, 59).

Los aceites esenciales son capaces de ganar acceso al periplasma de las bacterias Gram-negativo a través de las porinas de la membrana externa. Esto se debe al hecho de que la permeabilidad de las membranas celulares depende de la hidrofobicidad de los solutos que atraviesan por ella y de la composición de la membrana (59).

La solubilidad de elementos traza esenciales como el hierro, los cuales están involucrados en muchas bacterias como co-factores de enzimas relacionadas con la utilización de oxígeno, es negativamente afectada por la actividad antimicrobiana de estos productos naturales. Además, la reacción del ión ferroso con compuestos fenólicos, puede causar un daño en las células en forma indirecta por estrés oxidativo (59).

Otro posible modo de acción puede ser la interacción (formación de complejos) entre estas sustancias antimicrobianas (por ejemplo alcoholes fenólicos o aldehídos) y componentes de la membrana bacteriana (proteínas) que están involucradas en la biosíntesis de la membrana celular. Los aceites esenciales también pueden inhibir la síntesis de DNA, RNA, proteínas y lipopolisacáridos en células bacterianas y fúngicas (44, 59).

Se ha probado que la efectividad de los agentes antibacterianos generalmente incrementa con sus propiedades lipofílicas como un resultado de la acción sobre citomembranas. Por otro lado, los aceites esenciales expresan usualmente baja solubilidad acuosa, lo cual impide que llegue a un nivel tóxico en las membranas celulares, incluso si los aceites tienen una muy buena afinidad con las mismas (44).

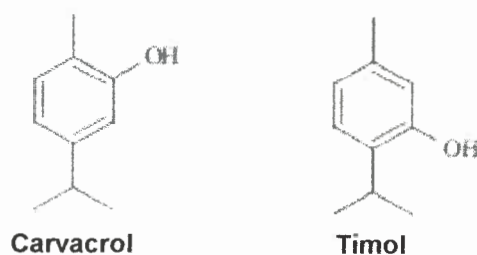
La acción de los aceites esenciales sobre las bacterias gram-positivo y hongos es similar. Los componentes del aceite destruyen la pared celular de las bacterias y la membrana celular de los hongos, y como consecuencia de ello se

produce la pérdida del contenido celular y posterior coagulación del citoplasma. Los signos de la actividad de los aceites esenciales sobre los hongos se pueden observar tanto en el microscopio como en la característica colonial por cambios en su morfología. Por ejemplo, el carvacrol causa cambios morfológicos sobre el hongo contaminante de alimentos *Cladosporium herbarum*, convirtiendo su micelio en suave y elástico, lo cual lo torna más frágil (44).

Los aceites esenciales con fenoles como principales componentes expresan una alta actividad frente a microorganismos, y su espectro de actividad es muy amplio. Las quetonas son los principales constituyentes del aceite esencial de salvia como son tujona y camphor. El aceite esencial de romero es rico en éteres como el 1,8-cineole (44).

### 7.1 Carvacrol y timol

Generalmente, los aceites esenciales que poseen una fuerte actividad antibacteriana frente a patógenos alimentarios contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como timol y carvacrol. Estos componentes mayoritarios de los aceites esenciales de orégano y tomillo, son estructuralmente similares, pues el timol posee un grupo hidroxilo ubicado en un lugar diferente sobre el anillo fenólico con respecto al carvacrol (fig. 2). Son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram-negativo, extrayendo los lipopolisacáridos y aumentando la fluidez de la membrana citoplasmática, con lo cual hay una mayor salida de ATP. Esta actividad se explica por la naturaleza ácida del grupo hidroxilo, formando un puente hidrógeno con un centro activo de las enzimas (11, 44).



**Figura 2. Estructura química de timol y carvacrol.** Fuente: Kalembe, D, & Kunicka, A., 2003.



La importancia del grupo OH<sup>-</sup> en la estructura fenólica fue confirmada en términos de actividad cuando se comparó carvacrol con su metil-éter. Además, la posición relativa del grupo OH<sup>-</sup> ejerce influencia sobre la efectividad de los componentes, pues timol y carvacrol poseen actividades diferentes frente a bacterias Gram-positivo y Gram-negativo. Además, la significancia del anillo fenólico fue demostrada por la pérdida de actividad del monoterpeno hidrocarbonato cíclico *p*-cymene, precursor biológico del carvacrol. La fuerte actividad de los fenoles se puede explicar en función de la sustitución alquilo dentro del núcleo fenólico, aumentando la actividad antimicrobiana de los mismos (9, 23).

Se ha demostrado que el carvacrol actúa desestabilizando la membrana celular, desintegrando la membrana externa y afectando el gradiente de pH. Así se colapsa la fuerza protón motriz y una disminución del pool de ATP celular lleva a una eventual muerte celular. Este efecto de los aceites esenciales sobre la fuerza protón motriz está fuertemente relacionada con la pérdida de iones específicos. Además, este compuesto forma canales a través de la membrana celular desplazando las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, produciéndose la pérdida de iones citoplasmáticos (11, 59, 90).

Según Lambert et al. (2001), el aceite esencial de orégano, que contiene carvacrol y timol como componentes mayoritarios, causa pérdida de iones fosfato de *S.aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por alteración de la membrana celular, y desintegración de la membrana externa de bacterias Gram-negativo.

El carvacrol es capaz de inhibir la producción de la toxina diarreica de *Bacillus cereus* en caldo y sopa. Existen dos teorías que explican esta capacidad de inhibir la producción de toxina: si la excreción de toxina es un proceso activo, puede ser que la cantidad de ATP o la fuerza protón motriz para exportar fuera de la célula sean insuficientes. La otra alternativa es que la velocidad específica de crecimiento de la célula sea muy baja, con lo cual la mayor parte de la energía disponible sería usada por la célula solo para sobrevivir, quedando muy poca para la producción de toxina (11).

Karpouhtsis et al. (1998), al realizar un estudio para determinar la actividad insecticida de aceite esencial de orégano, concluyeron que los componentes mayoritarios timol y carvacrol, en acción sinérgica con el resto de los

constituyentes del aceite esencial, poseían una fuerte actividad insecticida sobre *Drosophila melanogaster*, llamándose a esta especie "planta insecticida".

Ultee et al. (2002), desarrollaron un modelo para la inhibición del carvacrol sobre células bacterianas donde el mismo actúa como transportador transmembrana de cationes monovalentes por intercambio de un  $H^+$  de su grupo  $OH^-$  por un ión  $K^+$  por ejemplo. Se facilita el flujo de iones  $K^+$  y destrucción del gradiente interno de pH, produciéndose muerte celular.

Similar al carvacrol, el timol contiene un grupo  $OH^-$  y un sistema deslocalizado de electrones, y también posee una fuerte actividad antimicrobiana. Su mecanismo de acción está relacionado con un efecto perjudicial sobre la membrana celular y la generación de ATP. A partir del análisis de la estructura química, este compuesto puede tener un comportamiento anfipático y/o hidrofóbico, sugiriendo así la capacidad de partición en la membrana de una fase acuosa y la capacidad para afectar la organización de la membrana y la superficie electrostática (69, 90).

Según un estudio donde se trabajó con timol frente a *S.aureus* y *Salmonella typhimurium*, se demostró que este compuesto se une hidrofóbicamente a las proteínas de membrana y por medio de la unión a hidrógeno, produciendo cambios característicos en la permeabilidad de la membrana celular (11).

## 7.2 Susceptibilidad de organismos Gram-negativo y Gram-positivo

La susceptibilidad de los microorganismos a los aceites esenciales depende ante todo de las propiedades de los aceites esenciales y del microorganismo en sí (44).

En 1998 se propuso que las bacterias Gram-positivo eran más sensibles que las bacterias Gram-negativo a las propiedades antibacterianas de los aceites volátiles de plantas, lo cual contrasta con la hipótesis planteada por Dorman y Deans (2000), de que la susceptibilidad de las bacterias a los aceites esenciales y la característica de Gram parecen tener poca o ninguna influencia sobre la inhibición del crecimiento. El aceite esencial de *Origanum vulgare* parece ser igualmente efectivo sobre microorganismos Gram-positivo y Gram-negativo. Sin embargo, el aceite esencial de *Thymus vulgaris* parece preferentemente más activo sobre microorganismos Gram-positivo (23).

También se pudo observar que la susceptibilidad de las bacterias Gram-positivo y Gram-negativo a una gran diversidad de aceites esenciales tiene una pequeña influencia sobre la inhibición del crecimiento. Sin embargo, algunos aceites parecen más activos con respecto a la característica de Gram, ejerciendo una gran actividad inhibitoria frente a bacterias Gram-positivo. Así fue reportado que las bacterias Gram-negativo fueron más resistentes a los aceites esenciales presentes en las plantas. La estructura de la pared celular de las bacterias Gram-negativa está constituida esencialmente por lipopolisacáridos. Estos evitan la acumulación de los aceites sobre la membrana celular. *S.aureus*, el cual tiene una capa simple en su pared, fue el microorganismo más sensible comparado con *E.coli* O157:H7 y *S.typhimurium*, los cuales tienen una estructura de multi capa en su pared (61).

## 8. Métodos utilizados para estimar/determinar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales

### 8.1 Estudios “in vitro”

La mayoría de los microorganismos (patógenos alimentarios, bacterias contaminantes, hongos y levaduras) son sensibles (efecto bacteriostático y/o bactericida) a extractos obtenidos de especias o de de varios tipos de plantas y sus partes. De hecho la mayoría de los aceites esenciales de especias y de hierbas probadas frente a estos organismos exhiben actividad inhibitoria sobre el crecimiento microbiano y producción de compuestos peligrosos (ej. toxinas). Es necesario resaltar que el efecto antimicrobiano depende de la concentración y puede tener un efecto bactericida a altas concentraciones (59).

### 8.2 Estudios “in situ”

La actividad antimicrobiana de aceites esenciales en sistemas modelo de alimento o en alimento real ha sido menos estudiada que en ensayos “in vitro” (medio agar o caldo). Sin embargo, la efectividad de los aceites esenciales en los experimentos “in vitro” difiere significativamente de la obtenida a partir de estudios realizados “in situ” (sistemas modelo de alimento o alimento real) (59).

La adición de un aceite esencial a un alimento crea un ecosistema único, en el cual generalmente el crecimiento bacteriano se ve afectado. De hecho, en la mayoría de los estudios realizados en medio líquido se encontró que el “perfil”

inhibitorio de estos compuestos naturales fue siempre mejor que su eficacia en alimentos sólidos (59).

En varios estudios se pudo determinar que la actividad inhibitoria/antimicrobiana de aceites esenciales en alimentos semi-sólidos depende del pH del mismo, de la temperatura de almacenamiento y de la concentración utilizada de aceite esencial. Estudios relacionados a la actividad inhibitoria de aceites esenciales en alimentos sólidos bajo diferentes condiciones de almacenamiento (alta disponibilidad de oxígeno, envasado al vacío y atmósfera modificada) revelaron que la disponibilidad de oxígeno afecta la eficacia antimicrobiana del aceite esencial (46, 74, 76, 78).

A partir de un estudio se pudo observar que la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano sobre *S.aureus* y *Salmonella enteritidis* se incrementaba considerablemente cuando estos organismos eran incubados en condiciones de microaerobiosis o anaerobiosis. Así, bajo la condición de baja tensión de oxígeno, los cambios oxidativos en el aceite esencial eran menores. Además, se demostró que este aceite esencial era más efectivo cuando el almacenamiento del mismo adicionado a carne se realizaba al vacío o en atmósfera modificada con film de baja permeabilidad de oxígeno (velocidad de transmisión de  $O_2$  de  $4,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$  a  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  y humedad relativa ambiente del 75%), comparado al envasado con film de alta permeabilidad al oxígeno (velocidad de transmisión de  $O_2$  de  $3600 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ . 1 atm a  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  y humedad relativa ambiente del 75%) y en condiciones aeróbicas (77, 86, 89).

Entre los factores intrínsecos del alimento que afectan la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se encuentran la concentración y composición de proteínas, sales y lípidos, el contenido de agua, antioxidantes, conservantes, el pH y otros aditivos, mientras que dentro de los factores extrínsecos son considerados la temperatura de almacenamiento, el envasado al vacío/atmósfera modificada/aire y las características de los microorganismos. Sin embargo, un gran número de otros factores/variables pueden influir en el crecimiento/inhibición bacteriana y en la sensibilidad de los antimicrobianos en diferentes alimentos debido al hecho de que sean sólidos, acuosos y oleosos (grasas). La distribución espacial de las distintas fases, la pérdida de homogeneidad de pH y agua son características de gran importancia (11, 59).



Además de las grasas y las proteínas, el pH de los alimentos es un factor muy importante que afecta la actividad de los aceites esenciales. A un pH bajo, la hidrofobicidad de algunos aceites esenciales como el de tomillo, aumenta, facilitándose su disolución en la fase lipídica del alimento, pero también se disuelve más fácilmente en los lípidos de la membrana celular bacteriana, incrementándose su acción antimicrobiana (35).

Las interacciones entre los diferentes componentes en el alimento pueden crear gradientes de pH en el producto final tanto como la mayor parte de los diferentes concentraciones del antimicrobiano en diferentes fases. La capacidad tampón intrínseca de los ingredientes del alimento determina el pH en regiones específicas dentro del alimento. Como la distribución de los microorganismos en el alimento no es homogénea, la actividad antimicrobiana también dependerá de su densidad de población, dentro de la estructura del alimento *per se*, y de la fuente de carbono disponible regida por distintos factores. Así, la ecología microbiana, la capacidad tampón, el pH local y la estructura del alimento *per se*, deben ser tenidos en cuenta durante la evaluación y el ensayo de compuestos antimicrobianos derivados de plantas (59).

No obstante los aceites esenciales actúan bien en los ensayos antibacterianos *in vitro*, se debe tener en cuenta que es necesaria una mayor concentración de aceite esencial para que tenga el mismo efecto en alimentos. La gran disponibilidad de nutrientes en alimentos comparada a la de los medios de cultivo de laboratorio, puede aumentar la capacidad del microorganismo para reparar rápidamente daños celulares (11).

También se supone que altas cantidades de grasas y/o proteínas en los alimentos protege a las bacterias de la acción de los aceites esenciales, pues si la fracción lipídica del alimento absorbe al agente antimicrobiano, disminuye su concentración en la fase acuosa y por lo tanto su acción bactericida. El aceite esencial de tomillo, por ejemplo, mostró propiedades inhibitorias limitadas frente a *S. enteritidis* en quesos con alto contenido en grasa (4, 80).

Otra sugerencia es que el bajo contenido de agua en el alimento comparado al de los medios de laboratorio puede impedir el progreso de los agentes antibacterianos al sitio de ataque en la célula bacteriana. Los carbohidratos en alimentos no parecen proteger tanto a las bacterias de la acción



de los aceites esenciales como lo hacen las grasas y las proteínas. Una gran cantidad de sales y/o agua facilita la acción de los aceites esenciales (11, 80).

La estructura física de un alimento también puede limitar la actividad antibacteriana de un aceite esencial. Según Skandamis et al., (2000), el fuerte efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano sobre *S. typhimurium* en medio líquido se atribuye a la buena dispersión del aceite en el caldo, mientras que en una matriz sólida conteniendo gelatina dicha actividad se reduce drásticamente, debido a que su difusión está limitada por esta estructura.

Se ha demostrado que el crecimiento colonial restringe la difusión de oxígeno y las células situadas dentro de la colonia pueden ser protegidas en una determinada dimensión por células adyacentes a los sustratos en la emulsión. Si las gotitas de aceite incorporadas al alimento como emulsión tienen el tamaño apropiado, puede ser que las células en el interior de la colonia estén protegidas de la acción del aceite esencial (11).

La reducción de la población microbiana depende de la concentración de la especia o del aceite esencial. Altas concentraciones tienen efectos antibacteriano o bacteriostático y pueden inhibir completamente el crecimiento de los microorganismos, pero pueden dar aromas y sabores indeseables a los alimentos cuando las dosis utilizadas exceden los niveles organolépticamente aceptables. Por esta razón, el uso de las especias o sus aceites esenciales está limitado. El reto es aislar, purificar, estabilizar e incorporar a los alimentos antimicrobianos naturales sin afectar adversamente las características sensoriales, nutricionales y de seguridad de los mismos (52, 91).

Una solución al problema mencionado anteriormente, puede ser el uso de combinaciones de diferentes sistemas de conservación de alimentos que otorgan los beneficios de cada uno de ellos y al mismo tiempo reducen apreciablemente la cantidad de antimicrobiano requerido. Por esta razón, si se aplica al alimento un tratamiento moderado con calor y luego se conserva en frío, la temperatura de refrigeración juega un rol clave. La combinación de estos tratamientos con una mediana concentración de aceite esencial, puede producir un alimento microbiológicamente estable y seguro sin ninguna pérdida en la calidad sensorial (91).



## 9. Actividad antioxidante de los aceites esenciales

Una de las principales razones del deterioro de los alimentos durante su almacenamiento es la oxidación de las grasas y los aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) contenidos en los mismos. Como consecuencia del contacto del oxígeno con la grasa se generan peróxidos los cuales a su vez son oxidados y descompuestos en alcoholes de bajo peso molecular y en aldehídos, resultando en la rancidez (34, 88).

El problema de la oxidación en alimentos envasados comúnmente se trata empleando sustancias antioxidantes. Los antioxidantes sintéticos más utilizados en alimentos son hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), propil galato (PG) y butil hidroxiquinona (TBHQ). Pero estos compuestos son sospechosos de causar o promover efectos negativos sobre la salud. Por esta razón existe un creciente interés en estudios de aditivos naturales como potenciales antioxidantes. El  $\alpha$ -tocopherol, vitamina E, es una antioxidante natural ampliamente utilizado en la industria alimenticia, pero su efecto antioxidante es inferior al de los antioxidantes sintéticos. Muchas plantas aromáticas y especias han demostrado su capacidad de retardar los procesos de peroxidación lipídica en alimentos ricos en grasas y aceites (34, 47).

El efecto antioxidante de los compuestos naturales se debe a la presencia de grupos oxhidrilos en su estructura química. Varios compuestos no volátiles como carnosol, ácido carnósico, ácido cafeico y ácido rosmarínico tienen la capacidad de capturar radicales libres. Algunos compuestos volátiles de los aceites esenciales poseen un gran potencial como conservantes naturales. Estos compuestos, presentes en los aceites esenciales de salvia y romero, tienen un potencial antioxidante mucho mayor que el de los antioxidantes sintéticos BHT y BHA. Se han realizado muchos estudios con aceite esencial de orégano, rico en timol y carvacrol volátiles, que han demostrado un considerable efecto antioxidante, sugiriendo su uso como antioxidante natural potencial en la industria alimenticia (47, 84).

## 10. Tecnologías de conservación de productos alimenticios

Muchos productos alimenticios son perecederos por naturaleza y necesitan ser protegidos de la contaminación durante su preparación, almacenamiento y distribución para que tenga la vida útil deseada. Debido a que en la actualidad existen alimentos que se venden en áreas del mundo muy lejanas de los sitios de producción de los mismos, se ha incrementado la necesidad de extender la vida útil de estos productos (35).

Para prolongar la vida útil de frutas y vegetales, por ejemplo, puede controlarse el crecimiento de las poblaciones microbianas y deben emplearse tratamientos post-cosecha para reducir la carga inicial como lavado y remoción de tejido dañado. Un alimento requiere una carga microbiana inicial muy baja y durante su almacenamiento es necesario inhibirla para que tenga una vida útil adecuada. Una forma de inactivar a los patógenos alimentarios y microorganismos alteradores en alimentos es la combinación de aceites esenciales o de estos con alguno de sus componentes mayoritarios obtenidos por destilación fraccionada del aceite esencial crudo, en las proporciones requeridas de fuerza y espectro de inhibición (19, 62, 87).

La limpieza ayuda a mantener una población mínima, porque si la carga inicial es alta, la vida útil del alimento durante su almacenamiento es corta. Por otro lado, muchos estudios indican que la población nativa del alimento no puede ser destruida completamente, porque esta controla el crecimiento de cualquier patógeno contaminante. Una opción para extender la vida útil de los alimentos lo constituye el envasado, que otorga un alto margen de seguridad y calidad del alimento (3, 87).

La vida útil de los alimentos frescos y procesados envasados está influenciada por la atmósfera que los rodea. Para algunos alimentos procesados, una cantidad reducida de oxígeno es beneficioso, pues reduce la velocidad de decoloración de carnes curadas y leche en polvo, y previene la rancidez en nueces y otros alimentos ricos en grasas. Niveles altos  $\text{CO}_2$  y bajos de oxígeno pueden representar un problema en productos frescos favoreciéndose el metabolismo anaerobio y como consecuencia de ello una rápida putrefacción del alimento. Sin embargo, en carnes frescas y procesadas, quesos y productos horneados, el  $\text{CO}_2$  puede tener un efecto antimicrobiano beneficioso (26).

El crecimiento y supervivencia de los microorganismos en los alimentos han sido utilizados para el desarrollo de nuevas tecnologías o estrategias de control de la contaminación o de patógenos alimentarios (por ejemplo, envasado al vacío, envasado en atmósfera modificada (MAP), irradiación, campo magnético y campo pulsado, alta presión, sistemas antimicrobianos naturales, microbiología predictiva y análisis de riesgo), de manera de extender la vida útil de alimentos perecederos. La tecnología de las barreras sanitarias involucra la combinación de varios métodos de conservación simultáneos para llevar a cabo este control. A pesar de que el tratamiento por calor es el más efectivo para la destrucción de patógenos alimentarios, es necesario el envasado aséptico, pero no siempre práctico, para mantener la efectividad del tratamiento por calor durante el almacenamiento y distribución del alimento (35, 89).

La capacidad protectora de las tecnologías de envasado al vacío, en atmósfera controlada y en atmósfera modificada se basa en la ausencia de gases en el interior del paquete y en la composición de la atmósfera creada artificialmente. En el envasado al vacío el incremento de la vida útil de un alimento se logra gracias a la baja concentración de oxígeno existente en el envase. En los sistemas de atmósfera controlada y modificada se debe al diseño de un ambiente gaseoso "a medida" según las características microbiológicas (microflora natural, contaminación procedente del medio), metabólicas (intensidad respiratoria en los vegetales) y organolépticas (mantenimiento del color rojo en la carne fresca) del alimento (39).

#### 11. Sinergismo entre aceites esenciales, sus componentes y otros agentes

La actividad inherente está relacionada a la configuración química de los componentes, a las proporciones en las que están presentes y a las interacciones entre ellos. Se ha investigado la interacción sinérgica entre diferentes aceites esenciales o entre estos y sus componentes individuales. Sin embargo, la magnitud del sinergismo puede ser baja y no tener importancia práctica (11, 44).

Se observa un efecto aditivo cuando el efecto combinado es igual a la suma de los efectos individuales. Se observa antagonismo cuando el efecto de uno o ambos componentes es menor cuando son aplicados juntos que aplicados individualmente. Se observa sinergismo cuando el efecto de las sustancias combinadas es mayor que la suma de los efectos individuales. La interacción se

considera indiferente cuando el efecto combinado es igual a los efectos producidos por los componentes independientes. Algunos estudios han concluido que los aceites esenciales completos tienen una actividad antimicrobiana mayor que los componentes mayoritarios, lo cual sugiere que los componentes minoritarios son críticos para la actividad y pueden tener un efecto sinérgico (11, 44).

### 11.1 Sinergismo y antagonismo entre componentes de aceites esenciales y conservantes alimenticios

Un fuerte sinergismo entre un aceite esencial y un aditivo alimentario podría llevar a la utilización de pequeñas cantidades de conservantes en alimentos. Esto es importante porque la aplicación de los aceites esenciales en la industria alimenticia está limitada debido a que dosis antimicrobianas efectivas pueden exceder los niveles organolépticos aceptables. Algunos saborizantes de alimentos demostraron efecto sinérgico inhibitorio con sal (por ejemplo el aceite esencial de menta), sal y ácidos grasos o sal y bajo pH (pH=4,2) (por ejemplo aceite esencial de anís), tratamiento con calor (por ejemplo S-carvone). También fue observado un efecto sinérgico entre carvacrol y hidroxianisol butilado frente a especies de *Fusarium*. Los agentes quelantes como el EDTA incrementan la actividad antimicrobiana, pero no revelan ninguna actividad *per se*. La combinación de aceites esenciales con EDTA puede disminuir la cantidad de compuestos antimicrobianos necesarios para inhibir a *E.coli*, con lo cual se optimiza la estabilidad de la vida útil de un alimento (44, 80).

## 12. Plantas aromáticas utilizadas en la industria alimentaria y sus derivados

### 12.1 Producción de especies aromáticas en la provincia de Córdoba y el mundo

La producción de especies aromáticas de clima templado y subtropical presenta en Argentina excepcionales condiciones agroedafo-climáticas para su desarrollo. En muchas de estas producciones, nuestro país no sólo logró el autoabastecimiento interno sino que alcanzó una excelente inserción en el mercado mundial, convirtiéndose en el principal exportador (82).

El Valle de Traslasierra, ubicado al oeste de la provincia de Córdoba, es la principal zona provincial en cuanto a vegetación, producción y comercialización de hierbas aromáticas y medicinales por su diversidad, cantidad e historia. De los

tres departamentos que integran la región, el departamento San Javier es el que concentra la mayor importancia provincial por el volumen y diversidad de especies aromáticas y medicinales en producción. En este departamento se pueden considerar dos zonas diferenciadas (82):

- La zona ubicada al pie de las sierra o de faldeos de las sierras que abarca una extensa zona a lo largo de la ruta provincial N° 14 e incluye a las localidades de Villa de Las Rosas, Las Tapias, Los Pozos. Hacia el sur continua con el "camino de la costa" que abarca las localidades de Luyaba, La Travesía, La Paz, La Población, Yacanto y San Javier, entre otras (82).

-La zona denominada "del bajo", que corresponde a las localidades de Villa Dolores, Villa Sarmiento, Sauce Arriba, San Pedro, San José y Los cerrillos. (82).

La primer zona, "pie de sierras o faldeos de las sierras", se caracteriza por su alta heliofanía (días muy luminosos), baja nubosidad, baja humedad relativa ambiente, diferentes tipos de suelo ubicados en alturas diversas, por lo general entre 700 y 800 metros de altura sobre el nivel del mar, distintas exposiciones respecto de lomas y valles, y una marcada amplitud térmica, conformando así diferentes microclimas que permiten el crecimiento espontáneo de una gran diversidad de plantas aromáticas y medicinales. Se considera en esta zona la existencia de más de 70 pequeños productores minifundistas con explotaciones que varían entre 1 a 5 hectáreas, siendo el orégano la especie más cultivada. Un aspecto muy importante en este tipo de producciones es la necesidad de riego, el cual se realiza con agua de vertientes generalmente de buena calidad, que sumado a las características mencionadas anteriormente se traduce en ventajas comparativas que se reflejan en la calidad de los productos (82).

El uso de aceites esenciales provenientes de especies aromáticas (orégano, romero, tomillo, salvia) abundantes en nuestras serranías cordobesas y cultivadas para su uso comercial en nuestra provincia, podrían ser adicionados a diferentes alimentos con el propósito de preservar su vida útil y ser consumidos con sus características organolépticas e higiénicas adecuadas.



Los mayores productores de aceites esenciales son países en desarrollo: Brasil, Egipto, India y México, e Indonesia mientras que los mayores consumidores son los países industrializados: Estados Unidos, Japón y países de Europa occidental. El crecimiento del mercado de los aceites esenciales es estimado en aproximadamente un 4% anual (97).

Si bien los especialistas aseguran que las ventas de fitofármacos en Estados Unidos y Europa se triplicaron hacia fines de la década del '90, estimándose en un valor de u\$s 8.000 millones, existe en Europa un resurgimiento por el uso de hierbas en la medicina tradicional. En el año 2004, el comercio mundial de plantas aromáticas fue de aproximadamente 310 millones de toneladas, equivalente a un valor de u\$s 1500 millones. El crecimiento anual esperado es del 4%, es decir que a nivel mundial, cada 15 años se duplica el consumo (8).

## 12.2 Orégano

El orégano verde o vulgar (*Origanum vulgare* (L.), ssp. *vulgare*), perteneciente a la familia Lamiaceae, es una planta vivaz, de tallos erguidos, de hasta 1 metro de altura, vellosos, generalmente ramificados en su parte superior, de color rojizo. Hojas de 1 a 4 cm, ovales, enteras, puntiagudas, lampiñas por el haz y vellosas por su envés, pecioladas (fig. 3). Las flores, reunidas en glomérulos densos dispuestos en panojas terminales, las espiguillas de 5 a 30 mm; las brácteas, más largas que el cáliz, pero sin duplicar su longitud, de 4 a 5 mm, son violáceas; cáliz tubuloso, con los 7 dientes casi iguales; corola con tubo erguido, saliente, de 4 a 7 mm de color generalmente rojizo, a veces blancas; de los 4 estambres, son mayores los anteriores. El fruto es un tetraqueno, con cada parte ovoidea y lisa. Su nombre genérico deriva de los vocablos griegos *oros*, montaña y *ganos*, adorno, en alusión al carácter ornamental, en los montes, de las especies de este género (56).

Esta planta aromática posee propiedades terapéuticas (diaforética, carminativa, antiespasmódica, antiséptica, tónica) y es utilizada en muchos países en la medicina tradicional. Ha sido ampliamente usada en las industrias farmacéutica y cosmética como una hierba culinaria, sustancia saborizante en productos alimenticios, bebidas alcohólicas y perfume por fragancia picante (81).



Esta especie es bien conocida por su actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivo como *S.aureus* y *Bacillus cereus*, y Gram-negativo como *E.coli* y *Salmonella typhimurium*, y por su actividad antioxidante. Los dos mayores componentes fenólicos, carvacrol y timol, que constituyen entre el 78% y el 82% de su aceite esencial, son los responsables de estas dos actividades (1, 10, 43, 71).

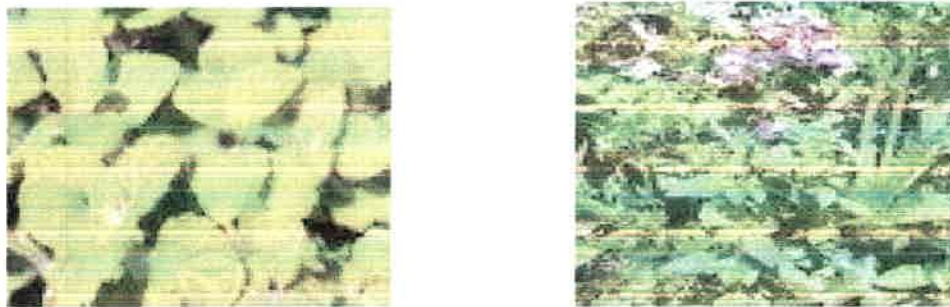


Figura 3. Planta de *Origanum vulgare*

### 12.3 Romero

La planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es un subarbusto vivaz, leñoso, de ramas pardas, del que parten hojas de 15 a 40 mm de longitud, perennes, sentadas, opuestas, coriáceas, estrechas, lanceoladas, con los bordes enteros y revueltos hacia abajo, de color verde brillante, algo granulosas por el haz y suaves, con tomento blanquecino, por su envés (fig. 4). Las flores están agrupadas en pequeños y cortos racimos, en las axilas de las hojas; el cáliz es leñoso, con dientes bordeados de blanco; la corola, de 10 a 12 mm de longitud, es de color azul o lila pálido, a veces rosa y más rara vez blanca. En el interior del tubo de la corola se insertan dos estambres salientes, provistos en su base de un pequeño diente y terminados por dos anteras con un solo saco. El fruto es un tetraquenio; en el interior de cada aquenio hay un embrión desprovisto de albúmen, con dos cotiledones convexos. Su nombre proviene de la unión de dos vocablos griegos *rhos*, arbusto y *myrinos*, aromático, característica de la planta (56).

El aceite esencial de romero tiene una significativa actividad sobre el crecimiento de organismos patógenos de alimentos tales como *S.aureus*, *Salmonella pullorum* y *Yersinia enterocolitica*, organismos contaminantes de alimentos como *B.subtilis*, *P.aeruginosa* y *Lactobacillus plantarum*, organismos de origen fecal como *E.coli* y *Streptococcus faecalis* y el hongo contaminante *Aspergillus niger*. También presenta actividad antioxidante mayor o similar al compuesto  $\alpha$ -tocoferol a altas concentraciones (88).



**Figura 4. Planta de *Rosmarinus officinalis***

#### 12.4 Salvia

La salvia (*Salvia officinalis* L.) es una planta vivaz, leñosa, subarborescente, con numerosas ramas, salientes y tomentosas, que pueden alcanzar los 60 cm y más de altura. Las hojas son gruesas, rugosas, tomentosas, opuestas, pecioladas, oval-lanceoladas, verde grisáceo por el haz y con pubescencia blanquecina por el envés (fig. 5). Flores agrupadas en 2,4 y rara vez en 6, 10 verticilos, dispuestos en espigas terminales (cáliz pubescente y glandular). Corola de 2 a 3 veces más larga que el cáliz, de hasta 35 mm de longitud, con anillo peloso dentro del tubo, de color azul-violáceo, a veces blanco o rosado. Los frutos son aquenios ovoideos (56).

El nombre genérico proviene del verbo latino *salvare*, salvar, en alusión a las propiedades salutíferas de las plantas de este género (56).

Al igual que el romero, la salvia tiene una fuerte actividad antioxidante. Los principales compuestos fenólicos que hacen a dicha actividad son ácidos fenólicos, derivados del carnosol y flavonoides, a saber, ácido rosmarínico, ácido carnósico y carnosol (70). Además, el aceite esencial de salvia posee una mediana actividad antibacteriana frente al patógeno alimentario *B.cereus* (91).

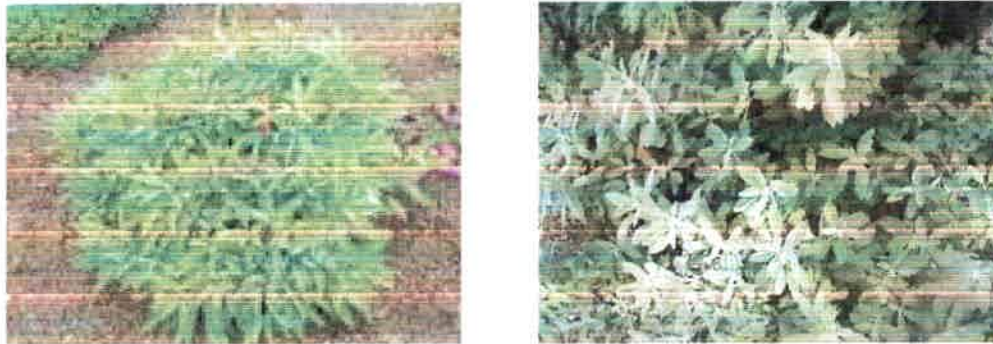


Figura 5. Planta de *Salvia officinalis*

### 12.5 Tomillo

El tomillo (*Thymus vulgaris* L.) es una planta vivaz, leñosa, muy polimorfa, de 10 a 40 cm de altura, con numerosas ramas, leñosas, erectas, compactas, parduzcas o blanco-aterciopeladas. Las hojas, de 3 a 8 mm son lineares, oblongas, sentadas o brevemente pediceladas, opuestas, tomentosas, sin cilios, con el pecíolo o sus márgenes revueltos hacia abajo y blanquecinas por su envés (fig. 6). Las flores son axilares y agrupadas en la extremidad de las ramas, formando una especie de capítulo terminal, a veces, con inflorescencia interrumpida; las brácteas son verde grisáceas; el cáliz algo giboso, con pelos duros, con tres dientes en el labio superior, cortos, casi iguales y dos en el inferior, muy agudos, más largos, con pelos en sus bordes y de color rojizo; la corola, un poco más larga que el cáliz, con el labio superior erguido y el inferior trilobulado y de color blanquecino o rosado; los cuatro estambres sobresalen de la corola. El fruto es tetraquenio, lampiño, de color marrón. El nombre genérico proviene del verbo griego *Thym*, perfumar, en alusión al intenso y agradable aroma de la planta (56).

Esta planta aromática nativa de la región Mediterránea ha sido utilizada durante mucho tiempo como una fuente de aceite esencial (aceite de tomillo) y de otros constituyentes (timol, flavonoides, ácido cafeico y ácido labiático) derivados de diferentes partes de la planta. El aceite esencial ha sido usado en muchas industrias principalmente como aditivo alimentario. Este aceite posee actividad antimicrobiana (contra bacterias y hongos) mediada mayormente por los compuestos fenólicos timol y carvacrol. Además, se ha reportado que el extracto alcohólico de la planta posee actividad antioxidante (38).

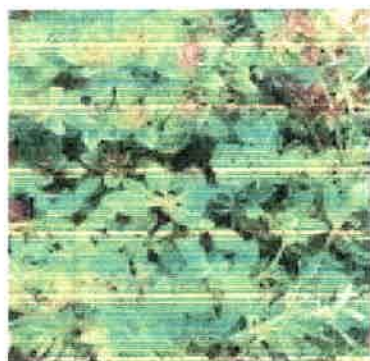


Figura 6. Planta de *Thymus vulgaris*

### 13. Soja y sus productos derivados

En América, la historia del consumo de alimentos derivados de la soja se inició a partir de la década del 60 del siglo XX en Estados Unidos. La tecnología manufacturera de alimentos derivados de la soja tradicionales, tales como leche de soja, soja fresca, soja cocinada, milanesas de soja, tofu, tofu frizado, tofu frito, tofu fermentado, salsa de soja, etc., tuvo un gran progreso a través de la innovación tecnológica producida después de la Segunda Guerra Mundial, y la modernización en la elaboración de estos alimentos se produjo recién a principios de la década del 80 (28).

Productos derivados de la soja no tradicionales, tales como harina de soja, concentrado de proteína de soja y proteínas de soja aisladas, fueron utilizados principalmente como ingredientes en alimentos formulados por sus propiedades funcionales, tales como absorción de agua y grasas, emulsificación, formación de espuma, gelificación, formación de uniones, etc. Investigaciones realizadas a principios de los años 90 del siglo XX demostraron que proteínas y componentes



minoritarios de la semilla de soja tienen actividad anticarcinogénica y disminuyen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, ya que tradicionalmente eran considerados como factores antinutricionales en la prevención de enfermedades crónicas (28, 49).

### 13.1 Generalidades

La soja es una legumbre de ciclo anual, que alcanza entre 0,5 y 1,5 metros de altura. Posee hojas grandes, trifoliadas y pubescentes. Su nombre científico es *Glycine max* (L.), pertenece a la familia de las Papilionáceas (Fabáceas) y en otros países se la conoce popularmente como soya (Portugal y Francia e Inglaterra), soia (Italia) y sojabohne (Alemania). Sus flores se ubican en las axilas de las hojas, son pequeñas, de color blanco-amarillento o azul-violáceo y se encuentran agrupadas en inflorescencias. Esta planta herbácea posee vainas cortas, que contienen en su interior entre uno y cuatro granos oleaginosos (con un 20% de aceite), con distintas variaciones de color: amarillo o negro, aunque existen otras especies con semillas de color verde o castaño. Al igual que las leguminosas, la soja puede capturar del suelo todo el nitrógeno que necesita porque posee nódulos en los que se desarrollan bacterias fijadoras del nitrógeno (67).

Uno de los problemas que se encuentran cuando se preparan productos derivados de soja, es que sus propiedades sensoriales no son tan aceptables como alimentos similares de origen animal como el caso de hamburguesas (66).

### 13.2 Valor nutricional de la soja

El valor nutricional de los alimentos y sus productos derivados está dado por la cantidad y calidad de sus nutrientes, que son sustancias digeribles y asimilables por el organismo. Dentro de ellos, los nutrientes esenciales son aquellos que el organismo no sintetiza y, por lo tanto, tienen que ser aportados por los alimentos (67).

La soja es una importante fuente de proteínas y aceite y, por lo tanto, un alimento con alto valor nutricional. En la figura 7 se observa la composición química del grano de soja. Posee proteínas de alta calidad, en comparación con otros alimentos de origen vegetal (67).

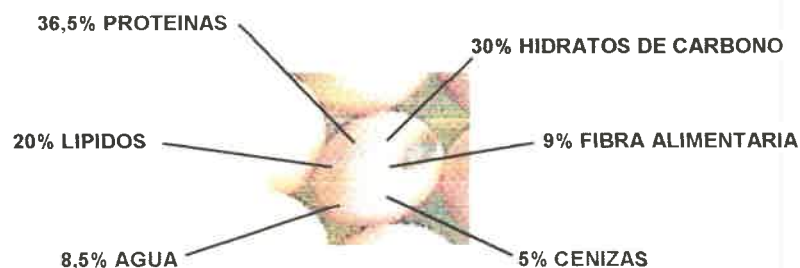


Figura 7. Composición química del grano de soja.

La calidad del grano de soja destinado a la elaboración de alimentos está relacionada con su contenido de aceite y proteína. La soja contiene los aminoácidos metionina y cisteína en cantidad suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales del adulto normal. Una dieta que incorpora de la soja un 60% del total de proteínas, permite en adultos la misma regeneración muscular (luego de un ejercicio físico intenso) que la que aportaría idéntica cantidad de carne (67).

El alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que poseen los alimentos derivados de la soja hace que estos sean susceptibles a una rápida oxidación por radicales libres y otras especies del oxígeno altamente reactivas. La adición de conservantes químicos es uno de los métodos más utilizados en la extensión de la vida útil de este tipo de alimentos, además de otras tecnologías como la aplicación de la técnica del ahumado, pero la calidad del alimento se ve afectada en sus propiedades sensoriales. Una alternativa para la conservación de estos alimentos es la incorporación de conservantes naturales, ya que estos poseen actividad antimicrobiana, disminuyendo la carga microbiana patógena y alteradora que posee el alimento, y antioxidante, entre otras (2).





---

# **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

---

---

## II. HIPOTESIS

El agregado de aceites esenciales a productos alimenticios derivados de la soja tales como milanesas de soja, prolonga su vida útil disminuyendo el desarrollo de microorganismos patógenos y/o de alteración.

## III. OBJETIVO GENERAL

Realizar el análisis microbiológico de milanesas de soja elaboradas con y sin el agregado de aceites esenciales de especies aromáticas para determinar su acción antimicrobiana durante su almacenamiento.

### 1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Obtener los aceites esenciales a partir de las plantas aromáticas a utilizar en la elaboración del producto alimenticio.
- b) Determinar la composición química de los aceites esenciales.
- c) Aislar, identificar, conservar y propagar cepas patógenas aisladas de diferentes alimentos.
- d) Determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales sobre cepas bacterianas obtenidas a partir de distintos alimentos.
- e) Determinar asociaciones entre distintos aceites esenciales.
- f) Elaborar el producto alimenticio.
- g) Analizar microbiológicamente el producto alimenticio recientemente elaborado con y sin el agregado de aceites esenciales.
- h) Determinar la composición microbiológica del producto alimenticio durante el almacenaje para analizar los cambios que se producen en el mismo.

---

# **MATERIALES Y METODOS**

---

---

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 1. Soluciones, Medios de Cultivo y Reactivos

#### Soluciones

##### - Solución de resazurina al 0.01%

Sal de Resazurina Sódica .....	0,01g
Agua destilada c.s.p. ....	100 ml

#### Medios de cultivo

##### - Agar-Agar al 0,15%

Agar-Agar .....	1,5g
Agua destilada c.s.p. ....	1000ml

##### - Agar Baird-Parker (Medio Base)

Peptona de caseína .....	10 g
Extracto de Carne .....	5 g
Extracto de Levadura .....	1g
Cloruro de litio .....	5 g
Agar.....	20 g
Glicina .....	12 g
Piruvato de sodio .....	10 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH: 7,1

A cada fracción de 90 ml de medio base fundido y templado a 45 °C se le agregó:

a) 1 ml de solución de telurito de potasio 3 % P/V.

b) 5 ml de emulsión yema de huevo.

**- Agar Base con Cetrimida (Agar Cetrimide)**

Gelatina peptona.....	20 g
SO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> .....	10,4 g
Cl <sub>2</sub> Mg.....	1,4 g
Cetrimida.....	0,3 g
Agar .....	13,6 g
Glicerina .....	10 ml
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,1

**- Agar Bismuto Sulfito**

Polipeptona .....	10 g
Extracto de carne .....	5 g
Dextrosa.....	5 g
Fosfato disódico .....	4 g
Sulfato ferroso.....	0,3 g
Indicador de sulfito-bismuto.....	8 g
Verde brillante .....	0,025 g
Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,5

**- Agar Citrato de Simmons**

Sulfato de magnesio.....	0,2 g
Fosfato dipotásico .....	1 g
Fosfato monoamónico.....	1g
Citrato de sodio .....	2 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Azul de bromotimol.....	0,08 g
Agar.....	13 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH : 7,2

**- Agar de Levine con Eosina Azul de Metileno (EMB)**

Peptona.....	10 g
Lactosa.....	10 g
Eosina y azul de metileno .....	0,065 g
Agar.....	15 g
Agua Destilada.....	1000 ml
pH : 7,1	

**- Agar Fenilalanina (FA)**

DL- Fenilalanina .....	2g
Extracto de Levadura .....	3g
Cloruro de Sodio .....	5g
Fosfato de Sodio .....	1g
Agar.....	12g
Agua Destilada.....	1000 ml
pH : 7,3	

**- Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)**

Peptona.....	15 g
Extracto de Levadura .....	3 g
Extracto de Carne .....	3 g
Proteosa Peptona.....	5 g
Glucosa .....	1 g
Lactosa.....	10 g
Sacarosa .....	10 g
Sulfato de Hierro .....	0,20 g
Cloruro de Sodio .....	5 g
Tiosulfato de Sodio.....	0,30 g
Rojo Fenol.....	0,024 g
Agar.....	12 g
Agua Destilada.....	1000 ml
pH : 7,2 - 7,6	



**- Agar Mueller-Hinton (AMH)**

Infusión de carne.....	300 g
Peptona ácida de caseína.....	17,5 g
Almidón.....	1,5 g
Agar.....	15 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 ml

pH: 7,4

**- Agar Nutritivo (AN)**

Peptona.....	5 g
Extracto de Carne.....	3 g
Cloruro de Sodio.....	8 g
Agar.....	15 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH : 7,1 - 7,5

**- Agar Salmonella y Shigella (Agar S-S)**

Pluripeptona.....	5 g
Extracto de carne.....	5 g
Lactosa.....	10 g
Sales biliares.....	8,5 g
Citrato de sodio.....	8,5 g
Tiosulfato de sodio.....	8,5 g
Verde brillante.....	0,000033 g
Rojo neutro.....	0,025 g
Agar.....	13,5 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7

**- Agar Tripticasa-Soya (ATS)**

Tripteína.....	15 g
Peptona de soya .....	5 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Agar.....	15 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 ml

pH: 7,3

**- Agua de Peptona para Diluciones**

Peptona.....	1 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH : 7

**- Agua de Peptona para Indol**

Peptona.....	10 g
Cloruro de Sodio .....	5 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH : 7,1 - 7,3

**- Caldo Cerebro Corazón (CCC)**

Extracto de Cerebro de Ternera.....	12,5 g
Extracto de Corazón de Buey.....	5 g
Triptosa .....	10 g
Cloruro de Sodio .....	5 g
Fosfato Disódico .....	2,5 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH : 7,2 - 7,6

**- Caldo Cristal Violeta Doble Concentración (CCV2X)**

Peptona.....	40 g
Lactosa.....	40 g
Cloruro de Sodio .....	10 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH : 6,8

**- Caldo Lactosado (CL)**

Extracto de Carne .....	3 g
Peptona .....	5 g
Lactosa .....	5 g
Agua Destilada .....	1000 ml

pH : 6,9

**- Caldo Mac Conkey (CMC)**

Extracto de Cerebro de Ternera.....	12,5 g
Extracto de Corazón de Buey.....	5 g
Triptosa .....	10 g
Cloruro de Sodio .....	5 g
Fosfato Disódico .....	2,5 g
Agua Destilada .....	1000 ml

pH : 7,2 - 7,6

**- Caldo Müeller-Hinton (CMH) al 0,15%**

Infusión de carne.....	2 g
Hidrolizado de caseína.....	17,5 g
Almidón .....	1,5 g
Agar.....	1,5 g
Agua destilada c.s.p. ....	1000 ml

pH: 7,4

**- Caldo Selenito – Cistina (CS)**

Triptona .....	5 g
Fosfato disódico .....	10 g
Selenito ácido de sodio .....	4 g
Lactosa.....	4 g
L(-) cistina.....	0,01 g
Agua destilada.....	1000 rnl

pH: 7

**- Caldo Tetrionato Base (CT)**

Peptona.....	5 g
Sales biliares.....	1 g
CO <sub>3</sub> Ca.....	10 g
Tiosulfato de sodio.....	30 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 ml

pH: 8,4

Por cada 10 ml de medio base se añadieron 0,2 ml de solución iodo iodurada (5 g de ioduro de potasio más 6 g de iodo en 20 ml de agua destilada).

**- Caldo Trypticasa-Soya (CTS)**

Tripteína.....	17 g
Peptona de soya.....	3 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Fosfato dipotásico.....	2,5 g
Glucosa.....	2,5 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 ml

pH: 7,3

**- Pseudomonas Agar F**

Peptona de carne.....	10 g
Tripteína.....	10 g
Fosfato dipotásico.....	1,5 g
Sulfato de magnesio.....	1,5 g
Agar.....	15 g
Glicerol.....	10 ml
Agua destilada.....	1000 ml

pH : 7,2

**- Medio de Clark y Lubs (MR-VP)**

Peptona.....	7 g
Glucosa .....	5 g
Fosfato Dipotásico.....	5 g
Agua Destilada.....	1000 ml

pH : 6,7 - 7,1

**- Pseudomonas Agar P**

Peptona de gelatina .....	20 g
Cloruro de magnesio .....	1,4 g
Sulfato de potasio.....	10 g
Agar.....	15 g
Glicerol.....	10 ml
Agua destilada.....	1000 ml

pH : 7,2

**Reactivos**

**- Reactivo para Indol (Kovacs)**

Paradimetil-amino-benzaldehído.....	5 g
Alcohol Isoamílico .....	75 ml
Ácido Clorhídrico concentrado .....	25 ml

**- Reactivo para Rojo de Metilo**

Rojo de Metilo .....	0,1 g
Alcohol Etílico.....	65 ml
Agua Destilada.....	35 ml

**- Reactivos para Voges Proskauer (VP)**

Reactivo A:

Alfa-naftol .....	5 g
Alcohol Etílico Absoluto.....	100 ml

La solución debe conservarse al resguardo de la luz.

Reactivo B:

Hidróxido de Potasio ..... 40 g  
Agua Destilada..... 100 ml

2. Material vegetal

Para la extracción de los aceites esenciales se emplearon hojas verdes y talluelos de las especies vegetales: *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Salvia officinalis* L. (salvia) y *Thymus vulgaris* (tomillo)

2.1 Recolección del material vegetal

Las especies vegetales orégano, salvia y romero fueron cultivadas en el establecimiento Tres Arroyos en Villa de las Rosas, y tomillo en la localidad de Luyaba, provincia de Córdoba, Argentina. Las mismas fueron recolectadas y cedidas al laboratorio por el Ing. Jorge Daghero.

- Orégano: recolectado el 18 de Diciembre de 2.002. Estadío: 100 % de floración.
- Romero: recolectado el 27 de Abril de 2.003. Estadío: 0 % de floración.
- Salvia: recolectada el 23 de Octubre de 2.003. Estadío: 100% de floración.
- Tomillo: recolectado el 29 de Noviembre de 2.002. Estadío: 0 % de floración.

2.2 Obtención de aceites esenciales

Los aceites esenciales de orégano, romero, tomillo y salvia fueron obtenidos por hidrodestilación en el Departamento de Tecnología Química (Planta Piloto) de la Facultad de Ingeniería con la colaboración del Ing. Jorge Daghero, y en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la U.N.R.C.

El método de extracción por hidrodestilación se fundamenta en mezclar el material vegetal con agua dentro de un balón, calentar hasta ebullición y el vapor es recolectado y condensado para separar el líquido de la fracción oleosa (54).

Se llenó una columna extractora con 30 g de material vegetal triturado, depositado sobre una rejilla. En un balón de 1 litro de agua destilada se generó



calor hasta hacer ebullición el agua cuyos vapores (de una temperatura aproximada de 100 °C) atravesaron el lecho de la columna y arrastraron los componentes volátiles presentes en el vegetal. El vapor conteniendo los aceites esenciales fue condensado y por decantación, en virtud de la diferencia de densidad de los componentes de la mezcla agua y aceite, pudo separarse de los aceites esenciales. La metodología descrita responde a las especificaciones dadas por Bamba et al. (1993), Ciccio et al. (1999) y De Feo et al. (1998). La fracción oleosa de interés se conserva a -80 °C hasta el momento de su uso.

### 2.3 Composición química de los aceites esenciales

Una vez obtenidos, los aceites esenciales fueron analizados por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa. Se utilizó para ello un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Q-700 equipado con una columna capilar SE-30 (30 m x 0,25 mm, revestida con una capa film de 0,25 µm). Las condiciones analíticas fueron: la temperatura de horno varió de 40 °C a 230 °C a 2 °C/min; se usó como gas transportador helio a un flujo constante de 0,9 ml/min; se utilizó una fuente de poder de 70 eV. Los aceites esenciales fueron identificados por registros de espectrometría de masa almacenados en computadora utilizando los índices de retención como una rutina de pre-selección, y para la confirmación se procedió a la inspección visual del espectro de masa a partir de la literatura (21).

El análisis de la composición química fue realizado en colaboración con el Dr. Julio Zygadlo del Departamento Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de Córdoba.

## 3. Cepas Microbianas

### 3.1 Aislamiento e identificación de cepas microbianas

Se realizó el ensayo de actividad antibacteriana de los aceites esenciales sobre bacterias patógenas Gram-positivo y Gram-negativo aisladas de distintos alimentos y agua, utilizando medios selectivos y diferenciales. Los microorganismos se tipificaron por métodos microbiológicos convencionales en el Área de Microbiología de Alimentos, Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto según International Commission on Microbiological Specifications for Foods (41).

### 3.2 Conservación y propagación de cepas aisladas

Las cepas aisladas se repicaron en Caldo Tripticasa Soya (CTS) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las mismas se conservaron en Agar Tripticasa Soya (ATS) a una temperatura de 4 °C.

### 3.3 Preparación del inóculo microbiano

A partir de un cultivo microbiano sembrado en CTS e incubado a 37 °C durante 18 h, se realizaron diluciones factor diez hasta lograr una densidad microbiana de  $1 \times 10^6$  UFC/ml correspondiente a una lectura de densidad óptica (DO) 0,04 para una la longitud de onda de 620 nm.

## 4. Ensayos de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

El estudio de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales fue llevado a cabo siguiendo la técnica descrita por De Feo et al. (1998). Cada experiencia fue realizada por duplicado.

### 4.1 Determinación de actividad antibacteriana de los aceites esenciales por técnica de Difusión en Disco

En primera instancia, se realizó un relevamiento para observar la actividad antimicrobiana de cada aceite esencial sobre los microorganismos. Para ello, se utilizaron discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro, los cuales fueron embebidos con 10  $\mu$ l del aceite esencial a probar (puro). Luego, los discos se colocaron en placas de Petri conteniendo Agar Müller-Hinton (AMH) previamente sembradas con espátula de Drigalsky, con 200  $\mu$ l de inóculo microbiano ( $10^6$  bacterias/ml). Se las dejó 30 minutos a temperatura ambiente para permitir que el aceite esencial difunda uniformemente. Posteriormente, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h, y se midió la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Se realizó un control negativo con discos embebidos con 10  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO). Cada ensayo se realizó por duplicado (18).

### 4.2 Análisis de la concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales por técnica de Microdilución en Caldo

Las muestras de aceite esencial a ensayar se diluyeron factor dos en solución acuosa con agar al 0,15% (AA 0,15%). La densidad de cada aceite

esencial se consideró como 900  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , y fueron diluidos hasta llegar a una concentración de 1,75  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

En una microplaca de 96 pocillos, desde el pocillo 1 al 9, se colocaron 170  $\mu\text{l}$  del cultivo bacteriano (CB) en Caldo Müller-Hinton suplementado con agar al 0,15% (AA 0,15%), con una densidad apropiada incapaz de reducir la resazurina. Se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de cada dilución del aceite esencial. Se incubó durante 3 horas y 30 minutos a 37 °C y luego se agregó 10  $\mu\text{l}$  de una solución de resazurina al 0,01%. La microplaca se incubó nuevamente durante 2 h a 37 °C, determinando la CIM visualmente. Se incluyó un control positivo (pocillo 10) que consistió en 170  $\mu\text{l}$  del CB a probar con 20  $\mu\text{l}$  de AA 0,15% sin el aceite esencial, y un control negativo consistente en 170  $\mu\text{l}$  de CMH suplementado con 20  $\mu\text{l}$  del diluyente del aceite esencial (pocillo 11) (51).

La visualización se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos, a determinada concentración, de reducir la resazurina. El color azul indica inhibición del crecimiento (estado oxidado) y el rosado sin inhibición del crecimiento (estado reducido). Se considera CIM a la última dilución que visualmente muestra color azul. El control positivo se observa de color rosado, y el control negativo se observa de color azul. Cada ensayo se realizó por cuatuplicado (51).

Se define a la CIM como la menor concentración de aceite esencial capaz de inhibir el crecimiento microbiano (11).

#### 4.3 Determinación de la concentración bactericida mínima de los aceites esenciales

Para calcular la concentración bactericida mínima (CBM) se tomaron muestras a partir de la microplaca utilizadas en el ítem 4.2 Se inocularon 100  $\mu\text{l}$  de las últimas diluciones que presentaron color azul (CIM), en placas de AMH. Las mismas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Se sembraron placas con muestras (100  $\mu\text{l}$ ) de los pocillos 10 y 11 que corresponden a los controles positivo y negativo respectivamente. Cada ensayo se realizó por duplicado (30).

La CBM es la mínima concentración a la cual menos del 0,1% del inóculo inicial sobrevivió (44).

## 5. Determinación de asociaciones entre aceites esenciales

Se realizaron diluciones crecientes en base dos de cada aceite esencial a partir del valor de CIM obtenido con la técnica descrita en el punto 4.2. En las columnas de una microplaca se colocaron 10  $\mu$ l de las diluciones de un compuesto "A" y en las filas 10  $\mu$ l de las diluciones del compuesto "B", excepto en la primer columna y en la primer fila en donde se agregaron 20  $\mu$ l de las diluciones de cada aceite esencial puro de manera creciente a modo de control de CIM, respectivamente. Se agregaron 170  $\mu$ l de una suspensión bacteriana en CMH suplementado con agar al 0,15%, con una densidad apropiada incapaz de reducir la resazurina. Se incubó la microplaca durante 3 horas y 30 minutos a 37 °C y luego se agregaron 10  $\mu$ l de una solución de resazurina al 0,01%. Luego, se incubó nuevamente durante 2 h a 37 °C, obteniendo de manera visual los datos necesarios para poder determinar el índice de concentración inhibitoria fraccionaria (FIC) (22).

Para determinar el valor de FIC se utilizó la siguiente ecuación:

$$FIC = \frac{A}{CIM "A"} + \frac{B}{CIM "B"}$$

**A**= Concentración del compuesto A en la asociación inhibitoria mínima.

**B**= Concentración del compuesto B en la asociación inhibitoria mínima.

**CIM "A"** y **CIM "B"** son las concentraciones inhibitorias mínimas de los compuestos "A" y "B" determinadas en forma separada.

Los valores se interpretaron de la siguiente manera:

**FIC**  $\leq$  0,50: sinergismo total

0,50 < **FIC**  $\leq$  0,75: sinergismo parcial

0,75 < **FIC**  $\leq$  2: indiferencia

**FIC** > 2: antagonismo

Siguiendo esta metodología se determinaron las posibles actividades sinérgicas entre los aceites esenciales frente a los microorganismos aislados.

## 6. Elaboración del producto alimenticio

Se realizaron dos ensayos:

- a) El alimento, milanesa de soja, fue manufacturado con pasta de soja provista por productor local y envasado en planta elaboradora (Ensayo 1: Orégano1 (O1), Tomillo1 (T1).
- b) En segunda instancia, se elaboró el alimento en el laboratorio de Microbiología de Alimentos, a modo de control de producto alimenticio (Ensayo 2: Orégano2 (O2), Tomillo 2 (T2).

Se prepararon milanesas de soja en una proporción de aproximadamente de 5% de sal, 10% de ligante y 85% de pasta de soja, sin el agregado de aceites esenciales denominándose producto plano (MP), y con el agregado de aceites esenciales (MAE) en distintos porcentajes (0,5% y 1%) con el objeto de lograr productos con mayor aceptación y calidad microbiológica.

## 7. Análisis microbiológico del producto alimenticio

Se realizó el análisis microbiológico de las muestras de alimento recientemente elaboradas MP y MAE. Se utilizaron 50 g de muestra homogeneizadas en diluyente agua de peptona. Se realizaron diluciones decimales seriadas, siguiendo la metodología de la ICMSF, 1983.

Para el análisis microbiológico se utilizaron los siguientes marcadores:

- a. Recuento de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos viables, mesófilos, totales: se utilizó el método de recuento en placa de siembra por extensión en superficie en medio agar Nutritivo o agar para Recuento en Placa. Se incubaron las placas de Petri a 35 °C durante 24-48 h. Los resultados fueron expresados en unidades formadores de colonias por gramo de alimento (UFC/g) (41).
- b. Recuento de Coliformes Totales: por el método de Fermentación por Múltiples Tubos en el medio caldo MacConkey, a 35 °C durante 24-48 h. Los resultados fueron expresados como Número Más Probable por gramos de alimento (NMP/g) (41).
- c. Investigación de *Escherichia coli* en 10 g de muestra: se usó el medio de cultivo caldo MacConkey, a 35 °C durante 24-48 h. Los resultados se expresaron como ausencia o presencia del microorganismo (41).

- d. Investigación de *Salmonella* en 25 g de muestra (41).
- 1- Enriquecimiento No Selectivo: en caldo lactosado, a 35 °C durante 18-24 h
  - 2- Enriquecimiento Selectivo: en caldo Selenito-Costina y caldo Tetrionato, a 35 °C durante 24 h
  - 3- Siembra en placa en medios sólidos selectivos y diferenciales: en agar Bismuto-Sulfito y agar *Salmonella-Shigella*, a 35 °C durante 24-48 h
  - 4- Estudio de las características bioquímicas de las colonias sospechosas, en los medio adecuados.
  - 5- Análisis antigénico: se emplearán antisueros polivalentes somáticos OS-A y OS-B
- Los resultados se expresaron como ausencia o presencia del microorganismo.
- e. Recuento de *Staphylococcus aureus*: se utilizó el método de recuento en placa de siembra por extensión en superficie en el medio selectivo y diferencial Baird-Parker, a 35 °C durante 24-48-72 h. Los resultados fueron expresados en unidades formadores de colonias por gramo de alimento (UFC/g) (41).
- f. Recuento de *Bacillus cereus*: se utilizó el método de recuento en placa de siembra por extensión en superficie en el medio selectivo y diferencial agar Manitol-Yema de Huevo-Polimixina, a 35 °C durante 24-48 h. Los resultados fueron expresados en unidades formadores de colonias por gramo de alimento (UFC/g) (41).
- g. Recuento de microorganismos anaerobios sulfito-reductores: se utilizó el método de recuento en tubos Miller-Pricket con el medio de cultivo selectivo y diferencial agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina, a 35 °C durante 24-48 h. Los resultados fueron expresados en unidades formadores de colonias por gramo de alimento (UFC/g) (93).
- h. Recuento de Hongos y Levaduras: se utilizó el método de recuento en placa de siembra por extensión en superficie en medio Diclorán-Rosa de Bengala-Cloranfenicol, a 28 °C durante 5 días. Los resultados fueron expresados en unidades formadores de colonias por gramo de alimento (UFC/g) (41).





### 7.1 Condiciones de almacenamiento del producto alimenticio

Los productos fueron envasados en bolsas de polietileno de baja densidad (LDPE) (alta permeabilidad de oxígeno) con una velocidad de transmisión de O<sub>2</sub> de 7100 cm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.24 h<sup>-1</sup>. 1 atm a 23 °C y humedad relativa ambiente del 90%, en condiciones aeróbicas, y almacenados a distintos tiempos y temperaturas:

**Tabla 1. Condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento**

<b>Temperatura de almacenamiento</b>	<b>Muestreo microbiológico (días)</b>
25 °C	7, 14, 30
4 °C	7, 14, 30
-20 °C	30, 60, 90

El análisis microbiológico de MP y MAE fue realizado de acuerdo al ítem 7, según tabla 1. Las muestras se analizaron por duplicado para cada tratamiento.

---

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

---

---

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Material vegetal

#### 1.1 Recolección del material vegetal

✓ ***Origanum vulgare* (orégano):**

- Procedencia: Establecimiento Tres Arroyos, Villa de las Rosas, Córdoba.
- Fecha de extracción: 18 de diciembre del 2.002.
- Estadío: 100% floración.

✓ ***Rosmarinus officinalis* L. (romero):**

- Procedencia: Establecimiento Tres Arroyos, Villa de las Rosas, Córdoba.
- Fecha de extracción: 27 de abril del 2.004.
- Estadío: 0% floración.

✓ ***Salvia officinalis* L. (salvia):**

- Procedencia: Establecimiento Tres Arroyos, Villa de las Rosas, Córdoba.
- Fecha de extracción: 23 de octubre del 2.003.
- Estadío: 100% floración.

✓ ***Thymus vulgaris* (tomillo):**

- Procedencia: Luyaba, Córdoba.
- Fecha de extracción: 18 de diciembre del 2.002.
- Estadío: 100% de floración

#### 1.2 Obtención de aceites esenciales por hidrodestilación

Al realizar sucesivas destilaciones de los materiales vegetales se obtuvieron los siguientes rendimientos de aceites esenciales (AE):

✓ ***Origanum vulgare* (orégano):**

- Rendimiento: 0,39% (p/p, base húmeda).
- Humedad: 40%.
- Destilación a escala piloto: planta entera y húmeda.
- Destilación a pequeña escala (laboratorio): hojas secas.

- ✓ **Rosmarinus officinalis L. (romero):**
  - Rendimiento: 0,61% (p/p, base húmeda).
  - Destilación a escala piloto: planta entera y húmeda.
  
- ✓ **Salvia officinalis L. (salvia):**
  - Rendimiento: 0,18% (p/p, base húmeda).
  - Destilación a escala piloto: planta entera y húmeda.
  
- ✓ **Thymus vulgaris (tomillo):**
  - Rendimiento: 0,27% (p/p, base húmeda).
  - Destilación a escala piloto: planta entera y húmeda.
  - Destilación a pequeña escala (laboratorio): hojas y tallos secos.

### 1.3 Determinación de la composición química de los aceites esenciales

**Tabla 2. Composición química de los aceites esenciales de orégano, romero, salvia y tomillo**

Componente	Composición (%)			
	OREGANO	ROMERO	SALVIA	TOMILLO
$\alpha$ -pineno	-----	-----	5.2	2.8
Canfene	-----	-----	3.3	-----
Mirceno	-----	<b>22.0</b>	<b>6.1</b>	2.2
Limoneno	-----	0.6	<b>6.6</b>	0.9
1,8-cineol	-----	<b>31.0</b>	<b>23.8</b>	1.2
<i>p</i> -cimeno	-----	2.6	4.4	<b>19.8</b>
Alcanfor	-----	<b>23.5</b>	<b>39.8</b>	-----
A-terpineno	<b>12.0</b>	-----	-----	<b>4.2</b>
Terpinen-4-ol	<b>52.1</b>	-----	4.1	1.1
$\alpha$ -terpineol	<b>8.0</b>	-----	-----	1.8
Timol	<b>25.1</b>	-----	-----	<b>44.1</b>
Carvacrol	-----	-----	-----	<b>8.9</b>
Otros compuestos	2.8	20.3	6.7	13
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

En concordancia con Marino et al. (2001), el aceite esencial de orégano utilizado en nuestro estudio no presentó el compuesto fenólico carvacrol, y sus principales constituyentes son terpinen-4-ol (52,1%), timol (25,1%),  $\alpha$ -terpineno (12%) y  $\alpha$ -terpineol (8%), los cuales constituyeron el 97.2% del total del aceite (tabla 2). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Daferera et al. (2000), donde carvacrol fue determinado como uno de los constituyentes mayoritarios. Sivropoulou et al. (1996), ensayaron tres muestras de aceites esenciales de

orégano, uno de ellos contenía una mínima concentración de carvacrol (0,43%), mientras que los otros dos aceites contenían altas cantidades de este terpeno (62,44% y 79,58%).

La composición química de los aceites esenciales de romero y salvia se caracterizó por la presencia predominante de compuestos mayoritarios como 1,8-cineol, el cual constituye el 31% y el 23,8% del total de los aceites respectivamente, y alcanfor con un 23,5% para romero y 39,8% para salvia. En el aceite esencial de romero también se detectaron los componentes mirceno (22%), *p*-cimeno (2,6%) y limoneno (0,6%). Para el aceite esencial de salvia se detectó limoneno (6,6%), mirceno (6,1%),  $\alpha$ -pineno (5,2%), canfene (3,3%), *p*-cimeno (4,4%) y terpinen-4-ol (4,1%) (tabla 2). Resultados similares para ambos aceites esenciales fueron encontrados en el trabajo realizado por Daferera et al. (2000), y para el aceite esencial de salvia en el trabajo efectuado por Marino et al. (2001).

El aceite esencial de tomillo se caracteriza por la presencia de los compuestos hidrocarbonados  $\alpha$ -terpineno (4,2%), *p*-cimeno (19,8%) y de los compuestos fenólicos carvacrol (8,9%) y timol (44,1%), los cuales constituyen el 77% del total del aceite (tabla 2). Se han encontrado porcentajes similares de estos compuestos en trabajos realizados por Cosentino et al. (1999), Marino et al. (1999) y Daferera et al. (2000)

La variabilidad en la composición química y en la concentración relativa de los constituyentes individuales de los aceites esenciales de una planta en particular depende de condiciones climáticas, estacionales y geográficas, periodo de cosecha, genética de la planta, proceso de secado, técnica de destilado utilizada y partes de la planta destiladas. La actividad antibacteriana de estos compuestos depende del tipo, composición y concentración de la especia o del aceite esencial, el tipo y concentración del microorganismo sobre el cual actúa, la composición del sustrato, y el procesamiento y las condiciones de almacenamiento del producto (7, 11, 43, 60).



2. Cepas microbianas

2. 1 Aislamiento e identificación de cepas microbianas

A partir de muestras de distintos alimentos se aislaron los microorganismos a ensayar utilizando medios selectivos y diferenciales. Estos microorganismos se tipificaron por métodos convencionales en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Fco.-Qcas. y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto (tabla 3).

Tabla 3. Especies bacterianas aisladas de distintos alimentos

Microorganismo	Origen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agua de Pozo (AP)
<i>Salmonella sp.</i>	Harina de Carne (HC)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Hamburguesa de Carne Vacuna (HV)
<i>Escherichia coli</i>	Agua de Pozo (AP)
<i>Escherichia coli</i>	Tripas Naturales (TN)
<i>Enterobacter sp.</i>	Aguas residuales (AR)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Res seca bovina (RB)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leche de soja (LS)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cuarto Trasero Liebre Congelada (LC)
<i>Bacillus cereus</i>	Orégano (Or)

A modo de resumen, las cepas microbianas provenían de los siguientes orígenes: de agua tres cepas, de harina de carne una cepa, al igual que para hamburguesa de carne vacuna, tripas naturales, res seca bovina, leche de soja, carne de liebre y orégano.

### 3. Ensayos de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

#### 3.1 Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales por técnica de difusión en disco

Para la determinación de la actividad antimicrobiana de las distintas muestras oleosas, se realizó un relevamiento de todas las cepas mencionadas en la tabla 3, utilizando la técnica de difusión en disco siguiendo la metodología de De Feo et al. (1998).

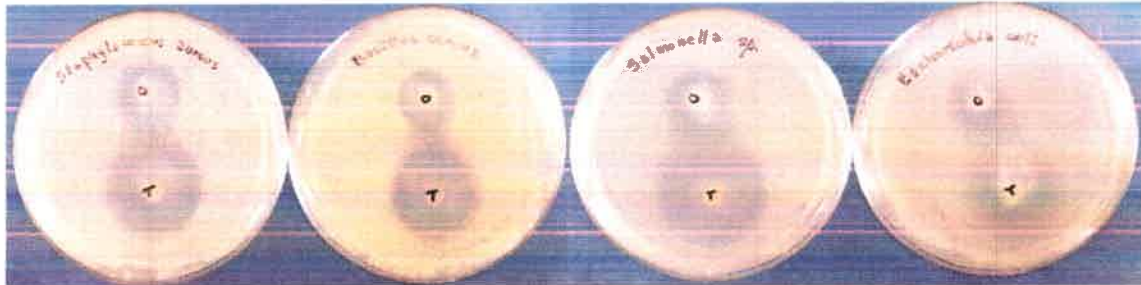
**Tabla 4. Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales sobre cepas bacterianas aisladas de alimentos por técnica de Difusión en Disco (10µl/disco)**

Microorganismos	Aceite esencial			
	Halos de Inhibición en cm			
	Orégano	Romero	Salvia	Tomillo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AP)	NI	NI	NI	NI
<i>Salmonella</i> sp. (HC)	2,1	1,2	NI	3,3
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (HV)	2,5	1,2	0,9	3,5
<i>Escherichia coli</i> (AP)	2,5	1	NI	3,6
<i>Escherichia coli</i> (TN)	2,5	1,5	1,3	3,5
<i>Enterobacter</i> sp. (AR)	1,3	0,85	NI	2,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (RB)	2,5	1,2	1,5	3,6
<i>Staphylococcus aureus</i> (LS)	1,5	1,1	1,3	2,3
<i>Staphylococcus aureus</i> (LC)	2	2,4	1,4	3,1
<i>Bacillus cereus</i> (Or)	1,9	1,6	1,2	3

NI= No Inhibida

Todas las especies bacterianas, con excepción de *P.aeruginosa* (AP), fueron inhibidas por las muestras oleosas de orégano, romero y tomillo (tabla 4). La resistencia de *Ps.aeruginosa* (AP) fue también observada en experiencias realizadas por otros autores (15, 77). El aceite esencial de tomillo mostró la mejor actividad antimicrobiana ya que sus halos de inhibición presentaron un diámetro que varió entre 2,3 cm sobre *S.aureus* (LS) y 3,6 cm sobre *E.coli* (AP) y *S.aureus* (RB). Seguido del aceite esencial de orégano, que presentó halos de inhibición de 1,3 cm para *Enterobacter* sp. (AR) y 2,5 cm para *E.coli* O157:H7 (HV), *E. coli* (AP), *E. coli* (AN) y *S.aureus* (RB) (fig. 8). El aceite esencial de romero inhibió a *Enterobacter* sp. (AR) con halos de inhibición de 0,85 cm y de 2,4 cm sobre

*S.aureus* (LC). El menor efecto fue observado con la muestra oleosa extraída de salvia, la cual no tuvo acción sobre *Ps.aeruginosa* (AP), *Salmonella* sp. (HC), *E. coli* (AP) y *Enterobacter* sp. (AR). Estos datos coinciden con las experiencias realizadas por Marino et al. (2001) que observaron un efecto antimicrobiano pobre del aceite esencial de salvia sobre bacterias Gram-positivo y Gram-negativo.



O= Orégano; T= Tomillo

**Figura 8. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de orégano y tomillo por método de difusión en disco sobre *S.aureus*, *B.cereus*, *Salmonella* sp. y *E.coli*.**

Distintos trabajos demostraron que cepas Gram-negativo tales como *E.coli*, *E.coli* O157:H7 y *Salmonella typhimurium* fueron menos sensibles que cepas Gram-positivo como *S.aureus* y *L.monocytogenes* cuando fueron probadas con diversas muestras de aceite esencial de orégano, romero, salvia y tomillo (15, 32, 61, 79). Estos resultados difieren con los obtenidos en este estudio, ya que estos cuatro aceites esenciales ejercieron un efecto inhibitorio similar sobre todas las cepas bacterianas probadas, y en algunos casos las cepas Gram-negativo eran más sensibles que las Gram-positivo.

Varios autores sustentan que las bacterias Gram-negativo son menos sensibles que las Gram-positivo a los compuestos antimicrobianos encontrados en las especias debido en parte a la gran complejidad de su pared celular, la cual esta compuesta por peptidoglicano y una capa adicional denominada membrana externa constituida por fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos, en contraste con el complejo péptidoglicano/ácidos teicoicos presente en las bacterias Gram-positivo. Sin embargo, hay variaciones en el grado de inhibición dentro de las bacterias Gram-negativa (50, 59).

Si bien es posible que las diferencias estructurales en la superficie celular bacteriana puedan contribuir a la resistencia o sensibilidad a los aceites esenciales, las diferencias metabólicas también pueden ser importantes. Entre las

bacterias Gram-negativo, las *Pseudomonas* muestran una mayor resistencia a estos antimicrobianos. Esta especie bacteriana es frecuentemente responsable del deterioro de los alimentos almacenados a bajas temperaturas, y se ha determinado por diversos estudios que son necesarias altas concentraciones de aceites esenciales y/o sus componentes, en combinación con distintos métodos de conservación de alimentos para ejercer un efecto bacteriostático o bactericida sobre este microorganismo (35).

Los valores de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos utilizando los distintos métodos existentes están influenciados por la composición del aceite esencial probado, el microorganismo (cepa de colección o aislada de diferentes fuentes), temperatura y tiempo de incubación, concentración y edad del inóculo. Cuando se aplica el método de difusión por discos de papel, la inhibición depende de la capacidad del aceite esencial para difundir uniformemente en la superficie del agar y de los vapores liberados por el aceite sobre la bacteria (44, 59).

### 3.2 Análisis de la concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales por técnica de Microdilución en Caldo

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), por la técnica de microdilución en caldo, de los aceites esenciales con la mejor actividad antimicrobiana y de más amplio espectro tales como orégano, tomillo y romero. Para esta determinación, se eligió la cepa bacteriana sobre la cual los aceites esenciales presentaron la mejor actividad inhibitoria. Los resultados se observan en la tabla 5.

**Tabla 5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales de orégano, romero y tomillo por técnica de microdilución en caldo ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )**

Microorganismo	CIM de aceite esencial		
	Orégano	Romero	Tomillo
<i>Salmonella sp.</i> (HC)	56,25	225	28,12
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (HV)	56,25	225	28,12
<i>Escherichia coli</i> (TN)	112,5	225	28,12
<i>Staphylococcus aureus</i> (LC)	56,25	112,5	28,12
<i>Bacillus cereus</i> (Or)	56,25	112,5	28,12



Se destaca la CIM obtenida con el aceite esencial de tomillo que fue de 28,12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  sobre todos los microorganismos ensayados (fig. 9). Para orégano se obtuvo una CIM de 56,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  sobre *S.aureus* (LC), *B.cereus* (Or), *Salmonella* sp. (HC) y *E.coli* O157:H7 (HV), y de 112,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  sobre *E.coli* (TN) (fig. 10). La CIM obtenida para romero fue de 225  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  frente a *E.coli* (TN), *Salmonella* sp. (HC) y *E.coli* O157:H7 (HV), y de 112,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  frente a *B.cereus* (Or) y *S.aureus* (LC).

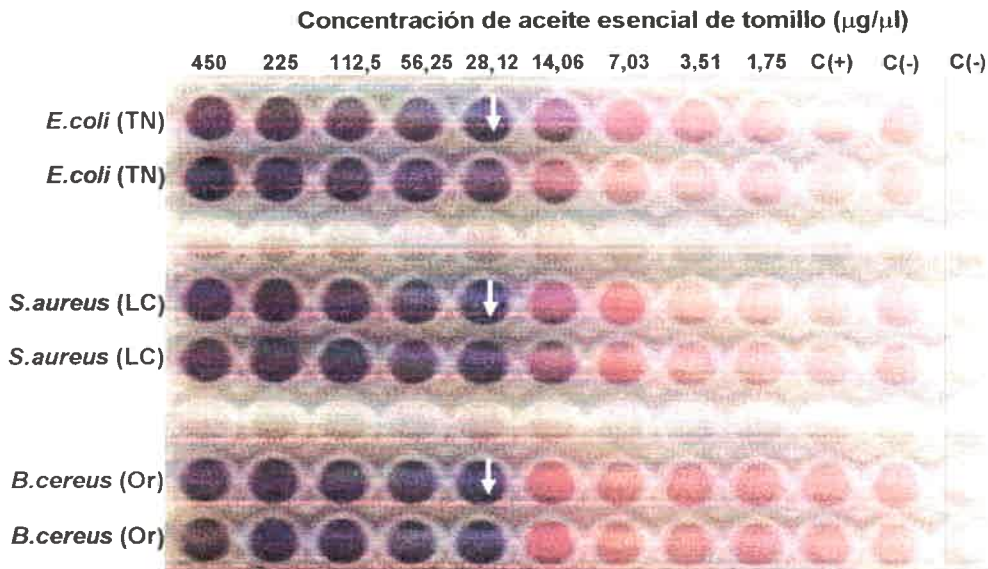


Figura 9. Concentración inhibitoria mínima de aceite esencial de tomillo sobre *E.coli* (TN), *S.aureus* (LC) y *B.cereus* (Or)

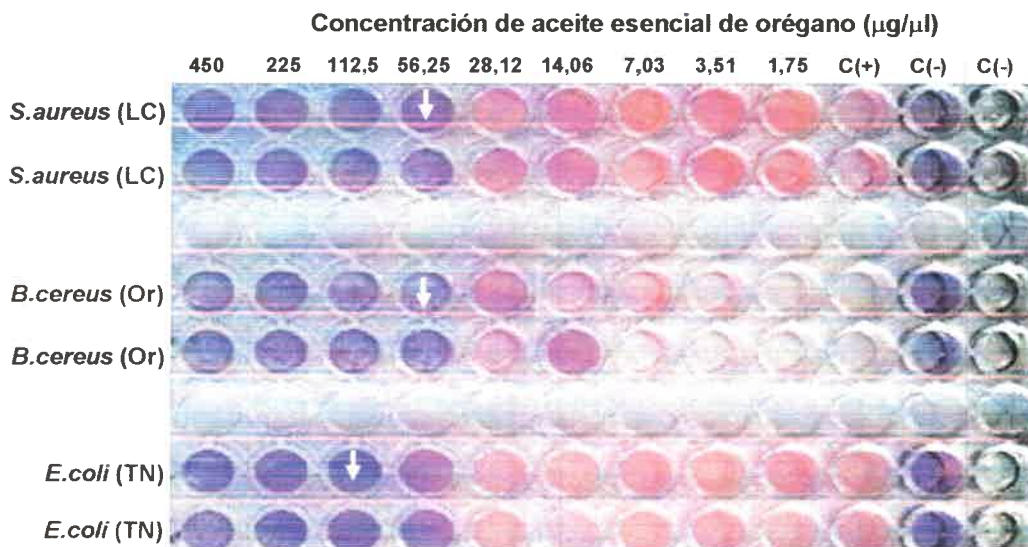


Figura 10. Concentración inhibitoria mínima de aceite esencial de orégano sobre *S.aureus* (LC), *B.cereus* (Or) y *E.coli* (TN).



A partir de estos resultados se puede determinar que los aceites esenciales de orégano y tomillo poseen una fuerte actividad antimicrobiana frente a distintos microorganismos Gram-positivo y Gram-negativo, en concordancia con resultados obtenidos por Moreira et al. (2005) y Oussalah et al. (2006), lo que permitiría la utilización de estas muestras oleosas como conservantes naturales de alimentos, pudiendo prevenir el crecimiento de patógenos alimentarios o de microorganismos de alteración (7).

La elevada concentración de timol (44,1%) y una moderada concentración de carvacrol (8,9%) en el aceite esencial de tomillo utilizado en este estudio, serían los responsables de la alta actividad antimicrobiana de este aceite. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Cosentino et al. (1999), donde varias muestras de aceite esencial de tomillo presentaron una elevada actividad antimicrobiana sobre una gran variedad de cepas gram-positivo y gram-negativo, la cual estaría dada por una importante concentración de los componentes fenólicos timol y carvacrol.

Se ha demostrado que el timol inhibe el crecimiento y la producción de toxinas de hongos micotoxigénicos, y además que el carvacrol inhibe completamente el crecimiento micelial de *Rhizopus* spp. en una mínima cantidad (5 $\mu$ l) (9).

Los monoterpenos  $\gamma$ -terpinene y  $p$ -cymene son los precursores biológicos de los terpenos fenólicos timol y carvacrol, los cuales están presentes generalmente en cantidades importantes en los aceites esenciales de orégano y tomillo. Estos terpenos tienen buena actividad antimicrobiana, razón por la cual se podría atribuir la actividad biológica del aceite esencial completo (9, 20).

Sivropoulou et al. (1996), determinaron que un aceite esencial de orégano que contenía un muy bajo porcentaje de carvacrol (0,43%) y alto contenido de timol (37,9%) presentaba la mejor actividad antimicrobiana frente a cepas Gram-positivo y Gram-negativo. En concordancia con estos resultados, el aceite esencial de orégano utilizado en este estudio presentó una buena actividad antimicrobiana frente a todas las cepas ensayadas, aunque no contenía el compuesto fenólico carvacrol. Estos resultados pueden sugerir que esta importante actividad antimicrobiana se debe al alto porcentaje de terpinen-4-ol (52,1%), de timol (25,1%) y, además de  $\alpha$ -terpineno (12%).

Los compuestos fenólicos tales como carvacrol, timol, entre otros, son capaces de penetrar en la membrana celular microbiana y llegar hasta el citoplasma de la célula, donde interactúan con mecanismos metabólicos celulares. Una interrupción en la membrana citoplasmática, altera la fuerza protón motriz y se produce la coagulación del contenido citoplasmático, constituyendo estos algunos de los mecanismos involucrados en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano. La utilización de este aceite esencial como un compuesto antimicrobiano alternativo potencial para ser aplicado en la conservación de alimentos es posible debido a que está considerado toxicológicamente seguro (81).

El aceite esencial de romero utilizado en este estudio tiene un alto contenido en 1,8-cineol, alcanfor y mirceno. Un estudio realizado por Yesil Celiktas et al. (2007) con aceites esenciales de romero de distintos lugares y cosechados en diferentes épocas del año, reveló una moderada actividad antimicrobiana, siendo las bacterias más sensibles *Enterobacter feacalis* y *Proteus vulgaris*. Existe variación en su actividad biológica dado a las diferentes composiciones químicas de su aceite.

Según Holley & Patel (2005), en un estudio se determinó que el aceite esencial de romero y sus componentes mayoritarios ejercían una moderada actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram-negativo (*E.coli* y *Serratia marcescens*). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en este estudio, ya que el aceite de romero presentó una actividad menor en relación a las muestras de orégano y tomillo.

Altas concentraciones de aceite esencial de tomillo ejercen un fuerte efecto inhibitorio sobre el crecimiento de hongos contaminantes de pan de centeno, mientras que los aceites esenciales de salvia y romero fueron pobres inhibidores (83).

Se ha demostrado que bacterias Gram-positivo no formadoras de esporas como *S.aureus* y *L.monocytogenes*, formadoras de esporas como *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes* y *Clostridium perfringens*, bacterias Gram-negativo como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Aeromonas hydrophila*, y hongos y levaduras tales como *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizopus* sp. y *Mucor* sp. han sido afectados por una amplia variedad de aceites esenciales, entre ellos los

de orégano, romero y tomillo (entre otros), ejerciendo un efecto inhibitorio importante y un significativo retardo de su crecimiento (59, 64).

### 3.3 Determinación de la concentración bactericida mínima de los aceites esenciales

A partir de la determinación de la CIM por medio de la técnica de microdilución en caldo, se realizó la determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) de los aceites esenciales de, orégano, romero y tomillo (tabla 6).

**Tabla 6. Determinación de la concentración bactericida mínima de los aceites esenciales de orégano, romero y tomillo, por técnica de microdilución en caldo**

Microorganismo	CBM de aceite esencial ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )		
	Orégano	Romero	Tomillo
<i>Salmonella sp.</i> (HC)	450	B	56,25
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (HV)	112,5	B	56,25
<i>Escherichia coli</i> (TN)	B	B	56,25
<i>Staphylococcus aureus</i> (LC)	225	B	B
<i>Bacillus cereus</i> (Or)	B	B	B

B= Bacteriostático

Para tomillo se obtuvo una CBM de 56,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  sobre *Salmonella sp.* (HC), *E.coli* (TN) y *E.coli* O157:H7 (HV). Este aceite esencial no tuvo actividad bactericida frente a las bacterias Gram-positivo *S.aureus* (LC) y *B.cereus* (Or).

Para orégano se obtuvieron valores de CBM de 225  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  sobre *S.aureus* (LC), 450  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  sobre *Salmonella sp.* (HC) y 112,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  sobre *E.coli* O157:H7 (HV). Frente a *E.coli* (TN) y *B.cereus* (Or) este aceite esencial fue bacteriostático.

El aceite esencial de romero no tuvo actividad bactericida frente a ninguna de los microorganismos ensayados.

La actividad bactericida del aceite esencial de tomillo fue mayor a la del aceite esencial de orégano, ya que todas las todas las cepas Gram-negativo probadas fueron afectadas a una baja concentración de aceite (56,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), sugiriendo que esta fuerte actividad del aceite esencial de tomillo estaría sujeta al alto porcentaje de timol y a la moderada proporción de carvacrol en su composición química. Estos resultados también coinciden con los obtenidos por Cosentino et al. (1999).

Algunos estudios han encontrado un fuerte efecto cida (eliminación total del inóculo microbiano inicial) de extractos e hidrodestilados de *O. vulgare* después de tres días de interacción. El aceite esencial de *O. vulgare* es rico en compuestos fenólicos como timol y carvacrol, los cuales serían los responsables de su alta actividad antimicrobiana (81). Carvacrol posee efecto bactericida sobre *Salmonella* en trozos de pescado almacenados a 4 °C e inhibe la producción de toxina de *B.cereus* en sopa (4).

Un estudio realizado con *E.coli* O157:H7 demostró que los aceites esenciales de orégano y tomillo poseen características significativas bactericidas in vitro en un amplio rango de temperatura otorgando seguridad al alimento por la eliminación total o parcial de este microorganismo (12).

Varias investigaciones demostraron que los aceites esenciales de orégano y tomillo tienen una actividad antibacteriana importante sobre *Salmonella typhimurium*, *E.coli*, *L.monocytogenes*, *S.aureus*, *Cl.perfringens*, *C.botulinum* y un fuerte efecto bactericida sobre *Campylobacter jejuni*, *E.coli* O157:H7, *L.monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. La actividad antibacteriana de ambos aceites esenciales puede estar relacionada a la concentración y naturaleza del contenido terpénico de cada uno de estos aceites, a los grupos funcionales, a la configuración estructural de los componentes y a su posible interacción sinérgica (27, 57, 79).

#### 4. Determinación de asociaciones entre aceites esenciales

Se determinaron las asociaciones entre los aceites esenciales de tomillo, orégano, y romero sobre una cepa Gram-positivo, *S.aureus* (LC) y una cepa Gram-negativo, *E.coli* (TN) (tabla 7).

**Tabla 7. Asociaciones entre aceites esenciales de orégano, romero y tomillo por técnica de microdilución en caldo**

Combinación de AE	Cepa bacteriana	
	<i>E.coli</i> (TN)	<i>S.aureus</i> (LC)
Orégano – Tomillo	Antagonismo	Antagonismo
Orégano – Romero	Antagonismo	Antagonismo
Tomillo – Romero	Antagonismo	Antagonismo





En todos los casos se determinó una FIC >2, por lo que los aceites esenciales ensayados se comportan antagónicamente sobre las bacterias Gram-positivo y Gram-negativo probadas (fig. 12 y 13).



Figura 12. Antagonismo entre aceites esenciales de orégano y tomillo sobre *E.coli*.

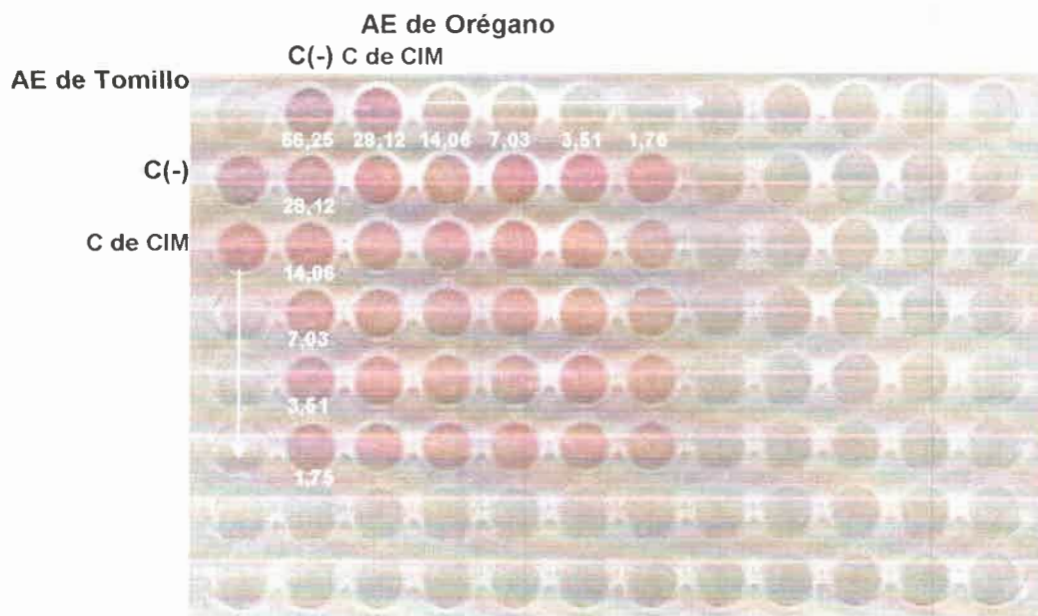


Figura 13. Antagonismo entre aceites esenciales de orégano y tomillo sobre *S.aureus*

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está condicionada a la configuración química de sus componentes, a las cantidades en las que están presentes en el aceite esencial y a las interacciones entre ellos. Múltiples

compuestos activos presentes en bajas concentraciones pueden interactuar antagónica, aditiva o sinérgicamente (19, 23, 44, 53, 59).

Fyfe et al. (1998), demostraron el primer estudio de inhibición sinérgica por combinaciones de aceites esenciales y derivados del ácido benzoico frente a dos patógenos alimentarios, *L.monocytogenes* y *S.enteritidis*.

Varias investigaciones demostraron que la combinación entre distintas concentraciones de aceites esenciales y distintos métodos de conservación de alimentos tiene un efecto sinérgico sobre la inhibición de importantes patógenos alimentarios como *L.monocytogenes* y *S.enteritidis*, y como consecuencia de ello, se extendió la vida útil de distintos alimentos, como carne de pescado y carne vacuna (31, 72, 77, 86, 89).

Sin embargo, nuestros resultados demostraron efecto antagónico en las distintas combinaciones ensayadas sobre *S.aureus* y *E.coli*.

#### 5. Análisis microbiológico del producto alimenticio almacenado

El producto alimenticio recién elaborado fue envasado en bolsas de polietileno de baja densidad (alta permeabilidad de oxígeno) y almacenado a distintos tiempos y temperaturas. Se analizó una muestra por duplicado al inicio de la experiencia, tomando este punto como tiempo 0, la cual representa la muestra control en todos los tiempos y temperaturas utilizados.

Fueron adicionados a alimentos aceites esenciales de orégano y tomillo, los que presentaron la mejor actividad antimicrobiana sobre los microorganismos probados.

Las experiencias fueron realizadas por duplicado y los resultados obtenidos fueron promediados.

#### 5.1 Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de orégano – Ensayo N° 1

Se analizó microbiológicamente el producto alimenticio manufacturado con pasta de soja provista por productor local y envasado en planta elaboradora, según consta en inciso **6.b** de materiales y métodos.

Las condiciones de almacenamiento fueron: 25 °C y 4 °C, a distintos tiempos: 7 y 15 días; -20 °C a 30, 60 y 90 días. Los productos sin aceite esencial (MP) y con el agregado del aceite esencial al 0,5% y 1% (MAE 0,5% y MAE 1%)



fueron procesados para realizar el recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales (RAT), recuento de hongos y levaduras (H y L) y recuento de bacterias coliformes totales (CT), según inciso 7. de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se observan en la tabla 8.

Se realizó la búsqueda para cada muestra de: ausencia o presencia de *E.coli*, ausencia o presencia de *Salmonella* sp., recuento de *S.aureus*, recuento de *B.cereus* y recuento de microorganismos anaerobios sulfito-reductores, según inciso 7. de materiales y métodos. En ninguno de las muestras procesadas se detectó la presencia de patógenos alimentarios como *E.coli*, *Salmonella* sp., *B.cereus*, *S.aureus* y microorganismos anaerobios sulfito reductores, a los tiempos y temperaturas ensayadas.

**Tabla 8. Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de orégano – Ensayo N° 1**

Ensayo	Temp. (°C)	Tiempo (días)	RAT S/AE	RAT 0,5%AE	RAT 1%AE	H y L S/AE	H y L 0,5%AE	H y L 1%AE	CT S/AE	CT 0,5%AE	CT 1%AE	
O1	25	0	7x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>3</sup>	5,5x10 <sup>2</sup>	5,5x10 <sup>2</sup>	5,5x10 <sup>2</sup>	14,5	14,5	14,5	
		7	1,5x10 <sup>9</sup>	3,5x10 <sup>7</sup>	4x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>8</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>	9,2x10 <sup>7</sup>	2,4x10 <sup>3</sup>	2,4x10 <sup>3</sup>	2,4x10 <sup>3</sup>	
		15	4,7x10 <sup>10</sup>	1,4x10 <sup>10</sup>	1,6x10 <sup>10</sup>	1,4x10 <sup>10</sup>	1,2x10 <sup>10</sup>	1,1x10 <sup>10</sup>	2,4x10 <sup>8</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>	5,6x10 <sup>5</sup>	
	4	0	7x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>3</sup>	5,5x10 <sup>2</sup>	5,5x10 <sup>2</sup>	5,5x10 <sup>2</sup>	14,5	14,5	14,5	
		7	8x10 <sup>7</sup>	7x10 <sup>6</sup>	6x10 <sup>5</sup>	5,5x10 <sup>7</sup>	1,8x10 <sup>5</sup>	1,9x10 <sup>7</sup>	6x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	
		15	3,3x10 <sup>10</sup>	2,9x10 <sup>10</sup>	2,3x10 <sup>10</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>	3x10 <sup>9</sup>	4,9x10 <sup>9</sup>	2,4x10 <sup>6</sup>	2,4x10 <sup>6</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>	
	-20	0	7x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>3</sup>	5,5x10 <sup>2</sup>	5,5x10 <sup>2</sup>	5,5x10 <sup>2</sup>	14,5	14,5	14,5	
		30	7x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	S/D	S/D	6x10 <sup>2</sup>	11	11	
		60	1,5x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	S/D	S/D	7	9	7	
			90	1,3x10 <sup>3</sup>	3,3x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>3</sup>	S/D	S/D	15	7	7

S/D = Sin Desarrollo

O1= Orégano 1: ensayo realizado con milanesa de soja manufacturada con pasta de soja provista por productor local y envasada en planta elaboradora

RAT= recuento de microorganismos aerobios, mesófilos, viables, totales (UFC/g).

H y L= recuento de hongos y levaduras (UFC/g).

CT= recuento de coliformes totales (UFC/g).

## 5.2 Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de orégano – Ensayo N° 2

Se realizó el análisis microbiológico del producto alimenticio elaborado y envasado en el laboratorio según consta en inciso **6.b** de materiales y métodos.

Las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento fueron idénticas al ensayo N° 1. Los productos sin el aceite esencial (MP) y con el agregado del aceite esencial al 0,5% y 1% (MAE 0,5% y MAE 1%) fueron procesados para realizar el recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales (RAT), recuento de hongos y levaduras (H y L) y recuento de bacterias coliformes totales (CT), según inciso **7.** de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se observan en la tabla 9.

Se realizó la búsqueda para cada muestra de: ausencia o presencia de *E.coli*, ausencia o presencia de *Salmonella* sp., recuento de *S.aureus*, recuento de *B.cereus* y recuento de microorganismos anaerobios sulfito-reductores, según inciso **7.** de materiales y métodos. En ninguno de las muestras procesadas se detectó la presencia de patógenos alimentarios como *E.coli*, *Salmonella* sp., *B.cereus*, *S.aureus* y microorganismos anaerobios sulfito reductores, a los tiempos y temperaturas ensayadas.

**Tabla 9. Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de orégano – Ensayo N° 2**

Ensayo	Temp. (°C)	Tiempo (días)	RAT S/AE	RAT 0,5%AE	RAT 1%AE	H y L S/AE	H y L 0,5%AE	H y L 1%AE	CT S/AE	CT 0,5%AE	CT 1%AE	
O2	25	0	6,8x10 <sup>3</sup>	6,8x10 <sup>3</sup>	6,8x10 <sup>3</sup>	S/D	S/D	S/D	1,1x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	
		7	8x10 <sup>8</sup>	7x10 <sup>8</sup>	7x10 <sup>8</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	1,7x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	
		15	1,6x10 <sup>10</sup>	6x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>9</sup>	9x10 <sup>6</sup>	3,2x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>	
	4	0	6,8x10 <sup>3</sup>	6,8x10 <sup>3</sup>	6,8x10 <sup>3</sup>	S/D	S/D	S/D	1,1x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	
		7	6,5x10 <sup>8</sup>	6,5x10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>8</sup>	S/D	S/D	S/D	5,5x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>2</sup>	
		15	5x10 <sup>10</sup>	1,9x10 <sup>10</sup>	1,2x10 <sup>10</sup>	6,8x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>	7x10 <sup>4</sup>	
	-20	0	6,8x10 <sup>3</sup>	6,8x10 <sup>3</sup>	6,8x10 <sup>3</sup>	S/D	S/D	S/D	1,1x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	
		30	1,8x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>2</sup>	2,8x10 <sup>2</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>	26	68	5,5	
		60	2x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	4x10 <sup>3</sup>	8x10 <sup>2</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>	2,8x10 <sup>2</sup>	28	100	9	
			90	2,5x10 <sup>4</sup>	3,3x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	3,2x10 <sup>2</sup>	3,2x10 <sup>2</sup>	2,2x10 <sup>2</sup>	33	105	9

S/D = Sin Desarrollo

O2= Orégano 2: ensayo realizado con milanesa de soja elaborada y envasada en laboratorio

RAT= recuento de microorganismos aerobios, mesófilos, viables, totales (UFC/g).

H y L= recuento de hongos y levaduras (UFC/g).

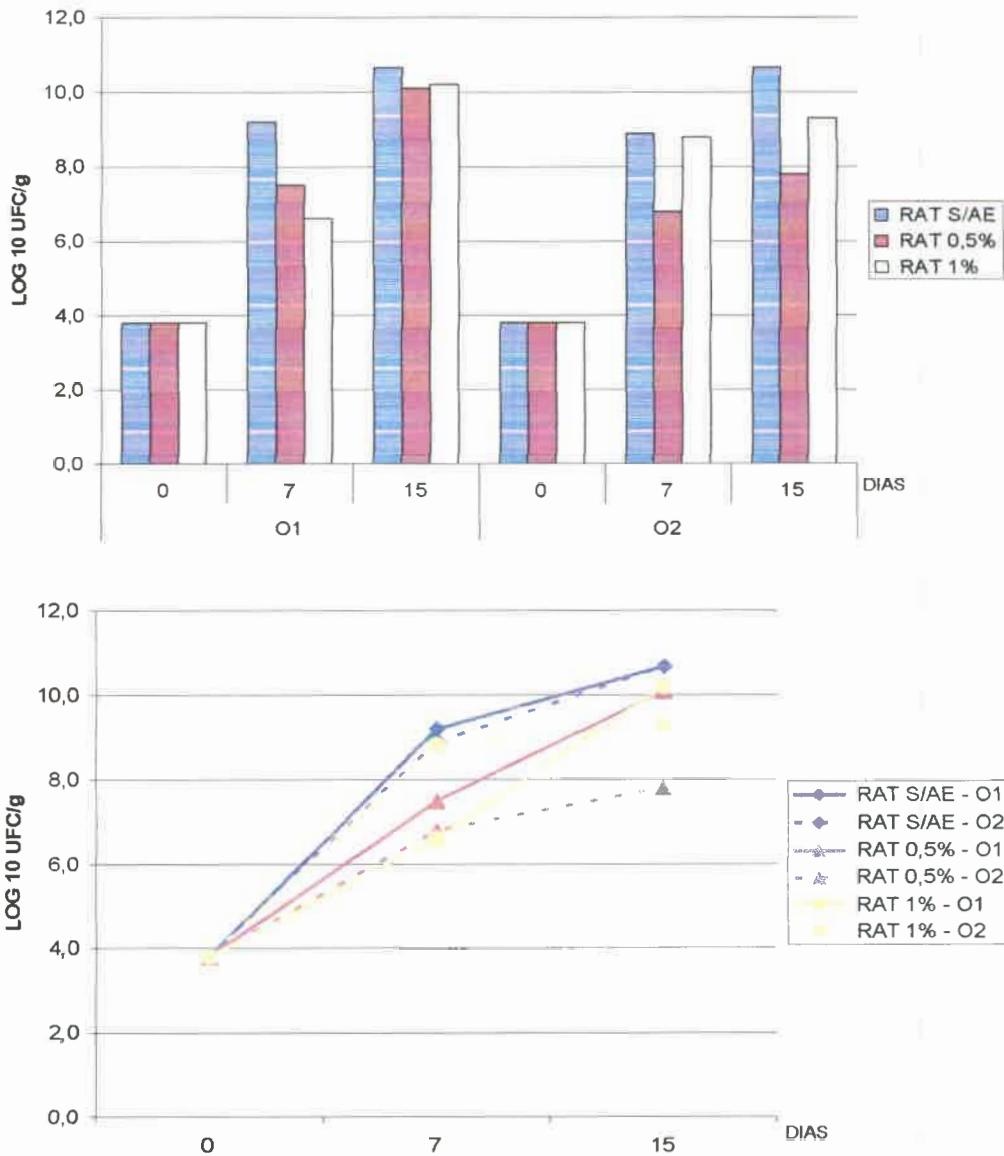
CT= recuento de coliformes totales (NMP/g).

### 5.3 Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales entre ensayos 1 y 2 con aceite esencial de orégano

#### 5.3.1 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a 25 °C

Como puede observarse en las tablas 8 y 9, la carga inicial de microorganismos aerobios totales de las muestras analizadas en ambos ensayos es la misma. El recuento de aerobios totales se incrementó en las MP y las MAE 0,5% y 1%, en los distintos tiempos a la temperatura de almacenamiento de 25 °C (fig. 14). Se puede deducir que no hay un efecto inhibitorio marcado del aceite esencial sobre microorganismos aerobios totales a ninguna de las concentraciones ensayadas. Cabe destacar que a los 7 días, en los dos ensayos

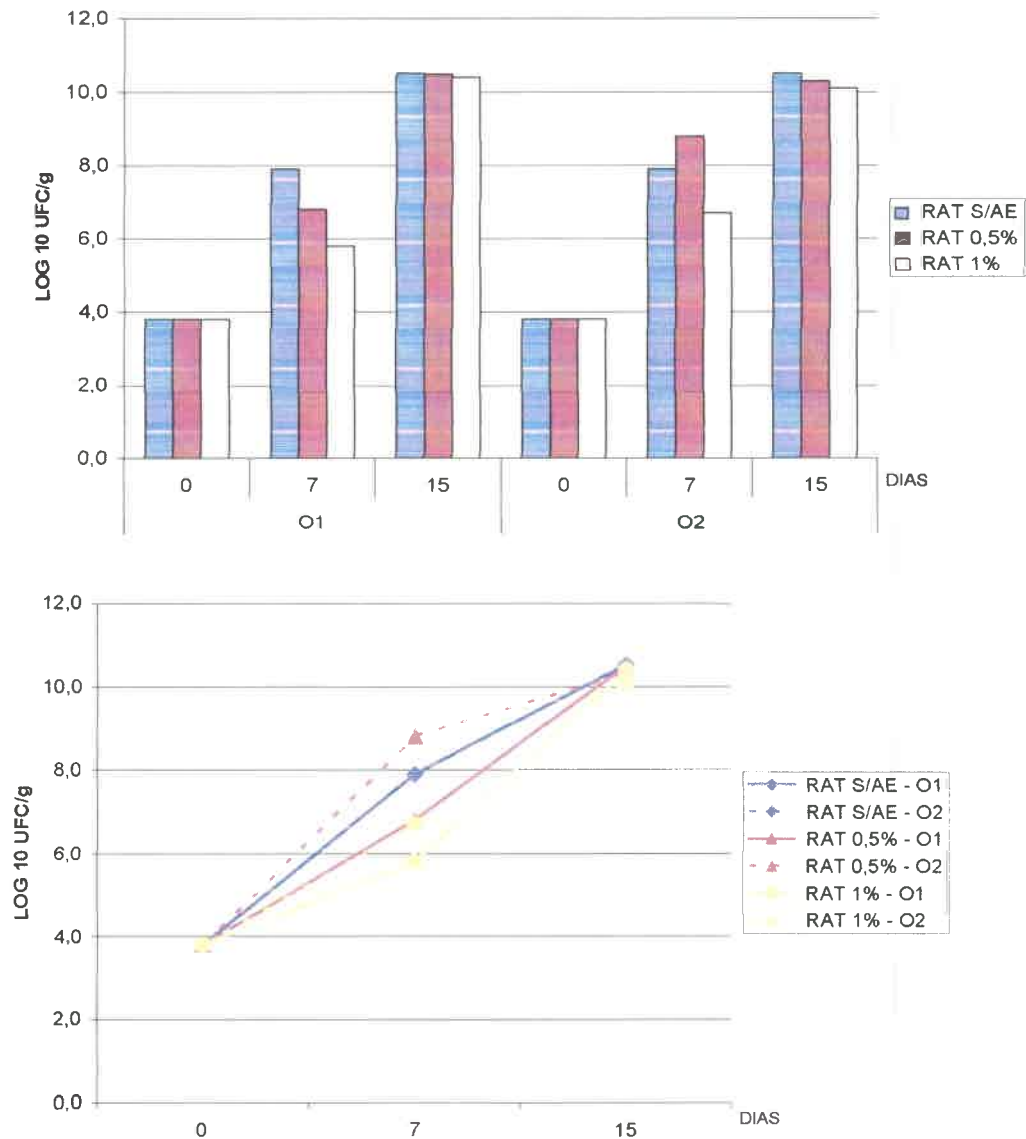
las muestras con 0,5% de aceite esencial presentaron un recuento de 2 logaritmos menos que las muestras sin aceite esencial.



**Figura 14. Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2)**

**5.3.2 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a 4 °C**

A la temperatura de 4 °C, el recuento de aerobios totales se incrementó en las muestras MP y MAE 0,5% y 1%, a los 7 y 15 días de almacenamiento (fig. 15). Al igual que a la temperatura de 25 °C, también se puede deducir que no hay un efecto inhibitorio del aceite esencial sobre microorganismos aerobios totales a ninguna de las concentraciones ensayadas.



**Figura 15. Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2)**

### 5.3.3 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a -20 °C

A -20 °C se pudo observar que las muestras MP presentaron un aumento en el recuento a los 30 días con respecto a las muestras control, pero a los 60 y 90 días fue disminuyendo. En los distintos periodos de almacenamiento las muestras MAE 0,5% y MAE 1% presentaron recuentos inferiores a las muestras control, manteniendo los mismos valores a lo largo del tiempo, con excepción de las muestras MAE 0,5% en el ensayo 2, donde a los 30 días el recuento

disminuyó, pero a los 60 y 90 días superó a las muestras control. La temperatura de conservación estaría influenciando en la disminución de la carga microbiana (fig. 16).

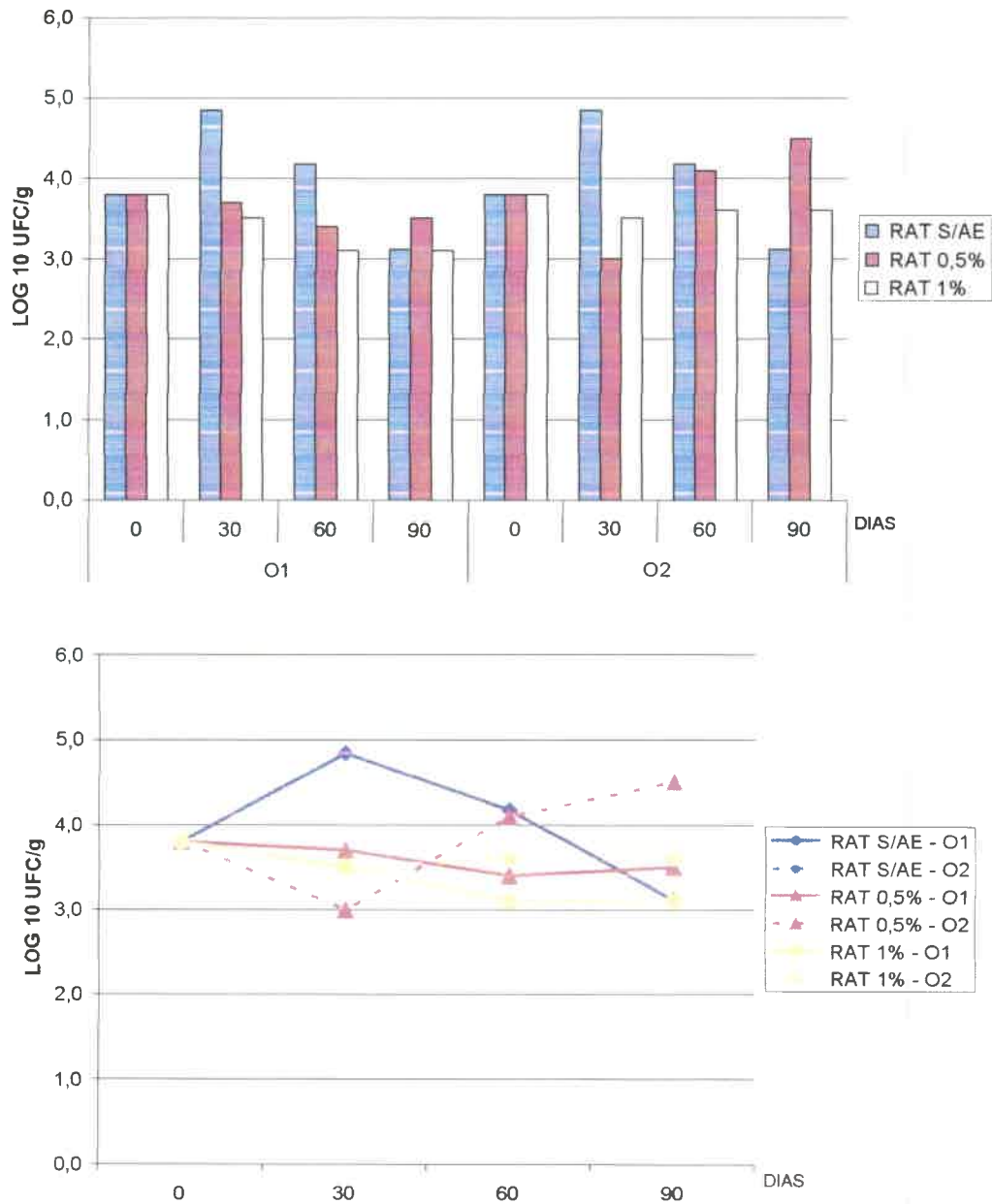


Figura 16. Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2)



5.4 Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras entre ensayos 1 y 2 con aceite esencial de orégano

5.4.1 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a 25 °C

En las tablas 8 y 9, puede observarse que la carga inicial de hongos y levaduras en las muestras control analizadas en el ensayo 1 superan en más de 2 log a la del ensayo 2 (fig. 17). El producto almacenado a 25 °C presentó un incremento del recuento de hongos y levaduras a los 7 y 15 días, tanto en las MP como MAE 0,5% y MAE 1%. En ambos ensayos los recuentos obtenidos son similares en las muestras MP y MAE 0,5% y 1%, observándose un incremento promedio de 6 log con respecto a las muestras control. El agregado de aceite esencial no incide sobre la conservación del alimento.

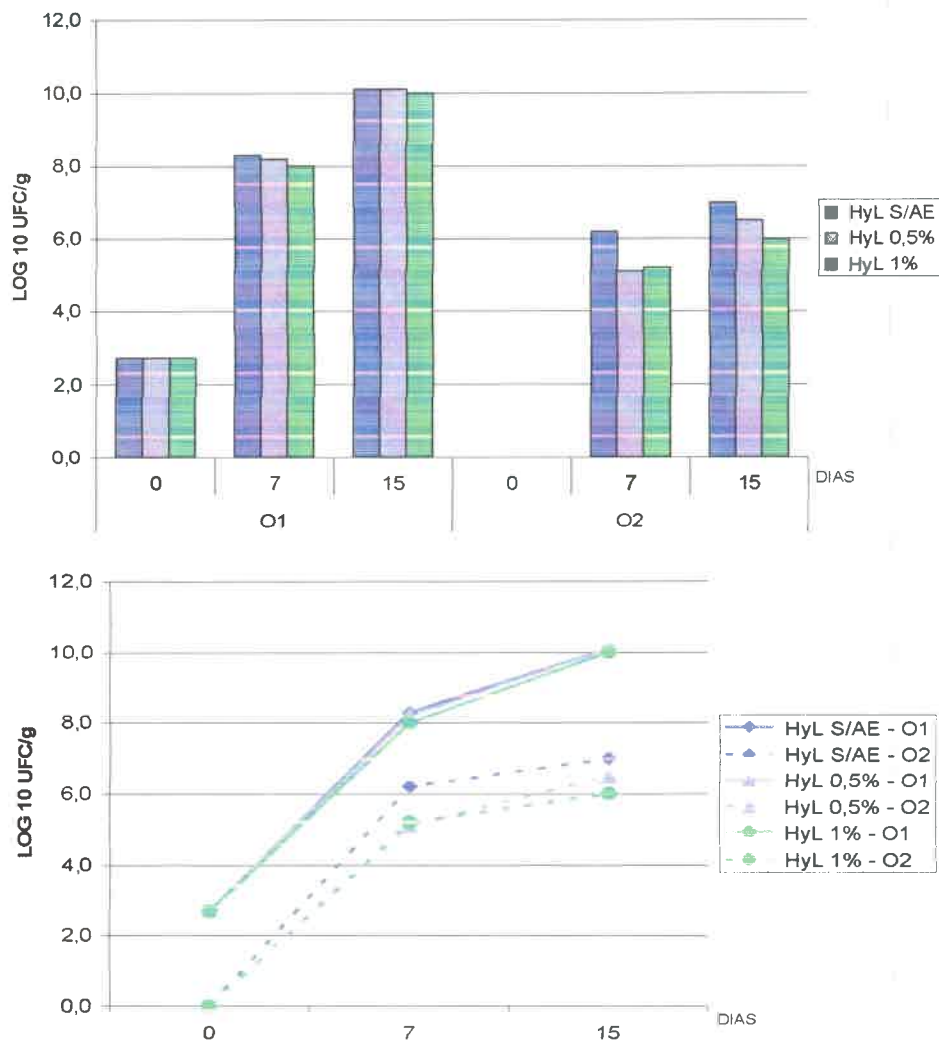


Figura 17. Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2)

5.4.2 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a 4 °C

Las muestras refrigeradas a 4 °C presentaron resultados similares a las muestras almacenadas a 25 °C, a los 7 y 15 días. En el ensayo 2 se pudo observar que a los 7 días de almacenamiento sería la temperatura la que detiene el desarrollo de hongos y levaduras, cuando la carga inicial en el producto es baja (fig. 18).

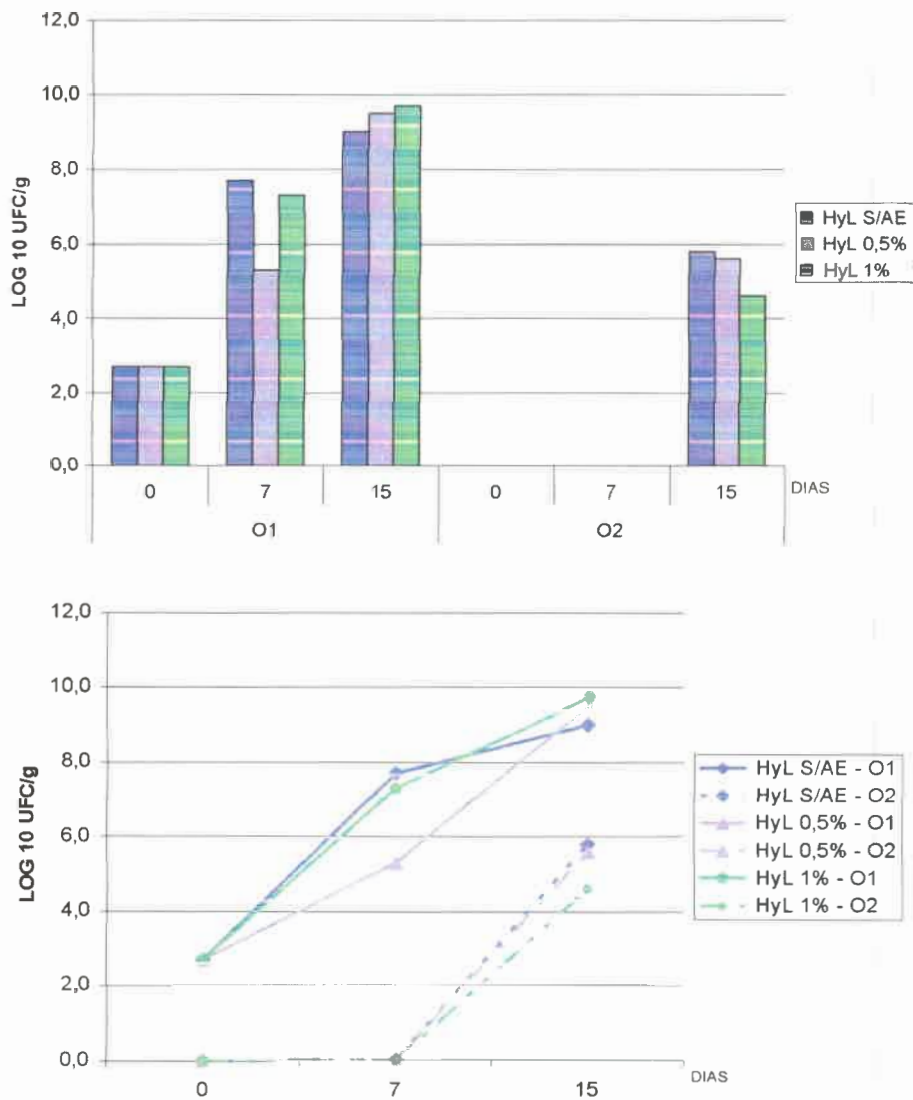
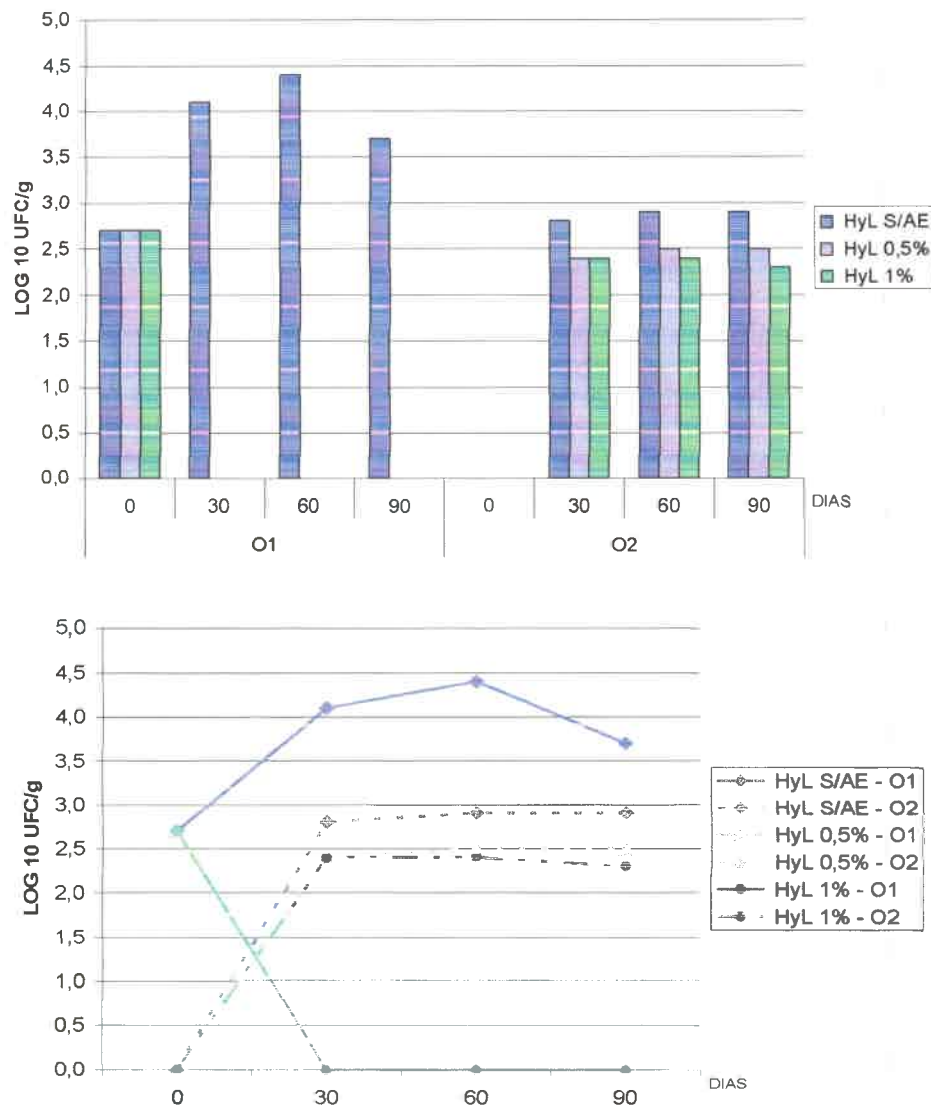


Figura 18. Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2)

### 5.4.3 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a -20 °C

A la temperatura de -20 °C, en el ensayo 1 las MP presentaron un aumento considerable en el recuento de hongos y levaduras a los 30 (2 log), 60 (2 log) y 90 días (1 log), con respecto a las muestras control. En el mismo periodo de tiempo, puede observarse que en las MAE 0,5% y MAE 1% no hubo desarrollo de hongos y levaduras. En el ensayo 2, no se observó desarrollo de hongos y levaduras en el tiempo 0, pero a los 30, 60 y 90 días los recuentos de las MP y MAE 0,5% y MAE 1% se incrementaron en más de 2 log (fig. 19).



**Figura 19. Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2)**

5.5 Análisis comparativo de recuento de coliformes totales entre ensayos 1 y 2 con aceite esencial de orégano

5.5.1 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a 25 °C

La carga inicial de bacterias coliformes totales de las muestras control analizadas en el ensayo 1 son aproximadamente 2 log menores a la de las muestras control del ensayo 2.

Un comportamiento similar a los recuentos de microorganismos aerobios totales y de hongos y levaduras puede observarse para las bacterias coliformes totales (fig. 20), ya que el numero de coliformes totales se incrementó en las MP y MAE 0,5% y 1%, en los distintos tiempos a la temperatura de 25 °C (tablas 8 y 9). Se puede deducir que no hay un efecto inhibitorio del aceite esencial sobre coliformes totales a ninguna de las concentraciones ensayadas a esta temperatura.

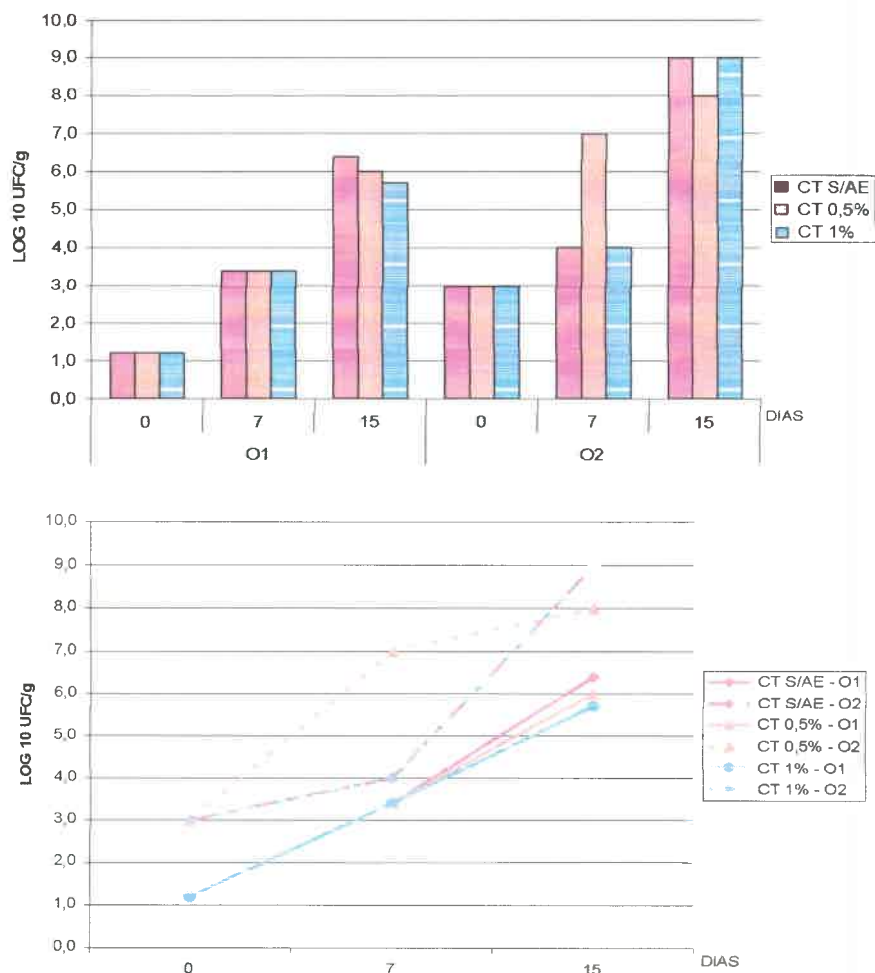


Figura 20. Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2)

### 5.5.2 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a 4 °C

Al igual que a 25 °C, se observó un incremento en el número de bacterias coliformes totales en las MP y MAE 0,5% y MAE1%, en los distintos tiempos a la temperatura de almacenamiento de 4 °C (fig. 21).

En el ensayo 1, todas las muestras analizadas presentan recuentos similares a los 7 días de almacenamiento, mientras que a los 15 días los recuentos de las MP y MAE 0,5% superan en más de 1 logaritmo a las muestras control (tabla 8). En el ensayo 2, en todos los tiempos de almacenamiento, los recuentos de las MP y MAE 0,5% son similares y aproximadamente 3 logaritmos por encima de las muestras control (tabla 9). Sin embargo a esta temperatura el producto con 1% de aceite esencial permitió inhibir el desarrollo de estas bacterias a los 7 y 15 días en los dos ensayos.

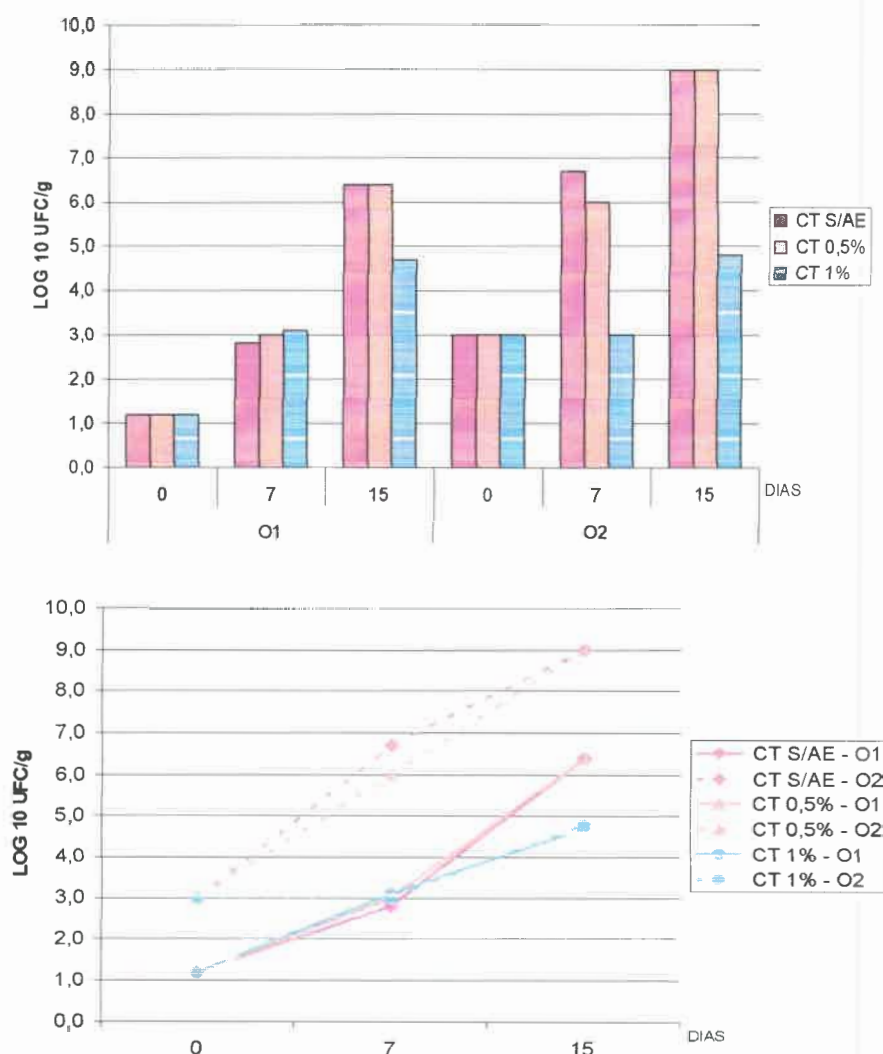


Figura 21. Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2)

5.5.3 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a -20 °C

A la temperatura de -20 °C, las MP presentaron un elevado recuento a los 30 días, mientras que a los 60 y 90 días fueron menores a los de las muestras control. Las MAE 0,5% y 1% evidenciaron una moderada caída en el número de coliformes totales, con respecto a las muestras control, en todos los periodos de tiempo ensayados (fig. 22).

En el ensayo 2, las muestras con 1% de aceite esencial mantuvieron sus recuentos por debajo de las MP en todos los tiempos ensayados, mientras que las MAE 0,5% se mantuvieron por encima de estas últimas.

Las muestras conservadas a -20 °C y en presencia de aceite esencial (1%) permiten la disminución de coliformes totales a lo largo del tiempo de almacenamiento ensayado. Probablemente habría una interacción sinérgica entre bajas temperaturas y aceite esencial. La carga inicial en el producto no incide en esta acción inhibitoria.

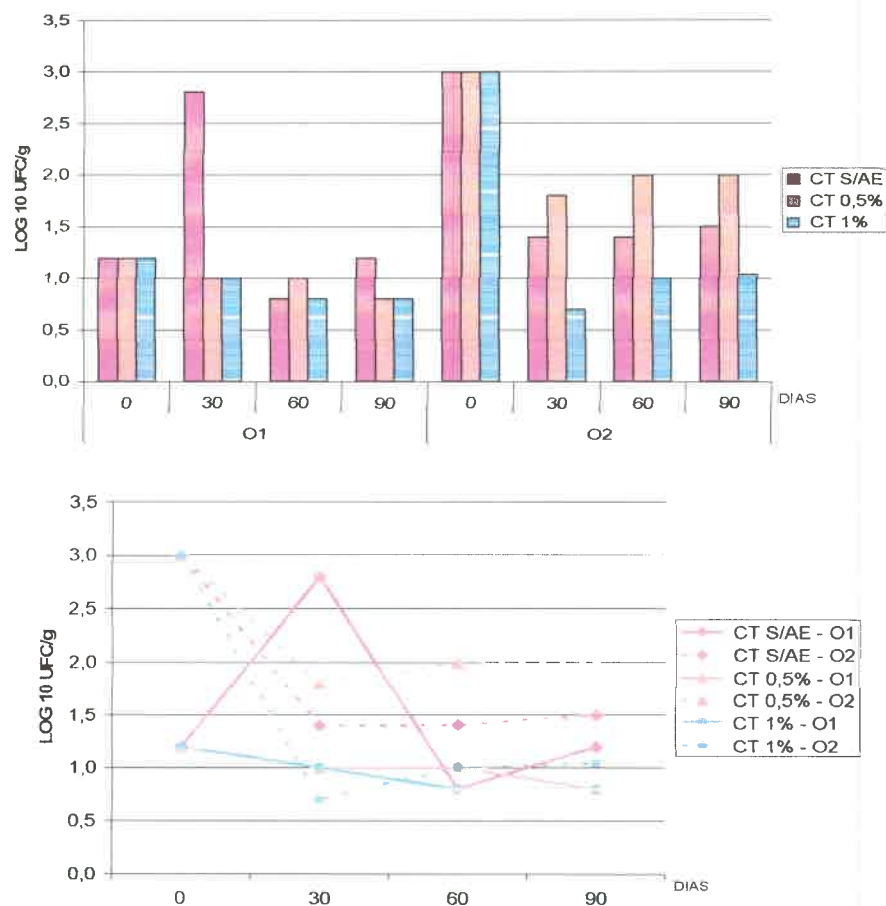


Figura 22. Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2)



### 5.6 Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de tomillo – Ensayo N° 1

Se analizó microbiológicamente el producto alimenticio manufacturado con pasta de soja provista por productor local y envasado en planta elaboradora, según consta en inciso **6.a** de materiales y métodos.

Las condiciones de almacenado a 25 °C y 4 °C, a distintos tiempos: 7 y 15 días y a -20 °C a 30, 60 y 90 días. Los productos sin aceite esencial (MP) y con el agregado de aceite esencial (MAE 0,5% y MAE 1%) fueron procesados para realizar el recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales (RAT), recuento de hongos y levaduras (H y L) y recuento de bacterias coliformes totales (CT), según inciso **7.** de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se observan en la tabla 10.

Se realizó la búsqueda para cada muestra de: ausencia o presencia de *E.coli*, ausencia o presencia de *Salmonella* sp., recuento de *S.aureus*, recuento de *B.cereus* y recuento de microorganismos anaerobios sulfito-reductores, según inciso **7.** de materiales y métodos. En ninguno de las muestras procesadas se detectó la presencia de patógenos alimentarios como *E.coli*, *Salmonella* sp., *B.cereus*, *S.aureus* y microorganismos anaerobios sulfito reductores, a los tiempos y temperaturas ensayadas.

**Tabla 10. Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de tomillo – Ensayo N° 1**

Ensayo	Temp. (°C)	Tiempo (días)	RAT S/AE	RAT 0,5%AE	RAT 1%AE	H y L S/AE	H y L 0,5%AE	H y L 1%AE	CT S/AE	CT 0,5%AE	CT 1%AE
T1		0	4,5x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	26	26	26
	25	7	1,3x10 <sup>7</sup>	1,8x10 <sup>8</sup>	3,7x10 <sup>9</sup>	1,4x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>7</sup>	40	40	40
		15	1,1x10 <sup>11</sup>	7,5x10 <sup>9</sup>	2,1x10 <sup>10</sup>	6,5x10 <sup>8</sup>	6,5x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>8</sup>	40	40	40
		0	4,5x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	26	26	26
	4	7	6x10 <sup>9</sup>	5,3x10 <sup>9</sup>	8,5x10 <sup>9</sup>	9x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>
		15	1,2x10 <sup>11</sup>	1,1x10 <sup>11</sup>	3,1x10 <sup>11</sup>	1,2x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>	4x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>4</sup>	9,5x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>4</sup>
		0	4,5x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	26	26	26
		30	3,8x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	54	19	286
	-20	60	1,2x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>4</sup>	5,2x10 <sup>2</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>	4,7x10 <sup>2</sup>	9,5	2	23,5
		90	9x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>3</sup>	3,2x10 <sup>2</sup>	5,3x10 <sup>2</sup>	11	2	11

S/D = Sin Desarrollo

T1= Tomillo 1: ensayo realizado con milanesa de soja manufacturada con pasta de soja provista por productor local y envasada en planta elaboradora

RAT= recuento de microorganismos aerobios, mesófilos, viables, totales (UFC/g).

H y L= recuento de hongos y levaduras (UFC/g).

CT= recuento de coliformes totales (NMP/g).

### 5.7 Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de tomillo – Ensayo N° 2

Se analizó microbiológicamente el producto alimenticio elaborado y envasado en el laboratorio según consta en inciso **6.b** de materiales y métodos.

Las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento fueron idénticas al ensayo N° 1. Los productos sin aceite esencial (MP) y con el agregado de aceite esencial (MAE 0,5% y MAE 1%) fueron procesados para realizar el recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales (RAT), recuento de hongos y levaduras (H y L) y recuento de bacterias coliformes totales (CT), según inciso **7.** de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se observan en la tabla 11.



Se realizó la búsqueda para cada muestra de: ausencia o presencia de *E.coli*, ausencia o presencia de *Salmonella* sp., recuento de *S.aureus*, recuento de *B.cereus* y recuento de microorganismos anaerobios sulfito-reductores, según inciso 7. de materiales y métodos. En ninguno de las muestras procesadas se detectó la presencia de patógenos alimentarios como *E.coli*, *Salmonella* sp., *B.cereus*, *S.aureus* y microorganismos anaerobios sulfito reductores, a los tiempos y temperaturas ensayadas.

**Tabla 11. Análisis microbiológico de milanesas de soja con y sin el agregado de aceite esencial de tomillo – Ensayo N° 2**

Ensayo	Temp. (°C)	Tiempo (días)	RAT S/AE	RAT 0,5%AE	RAT 1%AE	H y L S/AE	H y L 0,5%AE	H y L 1%AE	CT S/AE	CT 0,5%AE	CT 1%AE
T2	25	0	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	S/D	S/D	S/D
		7	3,5x10 <sup>7</sup>	4,5x10 <sup>7</sup>	4,1x10 <sup>7</sup>	4x10 <sup>5</sup>	S/D	2,5x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>
		15	2,5x10 <sup>11</sup>	3x10 <sup>9</sup>	3,7x10 <sup>10</sup>	6,5x10 <sup>8</sup>	S/D	2x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	5,6x10 <sup>6</sup>	2,4x10 <sup>7</sup>
	4	0	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	S/D	S/D	S/D
		7	1,8x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>6</sup>	8,5x10 <sup>9</sup>	2x10 <sup>4</sup>	S/D	3x10 <sup>3</sup>	9x10 <sup>4</sup>	8,5x10 <sup>4</sup>	8,8x10 <sup>4</sup>
		15	9,5x10 <sup>9</sup>	3,1x10 <sup>11</sup>	6,3x10 <sup>11</sup>	2,3x10 <sup>6</sup>	S/D	2,8x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>7</sup>
	-20	0	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	S/D	S/D	S/D
		30	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
		60	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
			90	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D

S/D = Sin Desarrollo

T2= Tomillo 2: ensayo realizado con milanesa de soja elaborada y envasada en laboratorio

RAT= recuento de microorganismos aerobios, mesófilos, viables, totales (UFC/g).

H y L= recuento de hongos y levaduras (UFC/g).

CT= recuento de coliformes totales (NMP/g).

5.8 Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales entre ensayos 1 y 2 con aceite esencial de tomillo

5.8.1 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a 25 °C

En las tablas 10 y 11 puede observarse que la carga inicial microorganismos aerobios totales en las muestras control analizadas en el ensayo 1 superan en 3 log a la del ensayo 2.

El recuento de aerobios totales se incrementó en las MP y MAE 0,5% y 1%, en los distintos tiempos a la temperatura de almacenamiento de 25 °C. Se puede deducir que no hay un efecto inhibitorio del aceite esencial sobre microorganismos aerobios totales a ninguna de las concentraciones ensayadas, independientemente de la carga inicial (fig. 23).

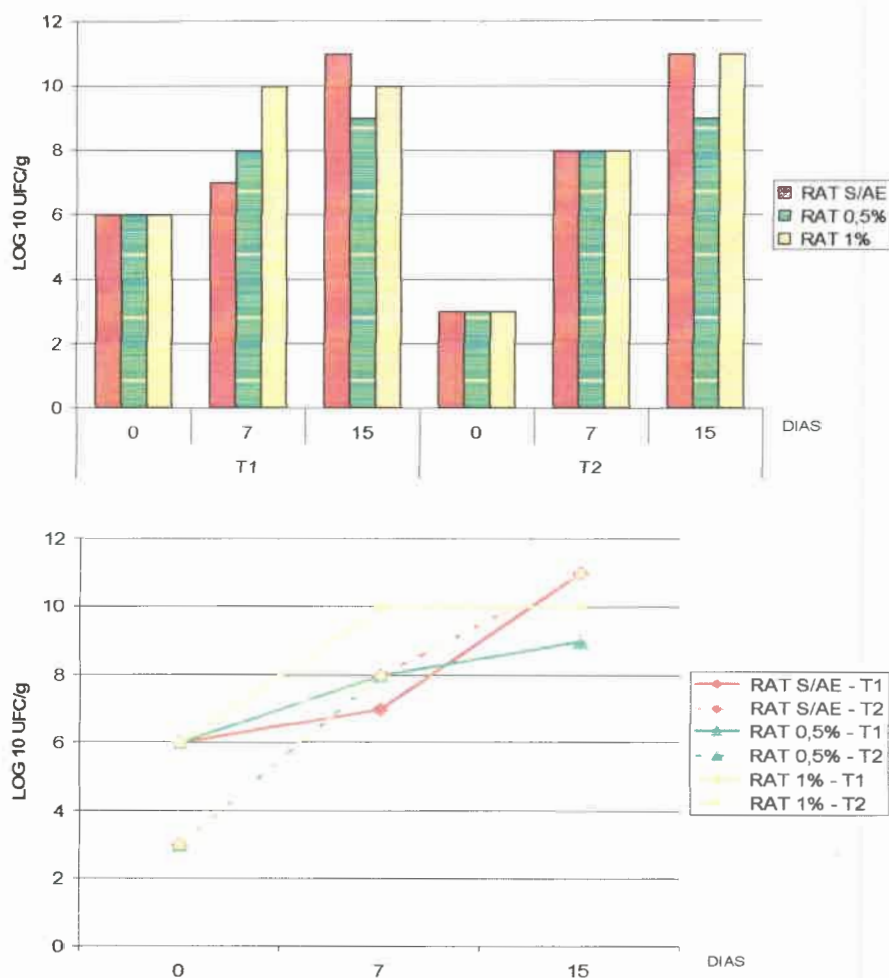


Figura 23. Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2)

5.8.2 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a 4 °C

El recuento de aerobios totales se incrementó en las MP y MAE 0,5% y 1%, a los 7 y 15 días de almacenamiento a la temperatura de 4 °C (fig. 24). A partir de estos resultados se puede deducir que no hay un efecto inhibitorio del aceite esencial sobre microorganismos aerobios totales a ninguna de las concentraciones ensayadas.

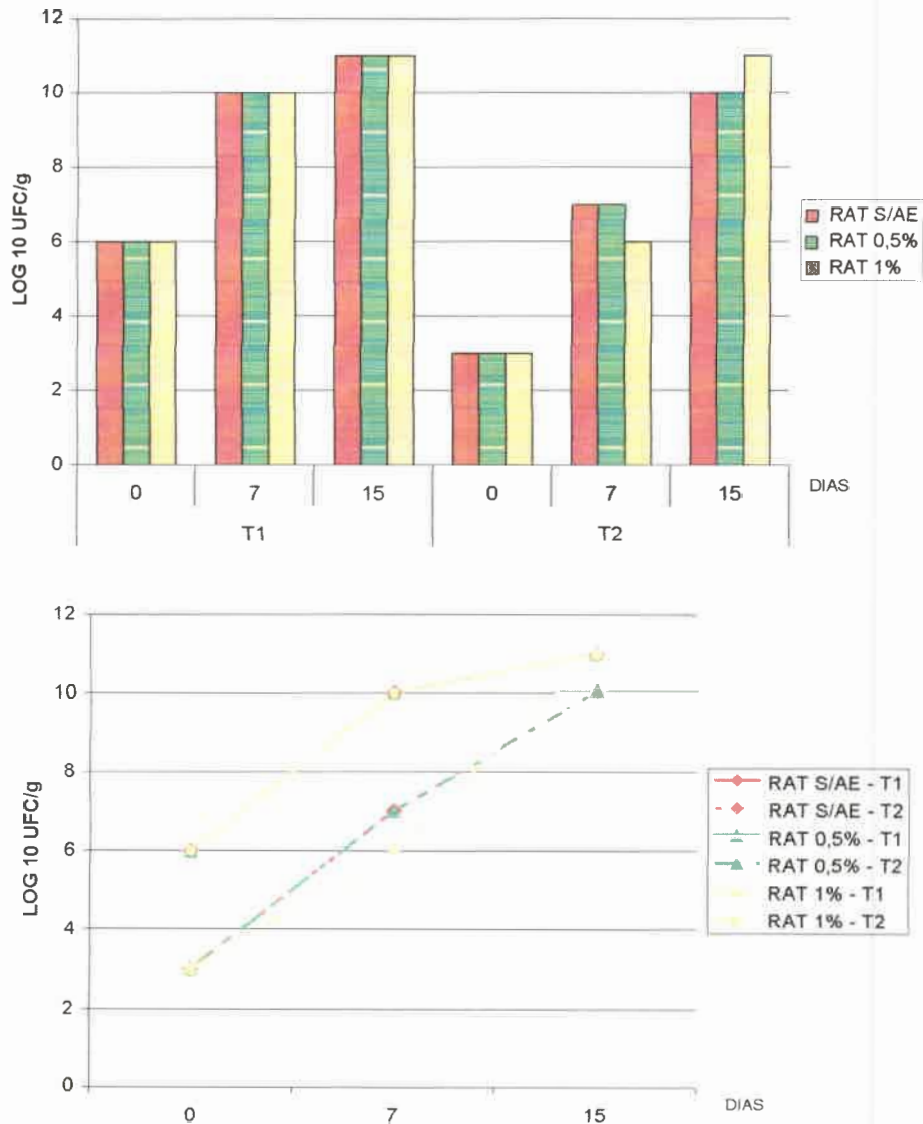


Figura 24. Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2)



5.8.3 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales a partir de muestras almacenadas a -20 °C

A la temperatura de -20 °C, se pudo observar que las MP y MAE 0,5% y 1% presentaron recuentos menores a las muestras control a los 30, 60 y 90 días de almacenamiento. En el ensayo 1, las MP presentaron recuentos superiores a las MAE 0,5% y 1% a los 30 y 90 días, mientras que a los 60 días todas las muestras analizadas presentaron recuentos similares. En el ensayo 2, no se observó crecimiento microbiano en ninguno de los periodos de tiempo ensayados probablemente porque la carga inicial fue baja (fig. 25). Temperaturas de -20 °C y aceite esencial de tomillo inhiben el desarrollo de microorganismos aerobios totales.

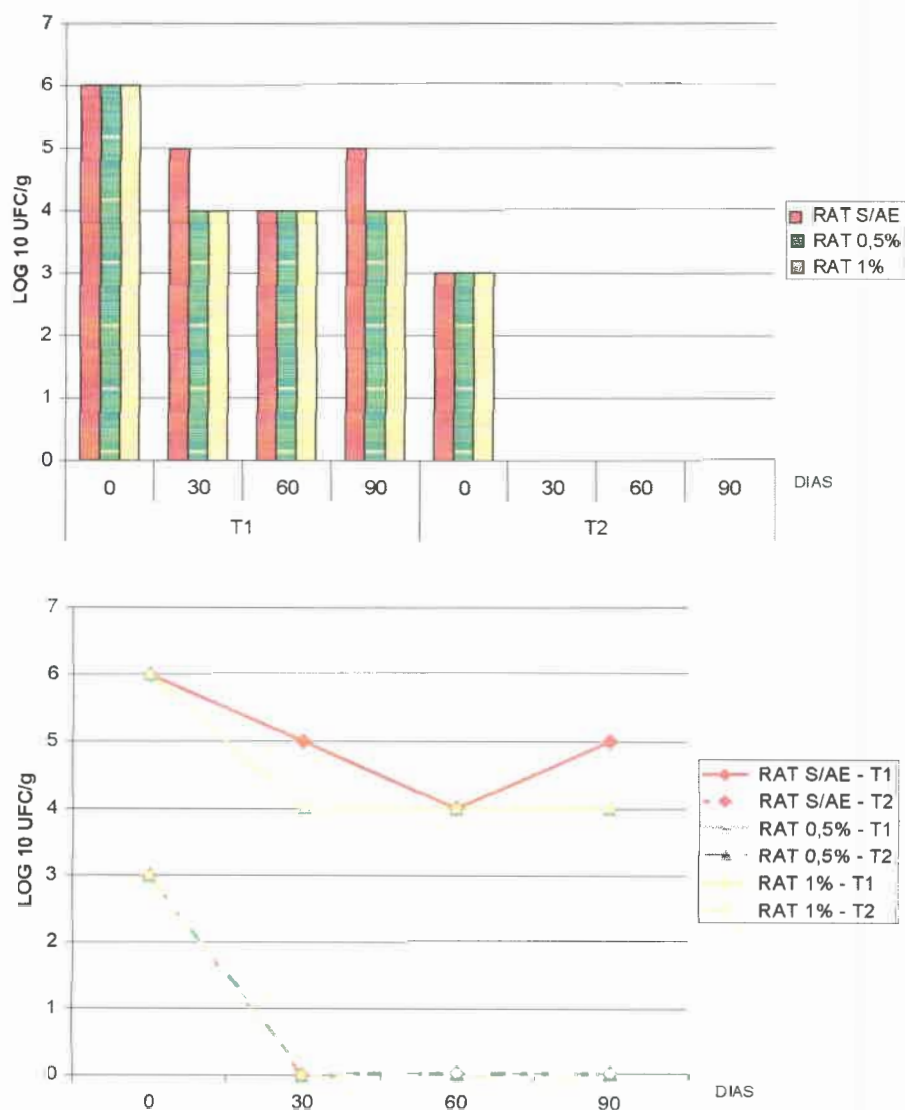


Figura 25. Análisis comparativo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2)



5.9 Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras entre los ensayos 1 y 2 con aceite esencial de tomillo

5.9.1 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a 25 °C

En las tablas 10 y 11, puede observarse que la carga inicial de hongos y levaduras en las muestras control analizadas en el ensayo 1 superan en 2 log a la del ensayo 2. El producto almacenado a 25 °C presentó un incremento del recuento de hongos y levaduras a los 7 y 15 días, tanto en las MP como EN MAE 0,5% y 1%. En el ensayo 2, no se observó desarrollo de hongos y levaduras en las MAE 0,5% en ninguno de los periodos de almacenamiento ensayados (fig. 26). Probablemente la carga inicial baja de microorganismos permitió inhibición de la población microbiana total a concentración de 0,5% de aceite esencial. Cabe aclarar que recuento de hongos y levaduras se realizó sobre diferentes unidades del producto alimenticio en cada tiempo, temperatura y concentración de aceite esencial utilizados.

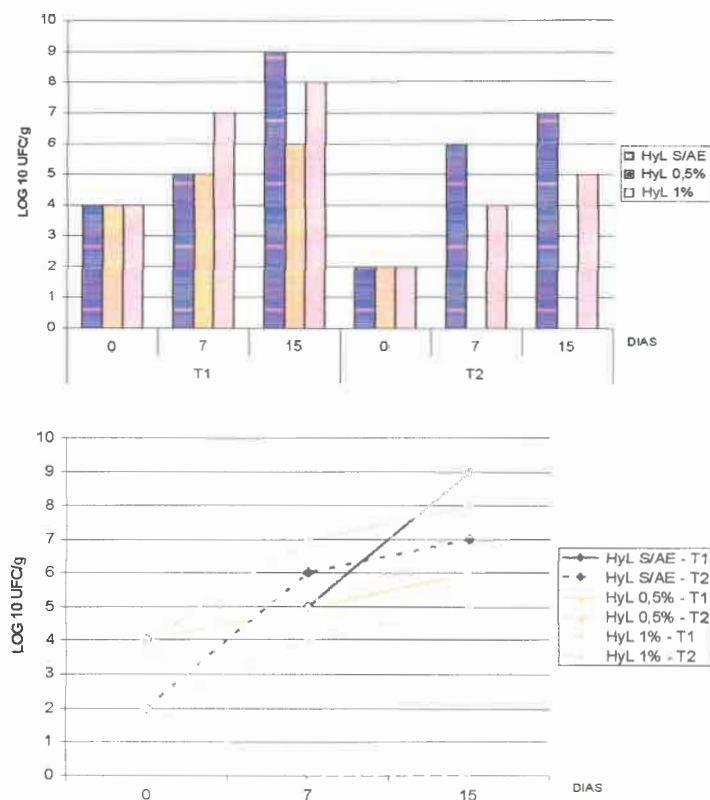
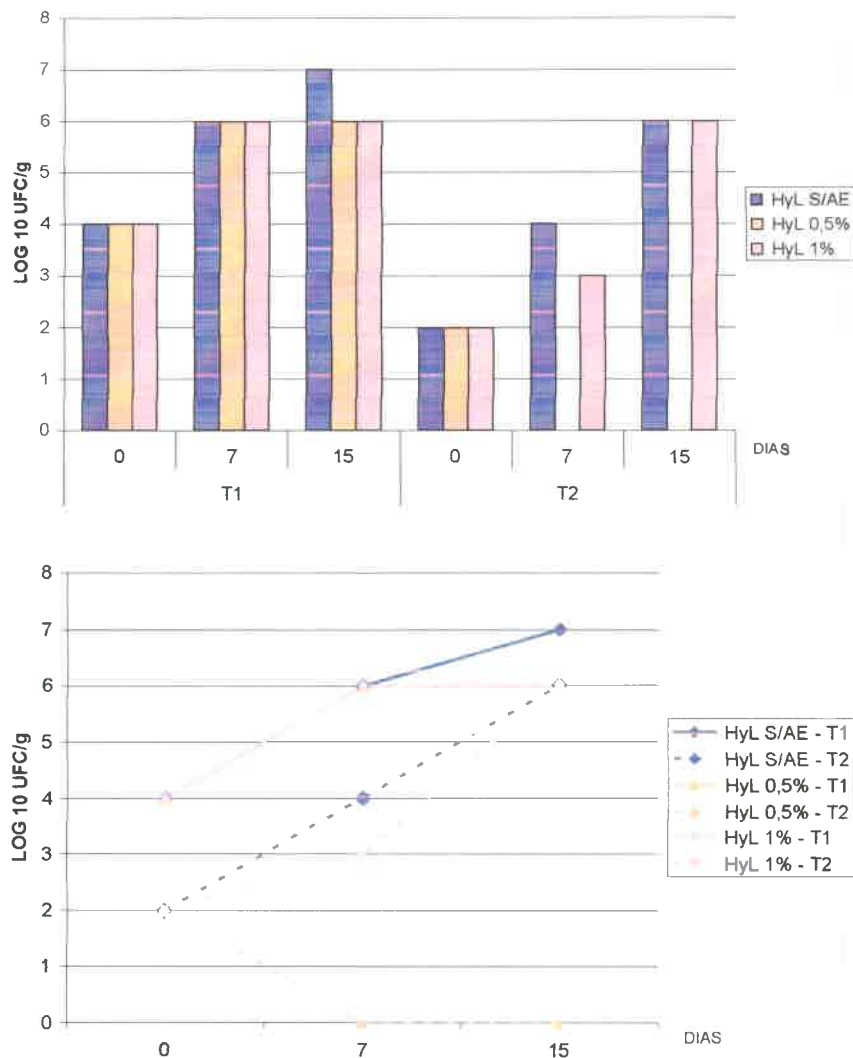


Figura 26. Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2)

### 5.9.2 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a 4 °C

A la temperatura de 4 °C, el recuento de hongos y levaduras se incrementó en las MP y MAE 0,5% y 1%, a los 7 y 15 días de almacenamiento (fig. 27). Al igual que a la temperatura de 25 °C, no se observó desarrollo de hongos y levaduras en las MAE 0,5% del ensayo 2 en ninguno de los periodos de almacenamiento probados, al igual que a 25 °C.

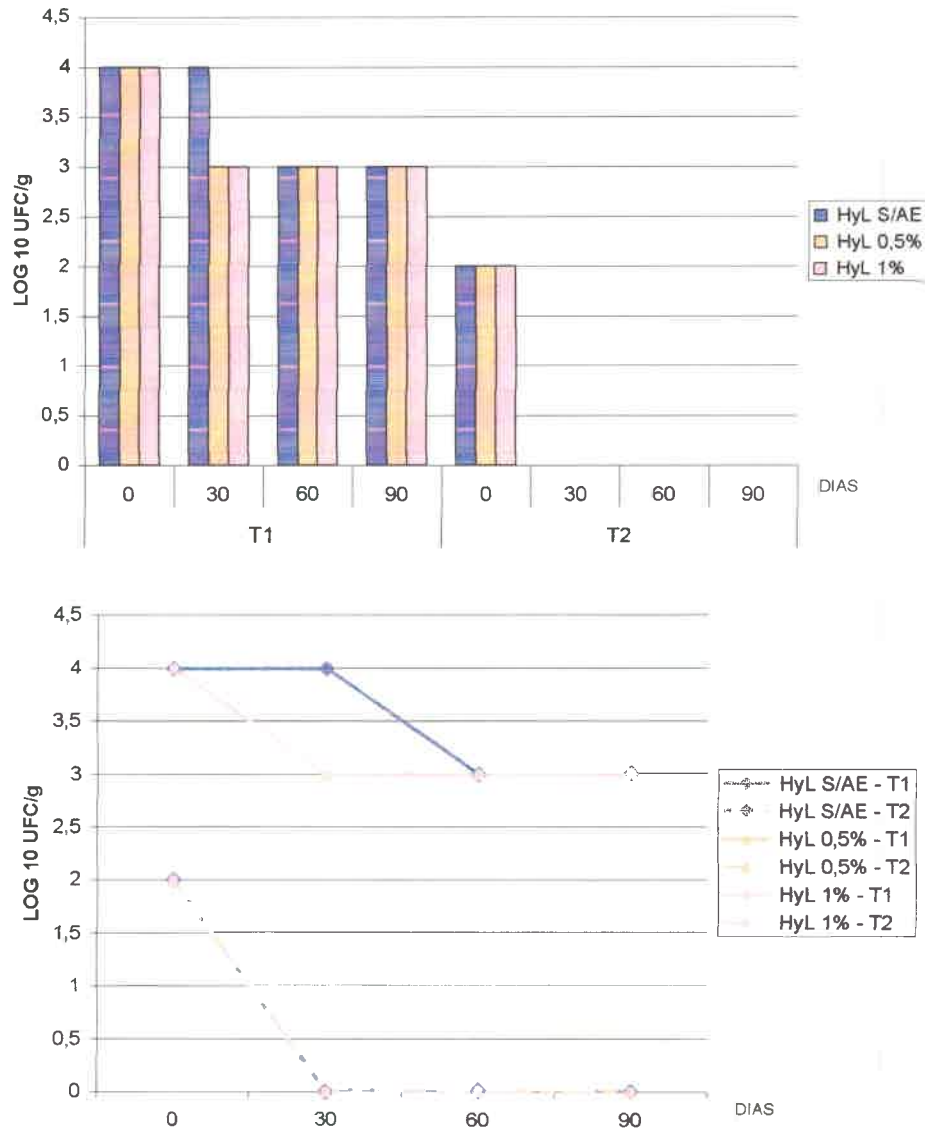


**Figura 27. Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2)**

### 5.9.3 Recuento de hongos y levaduras a partir de muestras almacenadas a -20 °C

A la temperatura de -20 °C, en el ensayo 1 las MP presentaron los mismos recuentos que las muestras control a los 30 días de almacenamiento, mientras que a los 60 y 90 días todas las muestras analizadas presentaron los mismos recuentos, disminuidos en 1 log con respecto a las muestras control (tabla 10). En

la experiencia 2, en ninguna de las muestras analizadas se observó desarrollo de hongos y levaduras en los periodos de almacenamiento ensayados a una temperatura de -20 °C (fig. 28). Temperaturas de -20 °C y aceite esencial de tomillo inhiben el desarrollo de hongos y levaduras.



**Figura 28. Análisis comparativo de recuento de hongos y levaduras del producto alimenticio almacenado a -20 °C (ensayos 1 y 2)**

5.10 Análisis comparativo de recuento de coliformes totales entre ensayos 1 y 2 con aceite esencial de tomillo

5.10.1 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a 25 °C

En las tablas 10 y 11 puede observarse que la carga inicial bacterias coliformes totales de las muestras control analizadas en el ensayo 1 superan en 1 log a las del ensayo 2.

Un comportamiento similar a los recuentos de microorganismos aerobios totales y de hongos y levaduras puede observarse para las bacterias coliformes totales, ya que el número de coliformes totales se incrementó en las MP y MAE 0,5% y 1%, en los distintos tiempos a la temperatura de 25 °C (fig. 29). Se puede deducir que no hay un efecto inhibitorio del aceite esencial sobre coliformes totales a ninguna de las concentraciones ensayadas a esta temperatura.

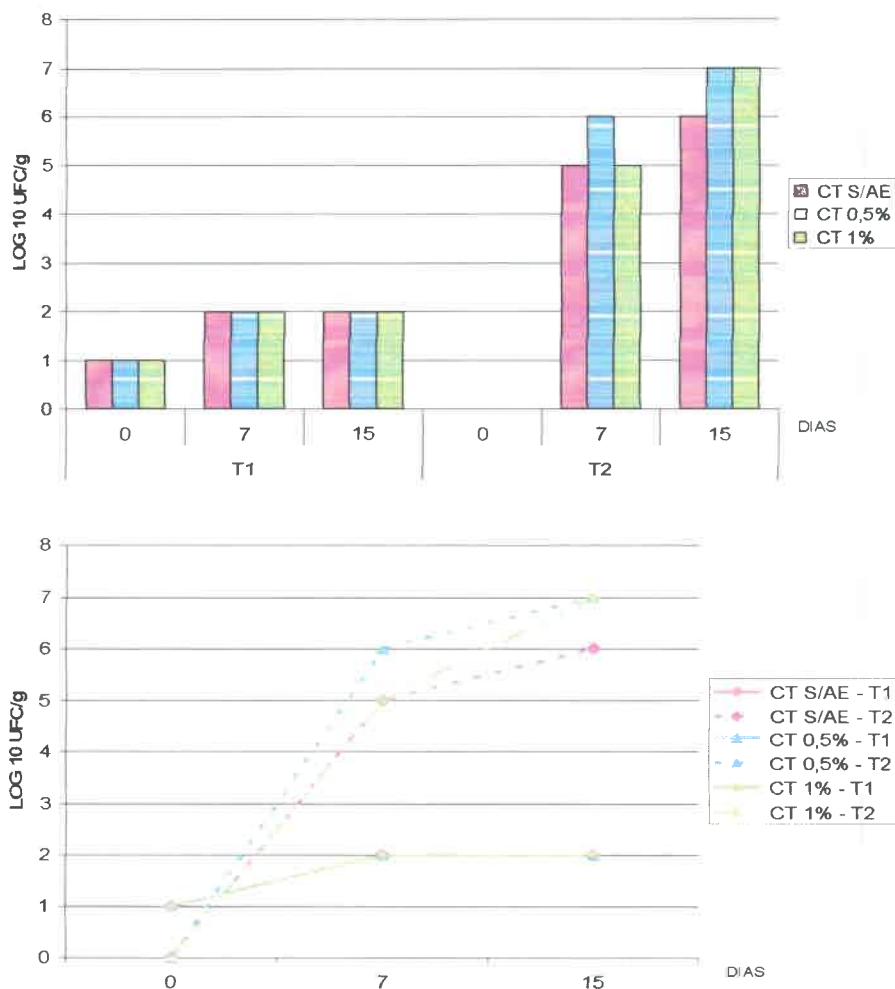


Figura 29. Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a 25 °C (ensayos 1 y 2)

5.10.2 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a 4 °C

Al igual que a 25 °C, se observó un incremento en el número de bacterias coliformes totales en las MP y MAE 0,5% y 1%, en los distintos tiempos a la temperatura de almacenamiento de 4 °C (fig. 30). Se puede deducir que no hay un efecto inhibitorio del aceite esencial sobre coliformes totales a ninguna de las concentraciones ensayadas a esta temperatura.

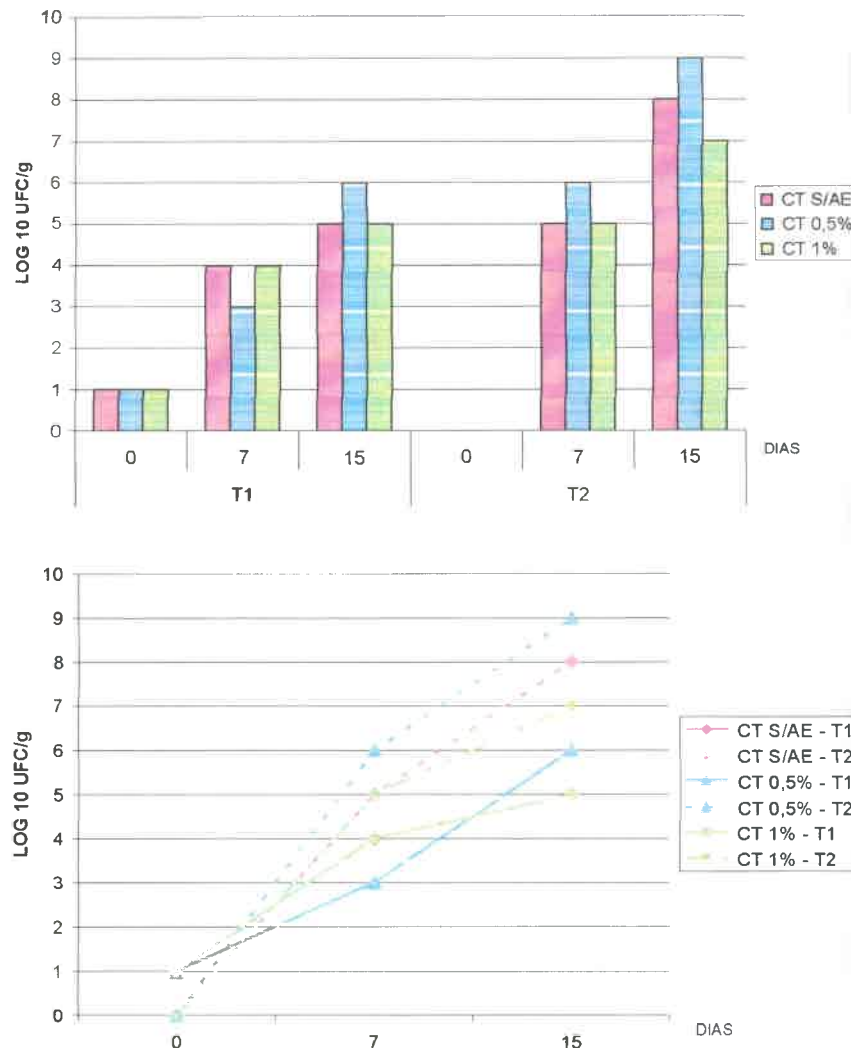


Figura 30. Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a 4 °C (ensayos 1 y 2)

5.10.3 Recuento de coliformes totales a partir de muestras almacenadas a -20 °C

A la temperatura de -20 °C (fig. 31), en el ensayo 1, las MP y MAE 1% presentaron los mismos recuentos en todos los periodos de tiempo ensayados. A los 30 días, estas muestras presentaron recuentos superiores (1 log) a los de las muestras control, en tanto que a los 60 y 90 días los resultados disminuyeron

dando resultados similares a los obtenidos a partir de las muestras control. Con respecto a las MAE 0,5%, presentaron recuentos inferiores a las MP y MAE 1%, manteniendo a los 30 días los mismos recuentos que las muestras control, mientras que a los 60 y 90 días no se observó desarrollo de estas bacterias. Probablemente los recuentos obtenidos en MAE 1% estarían dados por las variaciones propias de las experiencias realizadas. En el ensayo 2, en ninguna muestra se observó desarrollo de bacterias coliformes totales en los periodos de almacenamiento ensayados a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

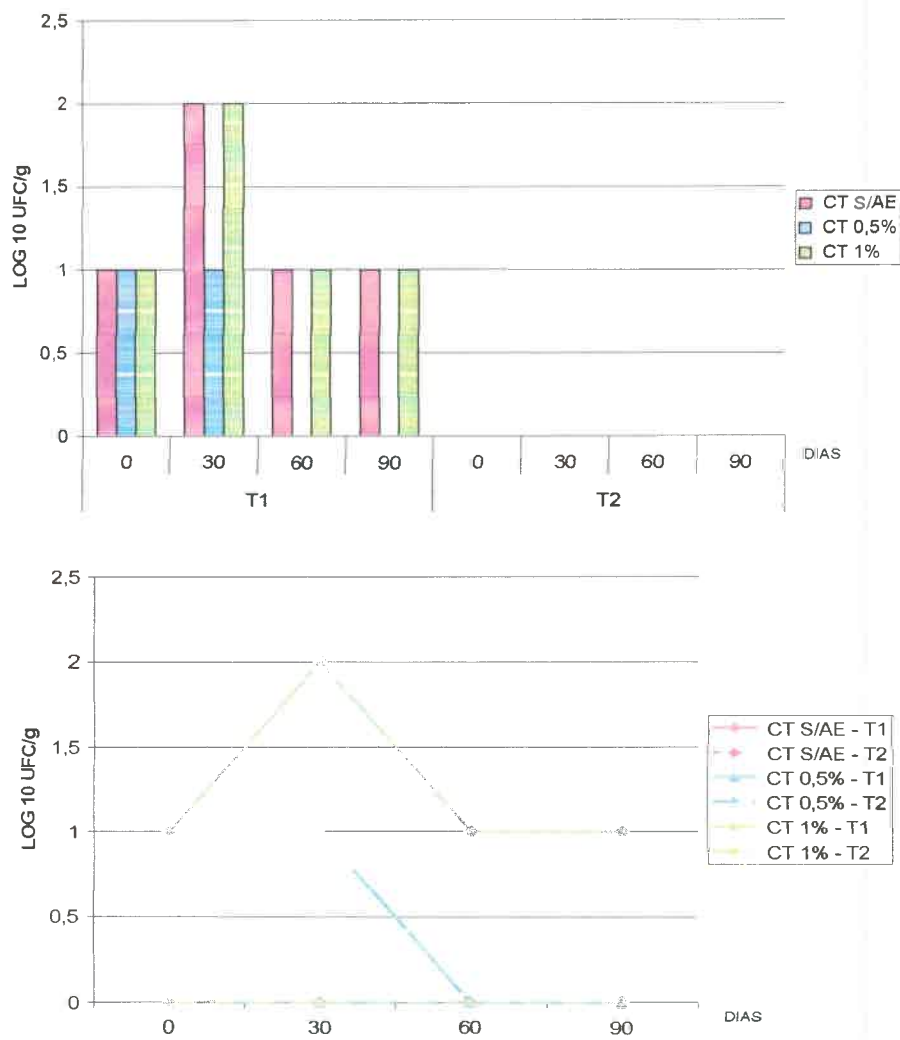


Figura 31. Análisis comparativo de recuento de coliformes totales del producto alimenticio almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ensayos 1 y 2)



## 6. Calidad microbiológica del alimento, tiempos y temperaturas de almacenamiento

Para alcanzar una vida útil adecuada, los productos alimenticios requieren de una carga microbiana inicial reducida, en cuanto esté controlada o inhibida durante el proceso de elaboración. Para obtener el perfil de buen agente sanitizante es muy importante optimizar el tiempo de contacto entre un determinado aceite esencial y el patógeno alimentario (55, 62).

A partir de estos resultados se puede observar que la carga microbiana inicial de microorganismos aerobios mesófilos viables totales (RAT) de todas las muestras sin aceite esencial (MP) analizadas varió entre  $1 \times 10^3$  UFC/g y  $4,5 \times 10^5$  UFC/g, lo que indica una concentración microbiana moderada. A pesar de que no existe una normativa vigente para productos derivados de soja, el Código Alimentario Argentino especifica para productos cárnicos un límite máximo de  $10^7$  UFC/g de RAT (14).

Para hongos y levaduras (H y L) y coliformes totales (CT) los recuentos fueron de hasta  $10^3$  ufc/g en el MP. El Código Alimentario Español (CAE) sugiere para cereales un recuento de  $10^5$  UFC/g para RAT y un recuento de  $10^4$  UFC/g para H y L, y CT (63).

Cabe destacar que no se observó desarrollo de microorganismos patógenos en ninguna de las muestras analizadas. Por todo lo expuesto se considera que el producto alimenticio analizado presenta una calidad microbiológica aceptable. Este estudio es un aporte con la finalidad de implementar nuevas pautas para establecer la calidad higiénico-sanitaria de productos derivados de soja.

Un análisis detallado de tiempos y temperaturas de almacenamiento utilizados en estas experiencias muestra que el producto alimenticio almacenado a 25 °C durante 7 días presenta un desarrollo microbiano considerable, ya que RAT y H y L ascienden en este tiempo hasta 6 log, lo cual indica que esta temperatura no es adecuada para la conservación del alimento. Similar comportamiento presentó la temperatura de almacenamiento de 4 °C en el periodo de 7 días en donde el aumento de RAT y H y L fue de hasta 5 log., contrariamente a lo esperado para esta temperatura, considerada comúnmente como preservante de alimentos.

A la temperatura de -20 °C en algunas experiencias el recuento en las MP aumenta a los 30 días 1 log para RAT y 2 log para H y L, y en otras MP se mantiene o baja el número de microorganismos a lo largo del tiempo (30, 60 y 90 días). Por lo expuesto, esta temperatura es la adecuada para mantener en óptimas condiciones microbiológicas el producto alimenticio de soja.

#### 7. Actividad antimicrobiana, envasado del producto alimenticio y aceites esenciales

Los alimentos pueden sufrir durante su almacenamiento y distribución alteraciones físicas, químicas y biológicas. Factores como el oxígeno, la humedad, la exposición a la luz y el daño mecánico son las mayores fuentes de alteración. La pérdida de calidad de alimentos envasados es causada principalmente por el oxígeno. La oxidación de grasas, aceites y otros componentes del alimento producen cambio en el color y el sabor, y pérdida de nutrientes. Así, la protección del contenido frente al oxígeno es uno de los requerimientos más importantes en el envasado de productos alimenticios. La propiedad de barrera impermeable al oxígeno de los materiales de envasado es crítica para mantener la alta calidad inicial del producto envasado. Esta barrera la constituyen polímeros sintéticos de alto costo como co-polímeros de alcohol polivinílico de etileno (EVOH), cloruro de polivinilideno (PVDC), tereftalato de polietileno (PET) y poliamida-6 (Nylon), los cuales son los más comúnmente usados en forma de films o capas laminadas (36).

Los resultados obtenidos en las determinaciones microbiológicas de las muestras de alimento con aceite esencial, mostraron baja actividad antimicrobiana, ya que los recuentos de todas las muestras analizadas (con y sin agregado de aceite esencial) fueron semejantes a medida que se incrementaban los tiempos de incubación a las temperaturas de 25 °C y 4 °C. En este estudio, se utilizó film de alta permeabilidad de oxígeno y condiciones de envasado aeróbico, por lo cual se puede sugerir que los aceites esenciales de orégano y tomillo sufrieron una gran oxidación, trayendo como consecuencia la pérdida de su acción inhibitoria sobre la flora del alimento. Esto se fundamenta en la importante actividad antimicrobiana que ambos aceites esenciales presentaron en los ensayos "in vitro" sobre todas las cepas bacterianas ensayadas.

Por otra parte, se ha demostrado que la efectividad de los aceites esenciales disminuye cuando los experimentos se realizan "in situ". Esto se puede deber al alto contenido de proteínas y/o grasas en los alimentos probados, lo cual puede enmascarar o inhibir el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales (59).

La selección de las condiciones de envasado de los alimentos afecta indirectamente el potencial inhibitorio de los aceites esenciales. Tsigarida et al. (2000), demostraron que el aceite esencial de orégano fue menos efectivo cuando el alimento fue envasado en condiciones de aerobiosis, en vacío y en atmósfera modificada con film de alta permeabilidad de oxígeno, en comparación con muestras envasadas con film de baja permeabilidad de oxígeno.

El uso del envasado al vacío en combinación con aceite esencial de orégano tuvo un efecto sinérgico sobre la inhibición de *L.monocytogenes*, *S.typhimurium* y la flora autóctona en carne vacuna: 0,8% v/p de aceite esencial de orégano produjo una reducción inicial de 1 a 3 log en la población microbiana en muestras envasadas al vacío y en atmósfera modificada con film de baja permeabilidad de oxígeno. Por lo tanto, estas condiciones incrementan el efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano sobre la microflora de la carne (77, 89). En forma similar, concentraciones de 0,5% y 1% de aceite esencial de orégano retrasaron el crecimiento de microorganismos presentes en muestras de carne picada envasadas en atmósfera modificada, mientras que no se observó tal inhibición en muestras envasadas con oxígeno (72).

Según un estudio realizado por Goulas et al. (2007), el efecto combinado de sal, envasado en atmósfera modificada y aceite esencial de orégano sobre la vida útil de carne de pescado almacenado a 4 °C con film de baja permeabilidad de oxígeno, extendió la vida útil del alimento por más de 17 días. En contraste, envasado en atmósfera modificada y salado, sin agregado de aceite esencial, la extensión de la vida útil se limitó a 12 días y a 5 días únicamente con salado (la vida útil de las muestras control fue de aproximadamente 15-16 días).

Para que los aceites esenciales sean aplicables a la tecnología del envasado en atmósfera modificada se debe considerar la naturaleza de la flora contaminante y patógena que puede tener el alimento, el pH, el rol que cumplen los compuestos fenólicos de los aceites esenciales, la acción inhibitoria y selectiva

del CO<sub>2</sub>, la baja temperatura utilizada para el almacenamiento y el rol de la composición del alimento (86).

La disminución en la eficacia de los antimicrobianos derivados de plantas en la transición de caldo al alimento no tiene precedentes y acentúa el peligro en la extrapolación del valor práctico de estas observaciones a partir de estudios en medios líquidos, donde las condiciones de crecimiento son ideales y optimizan el efecto antimicrobiano ocurrido. Además, hay que agregar el hecho de que los compuestos activos de los aceites esenciales están estrechamente relacionados con los constituyentes del alimento (por ejemplo, proteínas, azúcares, grasas, etc.) por reacciones de adición y condensación. (59).

La determinación y la evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales son difíciles por su volatilidad, insolubilidad en agua y complejidad. Los aceites esenciales son de naturaleza hidrofóbica y de alta viscosidad. Estas propiedades pueden reducir la capacidad de dilución o causar una distribución heterogénea del aceite a través del medio aunque se utilice un agente dispersante o solubilizante. Además, largos periodos de incubación pueden resultar en la evaporación o descomposición de algunos de sus componentes durante el tiempo de ensayo (44).

La actividad inhibitoria de determinados compuestos fenólicos puede ser afectada por una alta cantidad de proteínas en el alimento. Según un estudio realizado con aceite esencial de salvia, la actividad antimicrobiana del mismo disminuía cuando se lo incorporaba a un alimento con bajo contenido de agua y alto contenido de grasas y proteínas. Debido a su naturaleza hidrofóbica, los aceites esenciales son mucho más solubles en los lípidos del alimento que en su fase acuosa. Así, de la cantidad inicial de un aceite esencial, solamente una parte queda libre para exhibir el efecto antibacteriano (85, 59).

Nuevas experiencias serán requeridas para evaluar la actividad antimicrobiana tanto de orégano como de tomillo en materiales in situ. Para milanesas de soja, uno de las modificaciones que se sugiere a partir de las experiencias realizadas es un método de envasado que permita mantener el aceite esencial a las concentraciones deseadas en el producto alimenticio por un periodo de tiempo mayor. Por otra parte, la incorporación de combinaciones de aceites esenciales en el alimento podría aumentar la actividad inhibitoria de los



mismos. Asimismo, el uso de conservantes tradicionales en combinación con aceites esenciales podría potenciar los efectos antimicrobianos.

A partir de numerosos estudios sobre propiedades antioxidantes de especias, se ha podido concluir que salvia y romero son las especias más efectivas en retardar el proceso de oxidación de grasas y aceites y, por otro lado, orégano y tomillo tienen mayor actividad antioxidante que otras especias (34). Un nuevo aporte a la utilidad de los productos oleosos de especias es analizar la actividad antioxidante de los aceites esenciales obtenidos a partir de plantas cultivadas en las Sierras de Córdoba con el propósito de incorporarlos a distintos alimentos.

---

## **CONCLUSIONES**

---

---



## VI. CONCLUSIONES

### Composición química de los aceites esenciales

- ↓ El aceite esencial de orégano utilizado en nuestro estudio presentó el componente fenólico timol, pero no se detectó carvacrol.
- ± La composición química de los aceites esenciales tanto de romero como de salvia se caracterizó por la presencia predominante del compuesto 1,8-cineol.
- ↓ El aceite esencial de tomillo presentó los compuestos fenólicos carvacrol y timol.

### Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

- ± La actividad antibacteriana *in vitro* de los cuatro aceites esenciales probados fue diferente, lo cual sugiere una variada susceptibilidad de los distintos microorganismos frente a estas sustancias oleosas.
- ± Todas las especies bacterianas, con excepción de *Pseudomonas aeruginosa*, fueron inhibidas por las muestras oleosas de orégano, romero y tomillo.
- ± El aceite esencial de orégano presentó una buena actividad antimicrobiana sobre las cepas ensayadas (actividad bacteriostática), destacándose actividad bactericida sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp.
- ± El aceite esencial de romero mostró una moderada actividad antimicrobiana sobre las cepas ensayadas.
- ± El aceite esencial de salvia presentó una baja actividad antibacteriana, pues no tuvo acción sobre las cepas Gram-negativo *Salmonella* sp., *Escherichia coli* y *Enterobacter* sp.
- ↓ El aceite esencial de tomillo exhibió la mejor actividad antimicrobiana frente a las cepas ensayadas, y presentó actividad bactericida sobre *Salmonella* sp. y *E.coli*.
- ↓ La actividad antimicrobiana exhibida por los aceites esenciales de orégano y tomillo en los estudios *in vitro* resalta la importancia de la utilización de estos compuestos naturales como conservantes de alimentos, ya que tienen actividad bactericida sobre importantes cepas patógenas humanas.

### Determinación de las asociaciones entre aceites esenciales

- ✚ Las combinaciones de los aceites esenciales ensayados (orégano-tomillo, orégano-romero, tomillo-romero) se comportan antagónicamente sobre las bacterias Gram-positivo y Gram-negativo probadas.

### Análisis microbiológico del producto alimenticio almacenado

#### - Calidad microbiológica del alimento

- ✚ La carga microbiana inicial de las milanesas de soja analizadas fue moderada en los ensayos realizados.
- ✚ Se considera que el producto alimenticio analizado presenta una calidad microbiológica aceptable, al inicio de la producción
- ✚ No se observó desarrollo de microorganismos patógenos en ninguna de las muestras analizadas.
- ✚ Las determinaciones microbiológicas de las muestras con adición de aceite esencial de orégano y tomillo muestran menor actividad antimicrobiana que los ensayos *in vitro*.
- ✚ Las condiciones de envasado utilizadas (film de alta permeabilidad de oxígeno y envasado aeróbico) podrían ser causales de que los aceites esenciales de orégano y tomillo sufrieran oxidación, y por ende pérdida de su acción inhibitoria sobre la flora del alimento.

#### - Temperaturas y tiempos de almacenamiento

- ✚ Las temperaturas de 25 °C y 4 °C no se consideran apropiadas para la conservación de milanesas de soja en un periodo de 7 días de almacenamiento.
- ✚ La combinación de aceite esencial de orégano y la temperatura de -20°C inhibió el desarrollo de bacterias coliformes totales.
- ✚ La combinación de aceite esencial de tomillo y de temperatura de -20 °C inhibió el desarrollo de microorganismos aerobios mesófilos viables totales y de hongos y levaduras.

- ✦ La temperatura de -20 °C mantuvo en óptimas condiciones microbiológicas el producto alimenticio de soja en todo el tiempo que duró el ensayo.

- Proyecciones futuras

- ✦ Los alimentos derivados de la soja han adquirido mucha importancia en los últimos años, ya que pueden reemplazar y competir con alimentos de origen animal, por lo cual es imprescindible continuar con estudios con aceites esenciales ya que estos productos naturales pueden reemplazar a los conservantes químicos.
- ✦ Los aceites esenciales de orégano y tomillo presentaron la mejor actividad antimicrobiana *in vitro* sobre cepas bacterianas aisladas de alimentos. Estos aceites esenciales agregados a productos alimenticios derivados de soja mostraron inhibición del desarrollo de la flora microbiana existente en el alimento, particularmente de hongos, levaduras y coliformes totales. Por lo tanto se sugiere:
  - ✦ Utilizar un método de envasado que permita mantener el aceite esencial a las concentraciones deseadas en el producto alimenticio por un periodo de tiempo prolongado.
  - ✦ Realizar experiencias con el alimento derivado de soja esterilizado y agregar en el un inóculo microbiano de concentración conocida y establecer las variaciones de la misma, evaluando distintos tiempos, temperaturas de conservación y concentraciones de aceites esenciales de orégano y tomillo.
  - ✦ Incorporar combinaciones de aceites esenciales con conservantes tradicionales para potenciar los efectos antimicrobianos.
  - ✦ Analizar la actividad antioxidante de aceites esenciales con el fin de ser incorporados a los alimentos para prolongar su vida útil.



---

## **BIBLIOGRAFIA**

---

---

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. **Albado Plaus, E.; Saez Flores, G. & Gabriel Ataucusi, S.** 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev. Med. Hered.* **12**(1): 16-19.
2. **Anbarasu, K. & Vijayalakshmi, G.** 2007. Improved shelf life of protein-rich tofu using *Ocimum sanctum* (tulsi) extracts to benefit indian rural population. *Journal of Food Science.* **72**(8): M300-M305.
3. **Appendini, P. & Hotchkiss, J.** 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovate Food Science & Emerging Technologies.* **3**: 113-126.
4. **Bagamboula, C. F.; Uyttendaele, M. & Debevere, J.** 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology.* **21**: 33-42.
5. **Bamba, D.; Bessiére, J.; Péliissier Y. & Fourasté I.** 1993. Essential oil of *Eupatorium odoratum*. *Planta Médica* **59**: 184.
6. **Baudoux, D.** 2000. Antiviral and antimicrobial properties of essential oils. *Aromatherapy.* **1**: 1-10.
7. **Baydar, H.; Sağdıç, O.; Özkan, G. & Karadoğan, T.** 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control.* **15**(3): 169-172.
8. **Berzins, M. L. & Romagnoli, S.** 2004. Cultivo de plantas aromáticas. Revista Fruticultura & Diversificación N°47. INTA Alto Valle. [http://www.inta.gov.ar/altovalle/info/biblio/rompecabezas/pdfs/fyd47\\_org.pdf](http://www.inta.gov.ar/altovalle/info/biblio/rompecabezas/pdfs/fyd47_org.pdf).
9. **Bhaskara Reddy, M. V.; Angers, P.; Gosselin, A. & Arul, J.** 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry.* **47**(8): 1515-1520.
10. **Botsoglou, N. A.; Fletouris, D. J.; Florou-Paneri, P.; Christaki, E. & Spais, A. B.** 2003. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary *oregano* essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation. *Food Research International.* **36**: 207-213.

11. **Burt, S.** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*. **94**: 223-253.
12. **Burt, S.; Vlieland, R.; Haagsman, H. P. & Veldhuizen, E. J. A.** 2005. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of foods stabilizers. *Journal of Food Protection*. **68**(5): 919-926.
13. **Ciccio, J. & Poveda, L.** 1999. Volatile constituents of *Cunila polyantha* (Lamiaceae) from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **47**(3): 377-379.
14. **Código Alimentario Argentino.** 2007. Capítulo VI: Alimentos cárneos y afines. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/CAPITULOVI.pdf>
15. **Cosentino, S.; Tuberso, C. I. G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E. & Palmas, F.** 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. **29**: 130-135.
16. **Cowan, M. M.** 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Reviews*. **12**(4): 564-582.
17. **Daferera, D. J.; Ziogas, B. N. & Polissiou, M. G.** 2000. GC-MS análisis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 2576-2581.
18. **De Feo, V.; Ricciardi, A.; Biscardi, D. & Senatore, F.** 1998. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epl.(Laminaceae). *Journal of Essential Oil Research*. **10**: 61-65.
19. **Delaquis, P.J.; Stanich, K.; Girard, B. & Mazza, G.** 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucaliptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. **74**: 101-109.
20. **Demo, M., Oliva, M.; Zunino, M.; López, M. & Zygadlo, J.** 2002. Aromatic plants from Yungas. Part IV: composition and antimicrobial activity of *Myrcianthes pseudo-mato* essential oil. *Pharmaceutical Biology*. **40**(7): 481-484.
21. **Demo, M.; Oliva, M.; Ramos, B. & Zygadlo, J.** 2001. Determinación de actividad antimicrobiana de componentes puros de aceites esenciales. *Revista Higiene Alimentar*. **15**(5): 87-90.



22. **Didry, N.; Dubreuil, L. & Pinkas, M.** 1993. Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldéhyde cinnamique seuls ou associés. *Pharmazie*. **48**(4): 301-304.
23. **Dorman, H. J. D. & Deans, S. G.** 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. **88**: 308-316.
24. **Elder, H.** 2005. Operaciones unitarias y procesos post-cosecha aplicados a especies aromáticas y medicinales. En *Plantas aromáticas y medicinales y sus derivados industriales*. Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto, pp 63-66. ISBN: 950-665-355-0.
25. **Feng, W., X. Zheng.** 2007. Essential oils to control *Alternaria alternate* in vivo and in vitro. *Food Control*. **18**: 1126-1130.
26. **Food Science Australia.** 1994. Active Packaging <http://www.foodscience.csiro.au/actpac-text.htm>.
27. **Friedman, M.; Henika, P. R. & Mandrell, R. E.** 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*. **65**(10): 1545-1560.
28. **Fukushima, D.** 2001. Recent progress in research and technology on soybeans. *Food Science and Technology Research*. **7**(1): 8-16.
29. **Fyfe, L.; Armstrong, F. & Stewart, J.** 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* by combinations of plants oils and derivatives of benzoic acid: the development of synergistic antimicrobial combinations. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **9**: 195-199.
30. **Gallucci, N.** 2005. Interacción entre terpenos y su influencia en la actividad antimicrobiana. Trabajo final para optar al título de Microbiólogo. Universidad Nacional de Río Cuarto.
31. **Goulas, A. E. & Kontominas, M. G.** 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*. **100**: 287-296.
32. **Hammer, K. A.; Carson, C. F. & Riley, T. V.** 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. **86**: 985-990.

33. Helander, I. M.; Alakomi, H. L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E. J.; Gorris, L. G. M. & von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **46**: 3590-3595.
34. Hirasu, K. & Takemasa, M. 1998. Spices Science and Technology. Ed. Marcel Dekker, Inc.
35. Holley, R. & Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. **22**: 273-292.
36. Hong, S-I. & Krochta, J. 2006. Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base fil and protein type. *Journal of Food Engineering*. **77**: 739-745.
37. Hsieh, P-C.; Mau, J-L. & Huang, S-H. 2001. Antimicrobial effect of various combinations of plants extracts. *Food microbiology*. **18**: 35-43.
38. Hudaib, M.; Speroni, E.; Di Pietra, A. & Cavrini, V. 2002. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **29**: 691-700.
39. Iglesias. E.; Cabezas, L. & Fernández Nuevo, J. L. 2006. Informe de Vigilancia 6Tecnológica. Tecnologías de envasado en atmósfera protectora. [www.madrimasd.org/biotecnologia/Informes/Downloads\\_GetFile.aspx?id=5987](http://www.madrimasd.org/biotecnologia/Informes/Downloads_GetFile.aspx?id=5987).
40. Inouye, S.; Takizawa, T. & Yamaguchi, H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **47**: 565-573.
41. **International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)**. 1983. Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos. Volumen I. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
42. Ipek, E.; Zeytinoglu, H.; Okay, S.; Tuylu, B.; Kurkcuoglu, M. & Husnu Can Baser, K. 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*. **93**: 551-556.

43. **Jerković, I.; Mastelić, J. & Miloš, M.** 2001. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. *International Journal of Food Science and Technology*. **36**: 649-654.
44. **Kalembe, D. & Kunicka, A.** 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medical Chemistry*. **10**: 813-829.
45. **Karpouhtsis, I.; Pardali, E.; Feggou, E.; Kokkini, S.; Scouras, Z. & Mavragani-Tsipidou, P.** 1998. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **46**:1111-1115.
46. **Koutsoumanis, K.; Lampropoulou, K. & Nychas, G-J.E.** 1999. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *International Journal of Food Microbiology*. **49**: 63-74.
47. **Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V. & Milos, M.** 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. **85**: 633-640.
48. **Lambert, R. J. W.; Skandamis, P. N.; Coote, P. J. & Nychas, G-J. E.** 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. **91**: 453-462.
49. **Liu, K.** 2000. Expanding soybean food utilization. *Food Technology*. **54**(7): 46-58.
50. **Madigan, M. T.; Martinko, J. M. & Parker, J.** 1998. Brock. Biología de los Microorganismos. Octava Edición. Ed. Prentice Hall International, España. pp: 70-75.
51. **Mann, C. M. & Markham, J. L.** 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. **84**: 538-544.
52. **Marino, M.; Versan, C. & Comi, G.** 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. Measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection*. **62**(9): 1017-1023.

53. **Marino, M.; Versan, C. & Comi, G.** 2001. Impedance measurements study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*. **67**: 187-195.
54. **Masango, P.** 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*. **13**: 833-839.
55. **Moreira, M. R.; Ponce, A. G.; del Valle, C. E. & Roura, S. I.** 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*. **38**: 565-570.
56. **Muñoz, F.** 1993. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Reimpresión Primera Edición 1987. Ediciones Mundi-Prensa, España. ISBN: 84-7114-175-2.
57. **Nevas, M.; Korhonen, A.-R.; Lindström, M.; Turkki, P. & Korkeala, H.** 2004. Research note: Antibacterial efficiency of finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection*. **67(1)**: 199-202.
58. **Nielsen, P. V. & Rios, R.** 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*. **60**: 219-229.
59. **Nychas, G.-J. E.; Tassou, C. C. & Skandamis, P. N.** 2003. Antimicrobials from herbs and spices (eds Roller). In Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Capítulo 9, pp. 176-200. Woodhead Publishers.
60. **Oussalah M.; Caillet, S.; Saucier, L. & Lacroix, M.** 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*. **73**: 236-244.
61. **Oussalah M.; Caillet, S.; Saucier, L. & Lacroix, M.** 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. **18**: 414-420.
62. **Özcan, M. & Erkmen, O.** 2001. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *Eur. Food Res. Technol.* **212**: 658-660.
63. **Pascual Anderson, M. del R.** 1992. Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Ed. Díaz de Santos, S.A. España.

64. **Paster, N.; Menasherov, M.; Ravid, U. & Juven, B.** 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*. **58**: 81-85.
65. **Preuss, H.; Echard, B.; Enig, M.; Brook, I. & Elliot, T.** 2005. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **272**: 29-34.
66. **Pszczola, D.** 2000. Soy: Why its moving into the mainstream. *Food Technology*. **54**(9): 76-86.
67. **Ridner, E.** 2006. Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud. ISBN 987-23125-0-8. Primera Edición. Buenos Aires: Grupo Q S.A. Sociedad Argentina de Nutrición.
68. **Sağdıç, O. & Özcan, M.** 2003. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*. **14**: 141-143.
69. **Sánchez, M.; Turina, A.; García, D.; Nolan, M. V. & Perillo, M. A.** 2004. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **34**: 77-86.
70. **Santos-Gomes, P.; Seabra, R.; Andrade, P. & Fernández-Ferreira, M.** 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*. **162**: 981-987.
71. **Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Lanaras, T. & Arsenakis, M.** 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44**: 1202-1205.
72. **Skandamis, P. N. & Nychas, G-J. E.** 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. **91**: 1011-1022.
73. **Skandamis, P. N. & Nychas, G-J. E.** 2002. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*. **79**: 35-45.
74. **Skandamis, P. N.; Michailidou, E. & Nychas, G-J. E.** 1999a. Modeling the effect of oregano (*Origanum vulgare*) on the growth/survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in broth and traditional Mediterranean foods "International Congress on "Improved Traditional Foods for the next Century" Valencia 28-29/1999, Spain. pp: 270-273.



75. **Skandamis, P.; Koutsoumanis, K.; Fasseas, K. & Nychas, G-J. E.** 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Ital. Journal of Food Science*. **1**(13): 65-75.
76. **Skandamis, P.; Tsigarida, E. & Nychas, G-J. E.** 2000. Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **16**: 31-35.
77. **Skandamis, P.; Tsigarida, E. & Nychas, G-J. E.** 2002a. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*. **19**: 97-103.
78. **Skandamis, P.; Tsigarida, E. & Nychas, G-J. E.** 2002b. Effect of conventional and natural preservatives on the death/survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in Traditional Mediterranean salads; In Joint meeting of the SFAM & DSM "Frontiers in Microbial fermentation and Preservation" Wageningen, The Netherlands 9-11 January 2002.
79. **Smith-Palmer, A.; Stewart, J. & Fyfe, L.** 1998. Antimicrobial properties of plants essential oils essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. **26**: 118-122.
80. **Smith-Palmer, A.; Stewart, J. & Fyfe, L.** 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*. **18**: 463-470.
81. **Souza, E. L.; Stamford, T. L. M., Lima, E. O. & Trajano, V. N.** 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*. **18**: 409-413.
82. **Suárez, D.** 2005. Producción de especies aromáticas en el Valle de Traslasierra. Cálculo de costos operativos. En *Plantas aromáticas y medicinales y sus derivados industriales*. Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto, pp 63-66. ISBN: 950-665-355-0.
83. **Suhr, K. I. & Nielsen, P.V.** 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*. **94**: 665-674.



84. **Svoboda, K. P. & Hampson, J. B.** 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK, KA6 5HW.
85. **Tassou, C. C.; Drosinos, E. H. & Nychas, G-J. E.** 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10 °C. *Journal of Applied Microbiology*. **78** (6): 593-600.
86. **Tassou, C. C.; Drosinos, E. H. & Nychas, G-J. E.** 1996. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano and lemon juice under modified atmosphere or air. *Journal of Food Protection*. **59**(1): 31-34.
87. **Tepe, B.; Akpulat, H. A.; Sokmen, M.; Daferera, D.; Yumrutas, O.; Aydin, E.; Polissiou, M. & Sokmen, A.** 2006. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*. **97**: 719-724.
88. **Tiziana Baratta, M.; Dorman, H.; Deans, S.; Figuereido, A.; Barroso, J. & Ruberto, G.** 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. **13**: 235-244.
89. **Tsigarida, E.; Skandamis, P. & Nychas, G-J. E.** 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology*. **89**: 901-909.
90. **Ultee, A.; Bennik, M. H. J. & Moezelaar, R.** 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**(4): 1561-1568.
91. **Valero, M. & Salmerón, M.** 2002. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*. **2648**:1-9.
92. **Vanden Berghe, D. & Vlielnick, A.** 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. Meth. in plants. *Biochem.* **6**: 47-67.

93. **Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. F.** 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Third Edition. Ed. American Public Health Association, Washington D.C.
94. **Wallace, R. J.** 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*. **63**: 621-629.
95. **Yesil Celitkas, O.; Hames Kocabas, E. E.; Bedir, E.; Vardar Sukan, F.; Ozek, T. & Baser, K. H. C.** 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. **100**: 553-559.
96. **Zygadlo, J. & Juliani, H. (Jr.)**. 2000. Bioactivity of essential oils components. *Current Topics in Phytochemistry*. **3**: 203-214.
97. **Zygadlo, J.** 2006. Los aceites esenciales como productos bioactivos. En *Reunión de Biotecnología Aplicada a Plantas Medicinales y Aromáticas. Córdoba, Argentina*. Ed. Alejandro Escandón, Marta Goleniowski. pp: 59.

U.N.R.C.  
Biblioteca Central



65869

65869

MAI 2 1958





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO**  
**Microbióloga Daniela Lombardo**  
**Noviembre de 2008**