BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*), TOMILLO (*Thymus vulgaris*) Y NARANJA (*Citrus × aurantium*) EN FASE DE VAPOR SOBRE *Salmonella tiphy* EN UN EMULSIONADO CÁRNICO

TESIS PRESENTADA PARA OBENER EL GRADO DE:
LICENCIATURA EN INGENIERIA EN ALIMENTOS

PRESENTADO POR:
MITCHEL RIVERA HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN JOSÉ LUNA GUEVARA

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MA. LORENA LUNA GUEVARA

H. Puebla de Z. a noviembre de 2019

“Basta. Cuando la ciencia ha hablado, tu deber es callar.”

Julio Verne, Viaje al centro de la tierra.

Dedicatoria

El esfuerzo que representa este trabajo de investigación no tiene más dedicación que a estos lectores quienes toman de su tiempo para reforzar y continuar con aquella belleza única del hombre: la búsqueda del conocimiento y el saber.

Agradecimientos

La construcción de este trabajo no pudo haber sido sin los doctores Juan José y María Lorena Luna Guevara, cuya paciencia y medios fungieron como antorchas que me iluminaron a lo largo del camino del mundo de la investigación, gracias por ser la guía en el camino.

Gracias a M.C. Madai Sánchez por el excelente trabajo y tutela en el laboratorio de análisis y microbiología de alimentos; así como a su equipo: Carlitos, Jurgüen, Any y Luz.

No pudo haber mejor trabajo y compañía como la de Daniela Pineda cuya única forma de ser, buen humor, compromiso, disposición y compañía ayudaron a la parte experimental de manera significativa en este proyecto. Gracias Dani.

Gracias a Dulce, Tomasa, Miriam, Rafael, Berenice, Carla e Ivett quienes estuvieron presentes moralmente en la formación de esta tesis y haciendo que la universidad de sintiera como un segundo hogar.

Gracias a Estefanía, Yessenia y a Melina por su apoyo moral y amistad que fue fundamental para la realización de esta tesis.

Gracias a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla que me permitió ser parte de ella y por ser un hogar para la sabiduría y el conocimiento.

Y por último y no por ello menos importante a mi madre Isabel Hernández cuya energía, apoyo y amor ayudaron a llegar hasta esta meta.

Índice general

Introducción 1

Justificación 3

Objetivo general 4

Objetivos específicos 4

Hipótesis 5

Plan de trabajo 6

I. Antecedentes 7

1.1 Emulsionados cárnicos 7

1.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) relacionadas con el consumo de productos cárnicos. 8

1.2.1 *Salmonella* 9

1.3 Aceites esenciales y su capacidad antimicrobiana 10

1.3.1 Compuestos bioactivos en los aceites esenciales 11

1.4 Métodos de extracción de aceites esenciales 13

1.4.1 Extracción por disolventes 13

1.4.2 Extracción por fluidos supercríticos 13

1.4.3 Extracción por arrastre de vapor 14

1.5 Aceites esenciales en fase vapor y su actividad antimicrobiana 15

1.5.1 Aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare)* en fase vapor 17

1.5.2 Aceite esencial de tomillo en fase vapor (*Thymus vulgaris)* 18

1.5.3 Aceite esencial de naranja en fase vapor (*Citrus x aurantium*) 18

II. Materiales y métodos 20

2.1 Obtención de la materia prima 20

2.2 Métodos 20

2.2.1 Caracterización y acondicionamiento de la cáscara de naranja 20

2.2.2 Extracción de los aceites esenciales 21

2.2.3 Análisis del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales en su fase vapor sobre el emulsionado cárnico. 22

2.2.3.1 Preparación del microorganismo 22

2.2.3.2 Inoculación del producto cárnico 22

2.2.3.3 Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales 22

2.2.3.4 Recuentos microbianos 23

2.2.4 Confirmación de la presencia de *Salmonella entérica* 23

2.2.5 Evaluación sensorial 23

2.2.6 Análisis estadístico 23

III. Resultados y discusión 24

3.1 Determinación de humedad e índice de madurez en naranja 24

3.2 Extracción del aceite esencial 24

3.3* Análisis del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales sobre el emulsionado cárnico e inhibición de *Salmonella entérica. 25

3.4 Evaluación sensorial 33

IV. Conclusiones 37

Bibliografía 38

Anexo 1: Papeleta de evaluación sensorial 45

Índice de figuras

I. Antecedentes

Figura 1. Salchicha tipo Viena……....7

Figura 2. Equipo de hidrodestilación……...14

Figura 3. Mecanismo de acción del aceite esencial en fase vapor……..17

II. Materiales y métodos

Figura 4. Extracción del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)……..… 21

Figura 5. Acondicionamiento de cámaras……..…22

III. Resultados y discusión

Figura 6. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) en fase vapor sobre *Salmonella entérica* en concentraciones de o, 700, 1000, 1500 y 2000ppm en periodos de 0,72 y 144h……..27

Figura 7. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de tomillo (Thymus vulgaris) en fase vapor sobre *Salmonella entérica* en concentraciones de 0, 700, 1000, 1500 y 2000pm en periodos de 0, 72 y 144h……..…….....28

Figura 8. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de naranja (Citrus × aurantium) en su fase vapor sobre *Salmonella entérica* en concentraciones de 0, 700, 1000, 1500 y 2000ppm en periodos de tiempo de 0, 72 y 144h……..….29

Figura 9. Muestras positivas (Fondo amarillo/anaranjado) de *SALMONELLA* AND *LISTERA* ASSAY METHODS AND KITS para *Salmonella entérica* después del tratamiento con aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) a 2000ppm por 144h……..……32

Figura 10. Evaluación sensorial del tratamient*o*……..33

Figura 11. Resultados de la evaluación sensorial de la salchicha en contacto por 144h con aceite esencial de orégano *(Origanum vulgare)* en fase vapor a 2000ppm……34

Figura 12. Resultado s de la evaluación sensorial de la salchicha en contacto por 144h con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris)* en fase vapor a 2000ppm……35

Figura 13. Resultado s de la evaluación sensorial de la salchicha en contacto por 144h con aceite esencial de naranja *(Citrus × aurantium)* en fase vapor a 2000ppm……36

Índice de tablas

I. ANTECEDENES

Tabla 1. Compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales ……..12

II. RESULTADOS Y DISCISION

Tabla 2. Variables registradas en los procesos de extracción los aceites esenciales de orégano (Origanum vulgare), tomillo (Thymus vulgaris) y naranja (Citrus × aurantium ……...25

Tabla 3. Reducciones logarítmicas de Salmonella entérica inoculada en emulsionados cárnicos con diferentes contenidos de agentes antimicrobianos ……..……..…...26

Tabla 4. Evaluación sensorial de salchicha tipo Viena al contacto con la fase de vapor de diferentes aceites esenciales……...….….33

Introducción

La inocuidad alimentaria es un factor muy importante en la industria de los alimentos ya que asegurar el bienestar del consumidor es una de sus principales responsabilidades. Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) tienen un papel preponderante en cualquier industria alimentaria, al realizarlas de manera correcta se puede prevenir la contaminación de los alimentos. Los alimentos cárnicos tienden a ser más susceptibles a la contaminación biológica y pueden constituirse en un vehículo para la propagación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) (Bhandare S. G. *et al.,* 2007). Durante el sacrificio y procesamiento, todos los tejidos potencialmente comestibles pueden estar sujetos a contaminación por diversas fuentes, ya sea internas o externas al animal. En animales vivos, las superficies en contacto con el medio ambiente albergan una variedad de microorganismos, por lo que en muchas ocasiones los contaminantes provienen de la piel del animal, o bien, de aquellos presentes en heces. Asimismo, algunos investigadores han determinado que las carnes procesadas son más idóneas a contaminarse por microorganismos patógenos presentes en el equipo, el agua, cuchillos o el aire a lo largo de su procesamiento. (Skandamis, P. N. *et al*., 2010)

Por otro lado, durante el proceso de elaboración de la salchicha tipo Viena, intervienen diversos procesos en los que la contaminación bacteriana puede ocurrir; por lo anterior en su totalidad las empresas deben llevar un proceso estricto para el control de las buenas prácticas de manufactura. Un ejemplo de ello es el caso reportado por Torres, M. *et al.,* (2013) quienes encontraron la presencia de *Salmonella entérica* en muestras de jamón visking, chorizo y jamonada especial, en diferentes puntos de venta en la ciudad de La Habana. Estos casos, contribuyen a que este problema sea reconocido como de alto impacto en la seguridad e inocuidad alimentaria, principalmente para la industria de carne de bovino (Callaway, T. R. *et al*., 2003).

Un alimento contaminado por algún microorganismo patógeno puede causar desde enfermedades leves hasta la muerte del consumidor. Por lo anterior, actualmente se usan diferentes métodos de conservación de los alimentos, utilizando conservadores

químicos que pueden reducir la carga microbiana y brindar confianza al consumidor. Sin embargo, el uso de ciertos compuestos antimicrobianos puede estar relacionado con problemas a la salud debido a su consumo a largo plazo.

Una alternativa al uso de conservadores convencionales es el aceite esencial proveniente de especias, a los cuales se les han atribuido diferentes propiedades en la industria farmacéutica para prevenir y tratar enfermedades (Edris, A. E., 2007). De igual manera, tienen un uso potencial en la industria alimentaria como agentes antibacterianos gracias a los compuestos orgánicos que los constituyen como: el carvacol, el thymol, eugenol, entre otros. Burt, S. (2004), realizó un estudio sobre el efecto de estos compuestos en carne fresca y procesada, leche, pescado, vegetales, frutas y arroz cocido. La efectividad de su tratamiento fue a concentraciones de 0.5 a 20µl/g, teniendo una actividad antimicrobiana contra: *Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, Escherichia coli O157:H7, Shigella dysenteria, Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* sin embargo, y de acuerdo a las concentraciones utilizadas de aceite, se generaron alteraciones organolépticas o sensoriales en el producto estudiado.

Algunas investigaciones, han evaluado el uso de aceites esenciales aplicados en fase vapor ya que estos también poseen una capacidad antimicrobiana. El estudio realizado por Ávila-Sosa, R. *et al.* (2012), demostró la efectividad del aceite esencial de orégano como un inhibidor de actividad fúngica y bacteriana. Asimismo, Fisher, K. & Phillips C.A. (2006), utilizaron aceite esencial de naranja (*Citrus × aurantium*) sobre un diverso grupo de bacterias gram negativas sobre sistemas alimentarios tales como hojas de repollo y piel de pollo; su aplicación en forma directa demostró su efectividad en comparación con otros aceites de otras especies de frutos. Por lo anterior, ello, que el objetivo del presente trabajo es la evaluación de la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales en fase de vapor provenientes de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y naranja (*Citrus × aurantium*), contra *Salmonella tiphy* en un emulsionado cárnico.

Justificación

La carne molida de res es un medio ideal para el crecimiento de *Salmonella* ya que es rica en nutrientes y no contiene agentes inhibidores, es por ello que estos alimentos se han identificado comúnmente como responsables de brotes por este patógeno (McLaughlin J. B. *et al*., 2006). Algunos estudios reportan 1.4 millones de incidentes por año en Estados Unidos de Norteamérica (Bertrand, S. *et al*., 2010).

En la actualidad, existe una tendencia a sustituir los conservadores sintéticos por naturales con la finalidad de poder generar un consumo de alimentos seguro, de buena calidad y lo más naturales posibles. Debido a esto, han existido numerosas investigaciones que indican el beneficioso efecto antimicrobiano de los aceites esenciales extraídos de diferentes tipos de plantas y especias (Inouye, S. *et al*., 2001).

La necesidad de asegurar a la población que los alimentos cárnicos que consumen sean inocuos hace necesario encontrar nuevas formas de poder alargar la vida útil del mismo. Reduciendo el uso de agentes conservadores que a largo plazo pueden resultar tóxicos para la salud (Villada, J. 2010).

Es por ello que la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales en fase vapor puede representar una opción viable en la industria alimentaria como conservadores naturales. Su uso es una ventaja sustancial, puesto que los estudios realizados por Alzamora, S. *et al.* (2005) y Fisher, K. & Phillips C.A. (2006), confirman que poseen la misma eficacia que una aplicación directa. Asimismo, presentan importantes ventajas, ya que su utilización en fase de vapor disminuye las alteraciones sensoriales del producto.

Objetivo general

Evaluar la capacidad antimicrobiana aceites esenciales de orégano, tomillo y naranja sobre *Salmonella tiphy* y su aplicación por difusión en un emulsionado cárnico

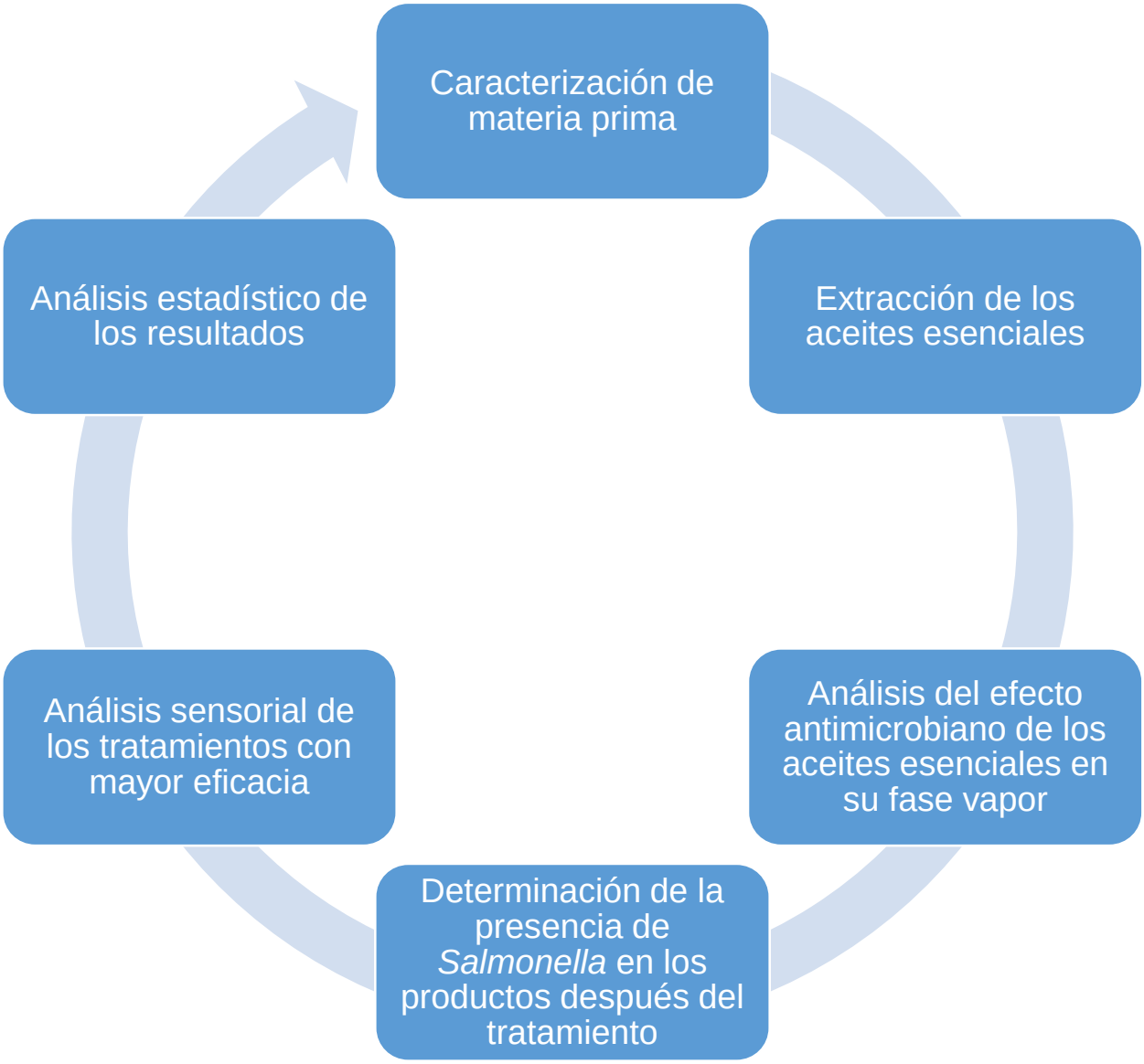
Objetivos específicos

- Extraer el aceite esencial del orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cascara de naranja (*Citrus × aurantium)* por el método de hidrodestilación.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales aplicados por difusión sobre *Salmonella tiphy* en un emulsionado cárnico en concentraciones de 0, 700, 1000,1500 y 2000ppm.
- Evaluar sensorialmente el producto cárnico emulsionado posteriormente a la aplicación de los aceites esenciales con un panel de 40 jueces no entrenados en una escala hedónica de 5 puntos.
- Analizar estadísticamente, si existe un efecto significativo de los tratamientos con concentraciones de 0, 700, 1000,1500 y 2000ppm, sobre el crecimiento de *Salmonella* tiphy a las 0, 72 y 144 h en un emulsionado cárnico.

Hipótesis

Los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y naranja (*Citrus* × *aurantium*) aplicados por difusión tienen capacidad antimicrobiana sobre *Salmonella tiphy* en un producto cárnico emulsionado.

Plan de trabajo



I. Antecedentes

1.1 Emulsionados cárnicos

La carne es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos patógenos puesto que representa el medio ideal para su proliferación Adams, M. & Marteau, P. (1995*)*. En México, la salchicha es el embutido predilecto, superando por poco al jamón, el chorizo y la longaniza; su consumo per cápita anual es de 3.91 kg y se estima que se vendieron 10 mil 312 millones de pesos de salchicha tan solo en 2014. (Chemnitz, C. & Becheva, S., 2014)

Un embutido o emulsionado cárnico es un alimento de origen animal preparado a partir de ciertos ingredientes tales como: carne picada, grasas, sal, condimentos, especias y aditivos; introducidos en tripas naturales o artificiales (Colmenero, F. J., 1996). Este proceso de elaboración sigue cuatro pasos fundamentales: la extracción de proteínas, hidratación y activación de las proteínas, la formación de la emulsión y la formación del gel mediante el cocimiento de dicha emulsión (Terrel, R., 1980).

Los embutidos se clasifican de diferentes maneras: secos, semi secos, cocidos, curados, ahumados o frescos (USDA, 2011). Las salchichas (Fig. 1) se clasifican como embutidos cocidos y la materia prima para su elaboración son carnes de res y cerdo, hielo y grasa, comúnmente, lo cual determina su calidad y precio; carece de grasa interna y es capaz de fijar gran cantidad de agua (FAO, 2006).

Figura 1. Salchicha tipo Viena

1.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) relacionadas con el consumo de productos cárnicos.

Una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA), es producida por ingerir alimentos contaminados física, química o biológicamente, siendo esta última, la razón principal de sintomatologías tales como diarrea, fiebre, náuseas y vómitos, entre otros. En algunos casos, las complicaciones médicas se presentan por la producción de toxinas generadas por ciertos microorganismos, como la toxina Shiga causada por cepas de *Escherichia coli*, la cual provoca el síndrome hemolítico. (Linscott, A. J., 2011).

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), mencionan que las ETA, son uno de los principales problemas sanitarios, causando serias complicaciones principalmente en la población infantil, adultos de la tercera edad y mujeres embarazadas (OMS, 2002). De igual manera en países como Estados Unidos de Norteamérica, el Centro para el Control y Prevención de enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), reportaron en 2013 un total de 19,000 infecciones sanitarias de las cuales 80 fueron muertes (Kopper, G. *et al*., 2009).

Por otro lado, en el año 2011, el consumo de productos cárnicos procesados tales como el jamón y las salchichas, ocupaban aproximadamente un 90%, en la ciudad de México Guevara, J. J. L., & Beltrán, J. Á. G. (2013). La presencia de microrganismos patógenos es un factor indeseable en la cadena de producción de la industria cárnica, pues es una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales alrededor del mundo (McDonald, K., & Sun, D. W., 1999). Algunas investigaciones, han reportado que la presencia de estos patógenos procede principalmente de los manipuladores que por lo general contaminaban el alimento al momento la preparación o el almacenamiento del mismo (Torres-Vitela, M. R. *et al.,*2011).

Asimismo, en Colombia bacterias tales como *Staphilococcus coagulasa, Escherichia coli* y *Salmonella spp*., en el año 2010 fueron los brotes más comunes como agentes etiológicos (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013).

1.2.1 *Salmonella*

Jiménez, R. J., *et al.* (2010), describen a la *Salmonella* como una bacteria Gram negativa y anaerobia facultativa con forma bacilar, no esporulado y de la familia *Enterobacteriacae*. Gracias a sus antígenos O (liposcaradio), Vi (Polisacarido capsular y H (flagelar) pueden serotipliflicarse más de 2,300 serovariedades. *Salmonella* emplea fimbrias para lograr adherirse, además de un plásmido de virulencia que contribuye a la multiplicación dentro del sistema reticuloendotelial (Rotger, R. *et al*., 2010).

El consumo de carne de res contaminada con la citada bacteria puede provocar manifestaciones clínicas (salmonelosis y fiebre tifoidea). Su presencia, es el segundo lugar en frecuencia de infección en humanos, solo detrás de norovirus, y se reconoce que en general una de cada seis personas que se enferman por patógenos transmitidos por alimentos es debido a *Salmonella* (Scallan, E. *et al*., 2011).

Las fuentes más comunes de contaminación por *Salmonella* en los alimentos son: las aves de corral, huevo, pescado y productos frescos. Entre los más importantes hay que resaltar que la carne de res es un medio idóneo para la proliferación de *Salmonella*, debido a su alto nivel de nutrientes y por no contener agentes inhibidores, reportando 1.4 millones de incidentes por año en Estados Unidos (McLaughin, J. B. *et al.*, 2006).

En Canadá, *Salmonella* se presentó en el 1.3% de 1002 muestras de carne molida, proveniente de tiendas de autoservicio (Sorensen, O. *et al.*, 2002). Sin embargo, Stevens *et al.,* (2006), reportaron cuentas elevadas de este patógeno en países como Senegal, en donde la bacteria estuvo presente en muestras de carne de res cruda en puntos de venta hasta en un 87.4%.

En América latina, se han reportado de 200 a 500 casos por cada 100,000 habitantes por año (Sánchez, M. M., & Castro, N. M. C., 2004). En nuestro país, existen diferentes reportes de la presencia de *Salmonella* en carne molida, entre ellos lo reportado por Heredia, N. *et al.* (2001), en el cual el 11.4% de la carne se reportó con la presencia de este patógeno en Monterrey, Nuevo León y el más reciente es el realizado en el 2013, donde *Salmonella* está presente en un 56.7% de las muestras de carne adquiridas en carnicerías (Cabrera-Díaz *et al.,* 2013).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado la resistencia que tiene *Salmonella* ante diferentes antibióticos en diferentes cortes de carne de cerdo, tales como ácido nalidíxico, ampicilina, aztreonam, carbenicilina, cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol entre otros (Tessmann *et al*., 2008). Siendo *Salmonella,* en América Latina, el patógeno más frecuente en alimentos de origen animal que presenta resistencia antimicrobiana de las cuales fueron aisladas con mayor frecuencia *S. typhirium y S. enteritidis* (Quesada, A. *et al.*, 2016).

1.3 Aceites esenciales y su capacidad antimicrobiana

En diferentes lugares del mundo, existen variedades de plantas y especias, las cuales tienen utilidad de acuerdo con la región geográfica en la que se encuentren (Edris, A. E. 2007). La gran mayoría de estas plantas se han relacionado con propiedades antimicrobianas. Los principales componentes de las plantas, incluyen diversos compuestos bioactivos, de los cuales se pueden resaltar: taninos, alcaloides, ácidos orgánicos, entre otros. Los cuales de manera natural actúan como agentes de defensa o protección de las plantas y especias ante diversas infecciones microbiológicas que se pudieran encontrar en el ambiente (Inouye, S. *et al*., 2001).

La tendencia a buscar conservadores naturales que sustituyan a los sintéticos ha abierto una amplia gama de opciones entre las cuales se encuentran los aceites esenciales. (Nedorostova, L. *et al.,*2009). Actualmente en la industria alimentaria el uso de aceites esenciales se ha vuelto una tendencia gracias a las características bactericidas que presenta al tener un amplio espectro de inhibición microbiana y su origen natural. (Olivares-Cruz, M. A., & López-Malo, A., 2013).

Un aceite esencial es una mezcla de compuestos de carácter volátil, entre los cuales se encuentran principalmente terpenos, aldehídos y alcoholes presentes en las plantas de manera natural (Laird, K. & Philips, C., 2012). Recientemente, se han reportado diferentes aceites esenciales con una capacidad antimicrobiana significativa; característica tales como el rendimiento, capacidad antimicrobiana y la composición de los compuestos volátiles variara en el aceite esencial dependiendo del tipo de planta, las características de cultivo a la que fue sometida y la parte de la que sea extraída. (López-Malo, A. *et al.,* 2005).

1.3.1 Compuestos bioactivos en los aceites esenciales

Existen diversos compuestos bioactivos cuyos efectos proveen una gran variedad de beneficios en la salud humana, modulando diferentes funciones terapéuticas en el cuerpo y así mismo como antibióticos contra diferentes microrganismos (Roberfroid, M. B., 1999). Entre los diferentes compuestos se encuentran principalmente: polifenoles, fitoestrógenos, ácidos grasos esenciales y los monoterpenos; estos últimos presentes en su gran mayoría en los aceites esenciales.

La composición de los aceites esenciales varía de acuerdo con las diferentes partes de la planta de las que se desee extraer (Burt, S., 2004) y puesto que los compuestos volátiles que contiene son los de carácter antimicrobiano es importante determinar su composición. Investigaciones realizadas por Caccioni, D. R. *et al.* (1998), mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; demostraron que los componentes primarios se derivan de un grupo de terpenoides, sesquiterpenos y diterpenos. Por lo tanto, de acuerdo con el grupo funcional de cada aceite esencial se derivan sus componentes principales, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1.

La capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales puede ser evaluada como la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración mínima requerida del aceite esencial que tenga la capacidad de detener el crecimiento del microorganismo o la concentración mínima letal que sugiere una reducción del 99.9% de la población del microorganismo en cuestión (Burt, S., 2004).

Tal fue el caso de López, P. *et al.,* 2007, quienes probaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial extraído de diferentes especias como: canela (*Cinnamon zeylanium*), clavo (*Syzygium aromaticum*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y jengibre (*Zingiber officinalis*) sobre bacterias Gram positivas (*S. aureus, B. cereus, E. fecalis y Listeria monocytogenes)*; bacterias Gram negativas (*E. coli, Y. eterocolitica, S. cholerasuis y P aeruginosa*) y hongos (*A. flavus y P. islandium*); de estos aceites los que presentaron un mayor efecto inhibitorio fueron el aceite esencial de canela y de clavo, seguidos por el romero y finalmente el jengibre con una capacidad antimicrobiana muy baja.

Es importante mencionar que dicha actividad depende de las características propias del aceite: su carácter hidrófilo o hidrófobo, su capacidad de alterar y penetrar en la

estructura lipídica de la pared celular afectando las estructuras celulares y llevando a la desnaturalización proteica; sus componentes químicos, lo cuales actúan como agentes que interfieren con la fosforilación del ATP y el tipo de microorganismo al que se pretende inhibir (, Fisher, K. & Phillips C.A., 2008).

Tabla 1. Compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales

Grupo químico funcional	**Componentes**
Fenoles	Carvacol Eugenol Timol
Aldehídos	Citral Citronela Benzaldehido Perialdehido Cinamaldehido
Alcoholes	Terpenos Bomeol Mentol Geraniol Linalol Feniletanol
Alcoholes Sesquiterpenos	Famecol Cedrol
Cetonas	Alcanfor Carvona alfa tujona
Esteres	Acetato de lianlilo Salicilato de metil Etil Acetato Anetol
Esteres y oxidos	Metiltimol Anetol Cineol
Hidrocarburos	Careno beta-cariofileno alfa-pineno Limonento

Adaptada de Inouye, S. *et al.,* (2006).

Holley, R. A., & Patel, D. (2005) y Fisher, K. & Phillips C.A. (2008), mencionan que los compuestos fenólicos como el carvacrol, mentol y citronela son los responsables de las

propiedades antimicrobianas en algunos aceites esenciales, alterando la membrana y causando la fuga de protones e iones de potasio e inhibiendo la síntesis de ATP. Por otro lado, cabe destacar que las bacterias Gram negativas son más susceptibles a los efectos de los aceites esenciales, en comparación con las Gram positivas, debido a la hidrofobicidad del tipo de membrana que poseen.

1.4 Métodos de extracción de aceites esenciales

Para la obtención de los aceites esenciales se utilizan diferentes métodos.

1.4.1 Extracción por disolventes

En este proceso, la muestra seca es colocada en disolventes orgánicos como pueden ser el alcohol y cloroformo, principalmente. Estos solubilizan compuestos como: como compuestos esenciales, ceras y grasas obteniendo una oleorresina o extracto impuro. Es usado comúnmente en pequeña escala ya que industrialmente resulta costoso debido a los disolventes utilizados y se obtienen ciertos compuestos contaminados con otras sustancias, incrementando la posibilidad de que estos, hagan combustión ocasionando daños graves a la salud (Martínez, A., 2003).

Cabe mencionar que existen diversos daños perjudiciales a la salud debido a los disolventes utilizados si se tiene contacto directo con la piel o inhalados, esto referente a los disolventes derivados del petróleo, los cuales son usados comúnmente en esta técnica. El extracto puro con estos disolventes suele tener colores oscuros al arrastrar pigmentos. Este disolvente es filtrado y se evapora o se separa a temperaturas bajas.

1.4.2 Extracción por fluidos supercríticos

Es una operación unitaria que emplea el beneficio disolvente de fluidos supercríticos en condiciones por encima de su temperatura y presiones críticas. Este tipo de extracción es más rápida, al usar disolventes orgánicos convencionales, gracias a la volatilidad de los fluidos supercríticos (gases en condiciones ambientales normales) y las propiedades de transporte mejoradas (alta difusividad y baja viscosidad) (Del Valle, J. M. & Aguilera, J. K., 1999).

Las principales ventajas de esta técnica radican en los tiempos cortos de extracción y el rendimiento mayor que presenta, además de la posibilidad de seleccionar las sustancias y la composición de los extractos; entre las desventajas se encuentran que las ceras cuticulares y los compuestos de alto peso molecular son extraídos junto con el aceite esencial (Yamini, Y. *et al.,* 2008).

1.4.3 Extracción por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor es una técnica aplicada en la separación de sustancias poco solubles en agua y se emplea para separar una sustancia de una mezcla que posee un punto de ebullición muy alto y que se descomponen al destilar. Todo esto es por efecto de la temperatura del vapor (100°C), en un determinado tiempo, dando como consecuencia la ruptura del tejido del vegetal liberando el aceite esencial (Figura 2).

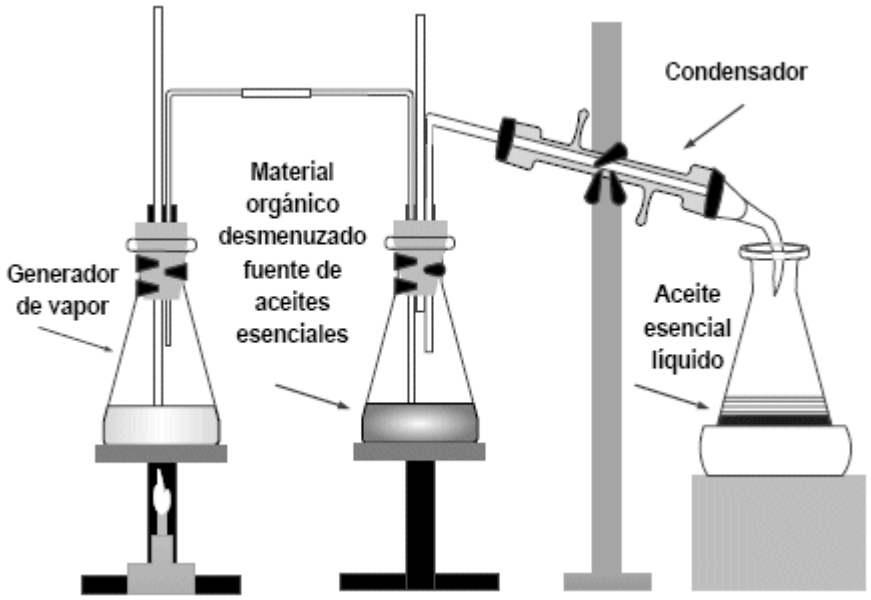


Figura 2. Equipo de hidrodestilación

La vaporización selectiva del componente volátil se realiza a través de una inyección de vapor de agua directamente en el seno de la mezcla, denominándose a este “vapor de arrastre”. Este vapor se condensará creando una fase inmiscible que cederá su calor a

la mezcla para que esta se pueda vaporizar, obteniendo dos fases, una orgánica y una acuosa, comportándose de manera independiente ejerciendo su propia presión de vapor (Wankat, P. C. 1988). Por lo anterior, se debe tomar en cuenta una condición importante: ya el componente volátil, y alguna impureza sean insolubles en agua para poder formar las dos fases al condensarse, permitiendo su separación del componente con el agua de manera sencilla. Es posible utilizar un gas inerte para el arrastre en lugar de agua sin embargo el empleo de estos vapores, pueden generar problemas adicionales en la condensación y en la recuperación del destilado o gas.

Una ventaja de utilizar el método de arrastre por vapor es que el destilado obtenido será puro en relación al componente no volátil, aunque requiere una decantación para ser separado del agua, otra ventaja es el bajo costo que tiene el realizarlo, así como su sencillez para su obtención. Sin embargo, el inconveniente es que se requiere de largos periodos de tiempo (Peredo, H. *et al.,* 2009).

En muchos procesos de destilación por arrastre de vapor, el material vegetal se mezcla con agua y el sistema se lleva a ebullición, proceso comúnmente conocido como hidrodestilación. El vapor se condensa para separar el agua de la fracción de aceite. (Perineau, F. *et al*., 1992).

El manejo y el almacenamiento adecuado debe ser una prioridad dado que los aceites esenciales son altamente volátiles y sensibles a altas temperaturas**.**

1.5 Aceites esenciales en fase vapor y su actividad antimicrobiana

Históricamente el uso de aceites esenciales en su fase vapor ha sido en su mayoría con fines psicotrópicos en los ámbitos religiosos, así como para prevenir malestares estomacales o vómitos (Arias y Ramón, 2005). En el año de 1960, se demostró su uso potencial como agente antimicrobiano usando el método de difusión en disco midiendo las zonas de inhibición sobre ciertos tipos de bacterias (Maruzzella, J. C. y Sicurella, N. A.,1960). Otro de los métodos evaluados fue el usado por Inouye, S. *et al.* (2001), el cual colocaba la muestra de aceite esencial evaluado dentro de un contenedor hermético con la cepa del microorganismo evaluado para observar su susceptibilidad ante los compuestos desprendidos por el aceite esencial.

Uno de los estudios más significativos actualmente es el realizado por Nedorostova, L. *et al.* (2009), quienes evaluaron el efecto de 27 aceites esenciales diferentes en su fase vapor contra bacterias patógenas presentes en los alimentos entre los que se encuentran: *E. coli, Listeria monocytogenes, Salmonella enteriditis, Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, de los cuales 13 de los aceites esenciales demostraron su actividad antimicrobiana, resaltando el aceite esencial de las hojas del rábano picante (*Armoracia rusticana*), el cuál fue efectivo contra los cinco patógenos evaluados en concentraciones de 0.0083 µl /cm3.

Por otro lado, también estos vapores tienen un importante efecto sobre diferentes tipos de hongos y mohos como fue demostrado por López-Malo, A. *et al.* (2005), quienes evaluaron el efecto de los vapores desprendidos por canela, clavo y albahaca sobre *A. flavus* y *P. islandicum.* Asimismo, Tullio, V. *et al.* (2007*),* probaron el aceite esencial de tomillo y la nuez moscada sobre *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*

Aunque se ha demostrado, la capacidad de los aceites como agentes antimicrobianos, su aplicación como aditivos en la industria alimentaria se encuentra limitada debido a las alteraciones sensoriales que causan cuando son aplicados en los alimentos (López-Malo, A. *et al.,* 2005). Una solución a este problema es reducir los efectos con la utilización de los aceites esenciales en fase vapor en concentraciones bajas (Suhr, K. I., & Nielsen, P. V., 2003).

Los vapores son generados por los componentes volátiles propios de los aceites esenciales que son desprendidos y por medio de la difusión se expanden generando una modificación de la atmosfera a ciertas temperaturas o un ambiente (Figura 3) como lo ha propuesto López-Malo, A. *et al.* (2005) y Fisher, K. & Phillips C.A. (2008), teniendo un mayor impacto en mohos debido a su crecimiento superficial. Los vapores generados por los aceites afectan el ciclo de vida de los mohos en la etapa de germinación, en el crecimiento de la hifa y en la etapa de esporulación.

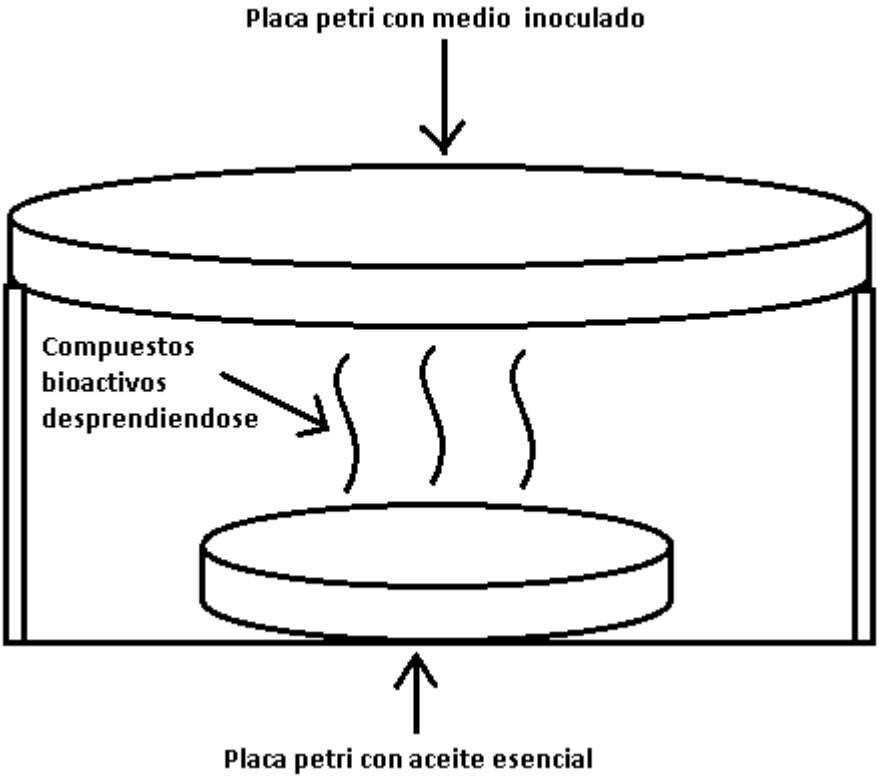


Figura 3. Mecanismo de acción del aceite esencial en fase vapor

1.5.1 Aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare)* en fase vapor

Los estudios realizados por Ávila-Sosa, R. *et al* (2012), con el aceite esencial de orégano en fase vapor demuestra la efectividad de su uso como agente antimicrobiano. Sus principales componentes son el thymol y el carvacrol, dichos compuestos son responsables de la característica antimicrobiana del aceite. Cabe destacar que el estado de madurez de la planta es importante puesto que en plantas más jóvenes la cantidad de thymol es mayoritaria que la del carvacol, así de manera análoga, el carvacrol es el compuesto predominante en plantas con un estado de madurez mayor.

Estudios como el realizado por Albado Plaus, E. *et al.* (2001), sugieren un efecto importante del carvacol y la función que éste tiene sobre la actividad antimicrobiana contra bacterias como *E. coli, S. aureus* y *P. aeruginosa*; concluyendo que el aceite es efectivo contra las bacterias probadas a excepción de *P. aeruginosa.*

De manera similar, Avila-Sosa, R. *et al.,* (2012) determinaron dicha actividad del aceite esencial al probarlo con diferentes tipos de hongos como fue *P. digitatum* y *A. niger* a diferentes concentraciones, siendo más efectivo a una concentración de 4% de aceite esencial en el medio de cultivo.

1.5.2 Aceite esencial de tomillo en fase vapor (*Thymus vulgaris)*

La composición del tomillo está constituida principalmente por fenoles monoterpenicos, tales como el timol, limoneno y bermol, entre otros. Sin embargo, la presencia mayoritaria de alguno de estos compuestos va depender completamente de la época del lugar en donde es cosechada la planta, así como el lugar en el que se encuentre. (Alzamora, S. *et al.*, 2000).

Estudios realizados por Sienkiewicz, M. *et al.*, (2011), corroboraron el comportamiento de diferentes cepas de bacterias tales como: *Staphylococcus, Enterococcus, Escherichia y Pseudomonas* en presencia del aceite esencial de tomillo por medio de la técnica vertido en placa. Estos análisis arrojaron que la CIM (Concentración Mínima Inhibitoria; por sus siglas en inglés) es de <1.5µL.

Por otro lado, López, P. *et al.,* (2007), probaron la fase vapor del aceite esencial en bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Pseudomonas aeruginosa*, y *Salmonella choleraesuis*), Gram-positivas (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus)* y *mohos (Penicillium islandicum* y *Aspergillus flavus*), concluyendo que es necesaria una CIM muy baja de aceite esencial de tomillo contra las bacterias analizadas.

1.5.3 Aceite esencial de naranja en fase vapor (*Citrus x aurantium*)

El aceite esencial de naranja es rico en limoneno en un 65% del total que lo comprende; este compuesto en particular brinda al fruto de una actividad antimicrobiana y antifúngica contra diferentes tipos de agentes. Cosentino, S. C. I. G. *et al*. (1999), demostraron que el aceite esencial tiene un efecto bactericida contra *Listeria monocytogenes, Salmonella thypirium, Escherichia coli y Bacilus cerus* entre otros utilizando concentraciones de entre 0.02 y 10µL^{-1}.

Por otro lado, Fisher, K. *et al.* (2009), evaluaron la capacidad antmicrobinana de dicho aceite esencial usando su fase de vapor sobre *L. monocytogenes, S. aureus, B. cereus, E. coli O157* y *C. jejuni,* concluyendo que el limoneno y el linanol, son los compuestos que tienen la capacidad de reducir la población bacteriana evaluada.

II. Materiales y métodos

2.1 Obtención de la materia prima

Los materiales vegetales utilizados fueron 1kg de cáscara naranja (*Citrus × aurantium*), 1kg orégano (*Origanum vulgare)* y 1kg tomillo (*Thymus vulgaris*) los cuales fueron obtenidos en la Central de Abastos Puebla. Posteriormente fueron seleccionados corroborándose que no mostraban daños físicos ni microbiológicos aparentes.

La cepa de *Salmonella tiphy* fue obtenida por parte del cepario de la Dra. Ma. Lorena Luna Guevara. Sin embargo, estudios posteriores sobre la cepa demostraron que se trató de *Salmonella entérica la variedad de Salmonella* que se utilizó para el estudio.

2.2 Métodos

2.2.1 Caracterización y acondicionamiento de la cáscara de naranja

2.2.1.1Determinación de humedad

Para las determinaciones de humedad de la cáscara de naranja fresca (5g) por triplicado. Las muestras se colocaron en una cápsula de porcelana, previamente a peso constante y posteriormente se introdujeron en una estufa TERLAB BTC-9100 a 102 +/- 2ºC por 24 h. La determinación de la humedad de la cáscara de naranja se calculó en base seca por el método 925.10 del AOAC (AOAC, 1999).

Las especias del tomillo y el orégano fueron adquiridas en forma deshidratada y se reportó el contenido de humedad del 11% en base seca por parte del proveedor.

2.2.1.2 Determinación de índice de madurez

Para garantizar el grado de madurez de la cáscara de naranja se determinó el índice de madurez, mismo que se calculó como la relación entre sólidos solubles totales (°Brix)

con uso del brixómetro EASYOVER NBL100 y la acidez titulable con una muestra de 10mL de jugo de naranja (Ec. 1).

$$I,M = \frac{°\text{Brix}\ (\%)}{Acidez\ titulable\ (\%)} \quad \textbf{(Ec. 1)}$$

2.2.2 Extracción de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se extrajeron por medio de hidrodestilación por triplicado de acuerdo con lo propuesto por Masango, P. (2005). Se utilizó el hidrodestilador marca GRAHAM DESCHEM modelo 2L HT. Se pesaron 200g de hojas de tomillo (*Thymus vulgaris*), 250g de hojas de orégano (*Origanum vulgare*) y 800g de cáscara de naranja cortada en cubos de 2 cm^3 aproximadamente. Cada muestra se introdujo en un matraz de destilación y sometieron a la acción del vapor de agua cuantificando los siguientes parámetros: tiempo requerido para dar inicio con la ebullición del agua, el tiempo en el que cayó la primera gota de aceite esencial y el tiempo en que terminó la extracción; la temperatura del vapor de agua y la temperatura del refrigerante y el peso del aceite esencial y la materia prima utilizada (Figura 4). Para poder calcular el rendimiento de la extracción se utilizó la ecuación 2:

$$Rendimiento\ (\%) = \left[\frac{Vol.del\ aceite(mL) * Densidad\ del\ aceite\left(\frac{g}{mL}\right)}{Materia\ prima\ (g)}\right] * 100 \qquad \textbf{(Ec. 2)}$$

Figura 4. Extracción del aceite esencial de orégano (Origanum vulgare)

2.2.3 Análisis del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales en su fase vapor sobre el emulsionado cárnico.

2.2.3.1 Preparación del microorganismo

Se hizo crecer una cepa de *Salmonella entérica* (aislada previamente de alimentos) en 100 mL de caldo Soya Tripticaseína (TSB) marca Bioxon incubado a 37º C y con agitación a 100 rpm durante 24 h en una INCUBADORA DE AGITACIÓN ORBITAL MODELO INO.4-50 marca AYSPEL APARATOS. Se ajustó la población a 107UFC/mL en un segundo caldo de TSB, mediante la medición de absorbancia (1.1) a 590 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS marca JENWAY, 6405.

2.2.3.2 Inoculación del producto cárnico

Se utilizaron salchichas tipo Viena de la marca comercial Chimex® con un peso promedio de 60 g y una longitud de 11 cm. Posteriormente, fueron inoculadas con una población de 10^7UFC de *Salmonella entérica* por inmersión en 50mL de caldo TSB marca Bioxon, durante 1 minuto en agitación constante para garantizar su completa inoculación.

2.2.3.3 Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales

Las salchichas inoculadas se sometieron a impregnación con los aceites esenciales en fase vapor (0, 700,1000, 1500 y 2000 mg/L), dentro de cámaras herméticas de plástico estériles y se almacenaron en refrigeración a 4± 1 C ° durante 72 y 144h, por triplicado.

Figura 5. Acondicionamiento de cámaras

2.2.3.4 Recuentos microbianos

Se realizaron recuentos microbianos a los tiempos 0, 72 y 144h por triplicado con la finalidad de conocer el comportamiento de *Salmonella entérica* durante estos tiempos de contacto de los aceites esenciales. Se utilizó el método de vaciado en placa establecido por la norma NOM-092-SSA1-1994, utilizando el medio de cultivo agar TSB. Las placas fueron incubadas en la incubadora FELISA FE-133D a 37ºC durante 24h, respectivamente

2.2.4 Confirmación de la presencia de *Salmonella entérica*

Después del tiempo transcurrido se usó un kit específico para *Salmonella* llamado SALMONELLA AND LISTERA ASSAY METHODS AND KITS (Kim, Tae Jo, & Juan L. Silva, 2016*),* para confirmar la presencia del microrganismo en las muestras de salchicha sometida a los tratamientos. De igual manera hechos por triplicado. El cambio de color verde a anaranjado gracias al indicador de pH presente en el kit confirmó la presencia de *Salmonella* en las muestras sometidas al tratamiento.

2.2.5 Evaluación sensorial

Se evaluaron los tratamientos a concentraciones de 2000ppm de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y naranja (*Citrus × aurantium*) por 144h sin inocular, ya que fue la concentración con mayor efectividad antimicrobiana de los tratamientos estudiados. La evaluación sensorial fue a una escala de 5 puntos; con valores de 5 para *Me gusta mucho*, 4 *me gusta*, 3 *ni me gusta/ni me disgusta, 2 me disgusta* y de 1 para *me disgusta mucho*; la evaluación se realizó a un panel de 40 jueces no entrenados de ambos sexos de edad de entre 18-50 años, consumidores habituales de salchicha.

2.2.6 Análisis estadístico

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado y los valores promedio obtenidos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa estadístico Minitab16 ®, con un 95 % de confianza como criterio de diferencia

significativa, entre muestras. Las diferencias significativas entre los valores promedios se determinaron usando la prueba de comparación múltiple de Tukey.

III. Resultados y discusión

3.1 Determinación de humedad e índice de madurez en naranja

La naranja (*Citrus × aurantium*) se caracterizó midiendo su índice de madurez con un valor de 12.23. Dicho valor se encuentra dentro del rango establecido por la NMX-FF-027-SCFI-2007 que es de 9.7 a 17.7; por otro lado, la muestra de cáscara de naranja presentó una humedad de 87.5%+/-0.6, datos que coinciden con los que fueron reportados por Llontop, S., Milagritos, M. & Nunura, A. (2015) que obtuvieron una humedad del 86.5% y un índice de madurez de 12.5 respectivamente.

3.2 Extracción del aceite esencial

En la tabla 2, se presentan los diferentes parámetros que se obtuvieron con las diferentes extracciones de los aceites esenciales. Como se puede observar, el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) tuvo un rendimiento del 1.03%, similar a lo reportado por Albado Plaus, E. *et al.* (2001) que tuvo un valor del 1.3% extrayendo el aceite de hojas secas, por otro lado el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) presentó un rendimiento de 0.72%, con una diferencia del 0.78% a lo mencionado por Sadjia, B., Naima, S., & Chahrazed, B. (2012) al extraerlo de material desecado. Este valor puede deberse al estado en el que fue cosechada la planta, así como al proceso de secado al que se sometió antes de su venta. Por otro lado, el rendimiento del aceite esencial de naranja concuerda con los datos obtenidos por León Méndez, G. *et al.* (2015), el cual fue del 0.5% comprobando la efectividad del método al usarlo en este fruto.

Tabla 2. Variables registradas en los procesos de extracción los aceites esenciales de orégano (Origanum vulgare), tomillo (Thymus vulgaris) y naranja (Citrus × aurantium)

Aceite	Orégano *(Origanum vulgare*)	Tomillo (*Thymus vulgaris*)	Naranja (*Citrus × aurantium*)
Tiempo en que empezó la ebullición (min)	20 a 97 ºC	21 a 96ºC	20 a 97 ºC
Tiempo en que cayó la primera gota (min)	50	35	50
Tiempo en que cayó la última gota (min)	110	75	138
Temperatura del refrigerante (ºC)	12	13	12
Temperatura del vapor (ºC)	95	95	95
Masa de la materia prima (g)	200	250albado	800
Masa del aceite obtenido (g)	2.24	1.8	3.9
Densidad del aceite (g/mL)	0.92	0.88	0.84
Volumen del aceite obtenido(mL)	2.42	2.03	4.64
Rendimiento (%)	**1.03**	**0.72**	**0.48**

3.3 Análisis del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales sobre el emulsionado cárnico e inhibición de *Salmonella entérica.*

Como ya se mencionó con anterioridad, los diferentes compuestos aromáticos presentes en los aceites esenciales fungen como un antimicrobiano importante en plantas y se han utilizado como conservadores naturales (Lanciotti, R. *et al.,* 2003). En la tabla 3 se muestran los resultados de los recuentos realizados por triplicado.

Tabla 3. Reducciones logarítmicas de *Salmonella entérica* inoculada en emulsionados cárnicos con diferentes contenidos de agentes antimicrobianos.

Tratamiento		Reducción Log_{10}UFC/g	
Aceite esencial	Concentración	72h	144h
Control	n/a	0.00±0.00 a, N	0.04±0.00 a, N
Orégano	700ppm	0.25±0.00 g, K	0.57±0.03 e, I
	1000ppm	0.48±.001 f, J	0.98±0.00 d, G
	1500ppm	1.00±0.00 c, EF	1.24±0.00 b, C
	2000ppm	0.98±0.00 cd, EFG	1.97 ±0.00 a, A
Tomillo	700ppm	0.47±0.01 g, J	0.91±0.00 e, H
	1000ppm	0.53±0.53 f, I	0.96±0.00 d, FG
	1500ppm	1.10 ±0.00 c, D	1.26±0.00 b, C
	2000ppm	1.09±0.00 c, D	1.36±0.01 a, B
Naranja	700ppm	0.08±0.00 e, M	0.19± 0.00 d, L
	1000ppm	0.03± 0.00 d, L	0.14±0.00 b, GH
	1500ppm	0.29± 0.00 c, K	0.93±0.00 b, G
	2000ppm	0.25±0.03 c, K	1.01±0.02 a, E

Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre los promedios para un mismo tratamiento de aceite esencial. Las letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa ($p<0.05$)entre los promedios de todos los tratamientos

De acuerdo a los resultados obtenidos y de manera general se observan reducciones ($p<0.05$), en la población microbiana de los distintos tratamientos estudiados. Cuando se evalúo el efecto del aceite esencial de orégano sobre la población bacteriana, este tuvo una disminución mayor a las 144h de contacto con una concentración de 2000ppm, obteniendo una reducción de 1.90 Log_{10}UFC/g. Asimismo, podemos observar que se presentan reducciones ($p<0.05$), al someter la salchicha a concentraciones de 1500ppm donde se produjeron reducciones de 1.07 Log_{10}UFC/g a las 72h de contacto y de 1.24log_{10}UFC/g a las 144h, respectivamente. Finalmente, cuando se evalúo el efecto con una aplicación de 1000 ppm se produjo una reducción de 0.98 Log_{10}UFC/g a las 144h

de contacto, mientras que con 700ppm se produjo una disminución de la población bacteriana solamente de 0.57log_{10}UFC/g a la misma cantidad de 144h respectivamente.

Observando la figura 6, se puede apreciar la influencia del aceite esencial orégano (*Origanum vulgare*) sobre la población de *Salmonella spp*. en la muestra de salchicha a una concentración de 700ppm por 144h de contacto; sin embargo, a una concentración de 1500ppm a las 72h de contacto, existió una mayor diminución en comparación a las anteriores concentraciones de 1000 y 700ppm respectivamente. Cabe destacar que diferentes autores han mencionado el efecto antimicrobiano que tiene el aceite esencial de orégano sobre cepas de bacterias Gram negativas, entre ellas *Salmonella entérica* como es el caso de Amadio, C. *et al.* (2011).

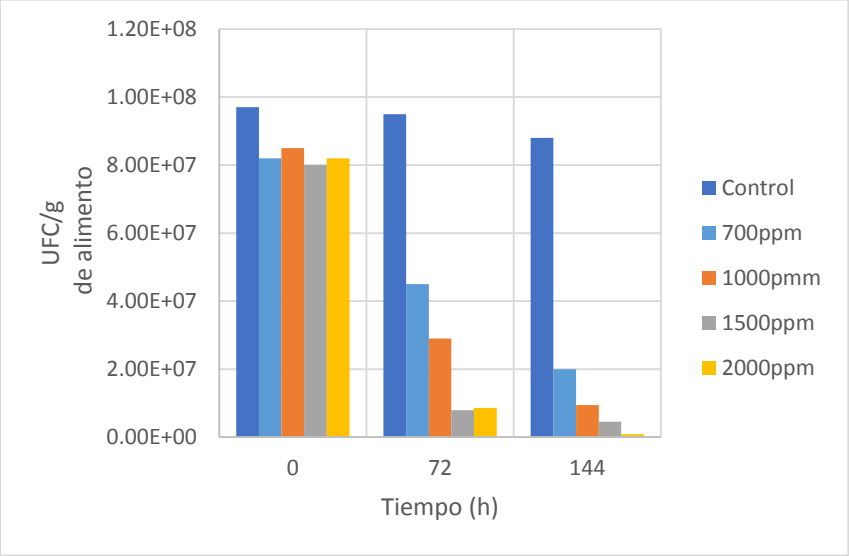


Figura 6. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) en fase vapor sobre Salmonella entérica en concentraciones de o, 700, 1000, 1500 y 2000ppm en periodos de 0,72 y 144h.

Por otro lado los resultados obtenidos son similares con lo reportado por López *et al.* (2005), en los cuales el aceite esencial de orégano presentó un efecto sobre el crecimiento de *Salmonella choleraesuis* y en un grupo de bacterias Gram negativas evaluadas, en el citado estudio hubo una disminución de la población de un 70% a las 6 h de aplicación del tratamiento en placa Petri, concluyendo que el carvacrol, al estar

presente en mayor proporción en esta especia es el compuesto que contribuye a la disminución de la carga microbiana. Asimismo, el estudio realizado por Luna *et al.* (2015), confirma la eficacia del aceite esencial de orégano como antimicrobiano sobre *E. coli* ETEC que manifestó reducciones logarítmicas de 3 y 4 ciclos, respectivamente.

Por otro lado, en la industria cárnica se evaluó el efecto antibacteriano de dicho aceite sobre carne de cerdo molida y pasteurizada a diferentes periodos de tiempo; concluyendo que el aceite esencial de orégano, adicionado directamente afecta la supervivencia de las diferentes cepas de *Salmonella* (Vásquez *et al.,* 2014).

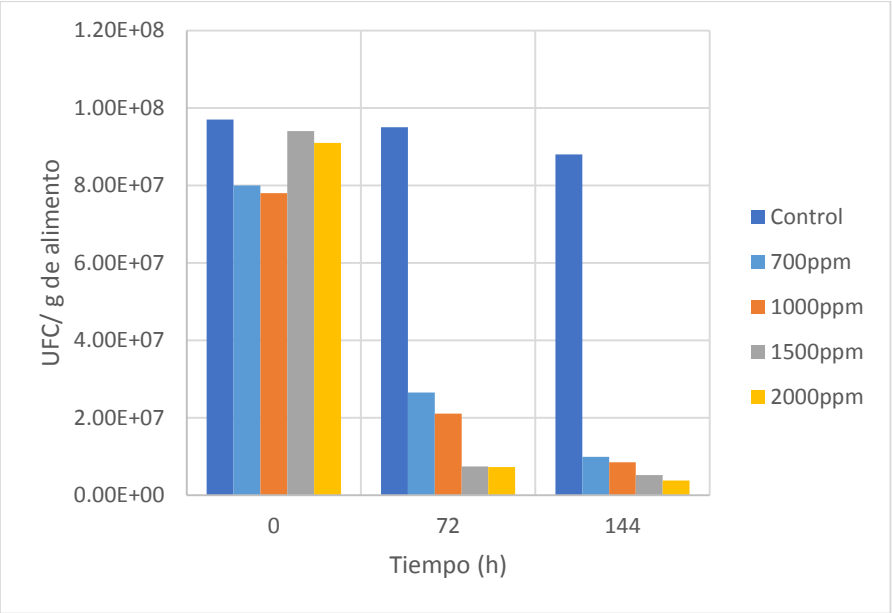


Figura 7. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de tomillo (Thymus vulgaris) en fase vapor sobre Salmonella entérica en concentraciones de 0, 700, 1000, 1500 y 2000pm en periodos de 0, 72 y 144h.

Como se puede observar en la figura 7, la mayor disminución de la población microbiana se presenta a una concentración de 2000ppm. Algunos estudios como el de Arias, F. H. & García-Rico R. O. (2006), demostraron la capacidad inhibitoria del aceite esencial de tomillo en concentraciones de 200ppm, teniendo un halo de inhibición de 15mm en una población de 10^5UFC sobre *Salmonella entérica.*

El aceite esencial de tomillo se presentó una diferencia significativa ($p<0.05$), en las concentraciones más elevadas. La mayor reducción se logró al someter a la salchicha a una concentración de 2000ppm a las 144h, con una reducción de 1.36 log10UFC/g,

mientras que la reducción de 1.26 se alcanzó con una concentración de 1500ppm, en el mismo periodo de tiempo. En los tratamientos evaluados con concentraciones de 1500ppm y 2000ppm, a las 72h, no se encontraron diferencias significativas cuando se evaluaron las respectivas reducciones logarítmicas ($p>0.05$). Asimismo, el menor efecto se alcanzó con las concentraciones de 700ppm y 1000ppm, a las 144 h, con y con reducciones de 0,91 y de 0,96, respectivamente. Al igual que el aceite esencial de orégano en su fase vapor, el tomillo evaluado por López-Malo, A. *et al.* (2005) sobre *S. choleraesuis* el cual tuvo una efectividad antibacteriana de un 60%. Asimismo, el estudio realizado por Nedorostova, L. *et al.* (2009), confirma lo anterior al demostrar la efectividad de esta misma especia sobre *Salmonella entereditis*. En otro estudio realizado por Luna *et al.*2015, en donde el aceite esencial se evaluó como potencial antimicrobiano en frutos de tomate se confirmó la sensibilidad de *E. coli* ante este tratamiento; cuando las muestras fueron sumergidas en el aceite esencial. La población bacteriana de *E. coli.* disminuyó 3 $\log_{10}$ UFC/g a una concentración de 10ppm.

Alzamora, S. *et al.* (2000) sugieren que la acción del carvacol presente en el tomillo y orégano actúa sobre la permeabilidad en la membrana externa de las bacterias Gram negativas (como es el caso de *Salmonella spp.*) liberando lipolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática a ATP observando una disminución en la síntesis de ATP.

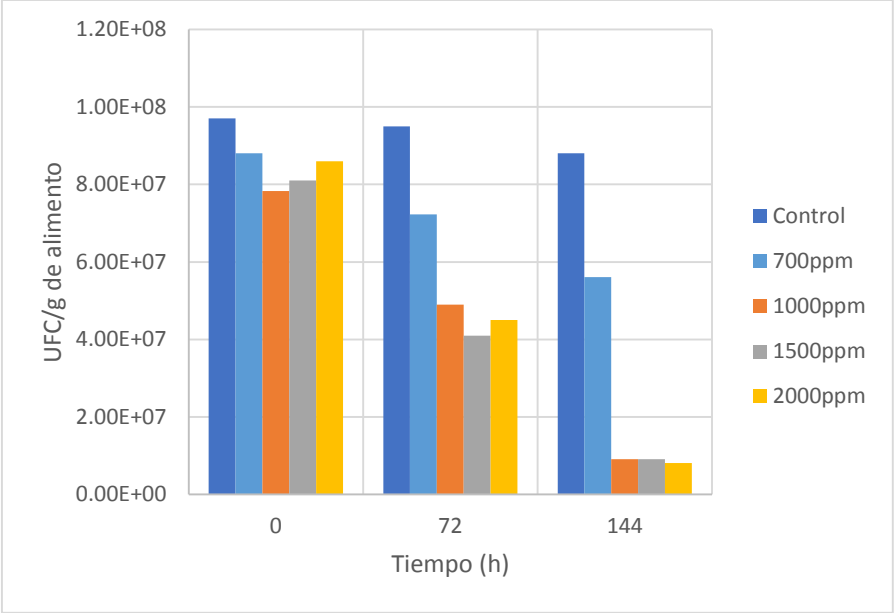


Figura 8. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de naranja (Citrus × aurantium) en su fase vapor sobre Salmonella entérica en concentraciones de 0, 700, 1000, 1500 y 2000ppm en periodos de tiempo de 0, 72 y 144h

En la figura 8 el aceite esencial de naranja (*Citrus* × *aurantium*), se observa que la disminución en la población microbiana comienza a una concentración de 1000ppm a las 144 h de contacto; cabe destacar que para este aceite esencial en particular se tuvo que someter a mayores periodos de contacto para poder lograr que la población bacteriana se viera afectada por el tratamiento. De acuerdo con Tosun, S. Y. *et al.,* (2017), solamente se alcanzó una reducción en la población microbiana cuando el aceite esencial fue adicionado de manera directa en carne de Salmon Atlántico y con 96h de almacenamiento.

En el presente estudio, los datos obtenidos del análisis estadístico confirman que las muestras de salchicha al ser sometidas al tratamiento con aceite esencial de naranja mostraron reducciones significativas ($p<0.05$) al estar en contacto por 144 h a una concentración de 2000ppm y logrando solamente reducir 1.01Log_{10}UFC/g, demostrando ser el aceite esencial de menor efecto antimicrobiano, cuando fue comparado con los otros aceites en las mismas condiciones. Estudios preliminares con dicho aceite esencial mostraron su capacidad antimicrobiana ante diferentes tipos de microorganismos. , Fisher, K. & Phillips C.A. (2006) comparó el efecto de varios aceites esenciales cítricos, entre ellos el de naranja (*Citrus* × *aurantium*) sobre *Salmonella spp.* el cual tuvo un halo

de inhibición del 1%. En sistemas de alimentos el aceite esencial de naranja fue probado en muestras de piel de pollo crudo. Al comparar el aceite esencial de naranja con el de bergamota y limón, el aceite esencial de naranja no presentó reducciones significativas al exponer las muestras de piel de pollo al aceite esencial de manera directa y en fase vapor por 8 h. (, Fisher, K. & Phillips C.A., 2006)

Sin embargo, el reducido efecto antimicrobiano mostrado por el aceite esencial de naranja es debido por el limoneno, éste actúa sobre la membrana plasmática de la célula bacteriana, acumulándose y causando la perdida de la integridad de la membrana (Sikkema, J. *et al.*, 1994). Dabbah, R. *et al.* (1970) aislaron del aceite el terpenol, geraniol y el limoneno los cuales tuvieron un 90% de inhibición sobre *Salmonella.* Asimismo, Espina *et al., (*2013) evaluaron el efecto del limoneno sobre *E. coli* O157:H7 usando 200µL de Limoneo en jugo de manzana inoculado con la cepa de *E. coli O157:H7*, reducciones de 2 y 0.5 ciclos logarítmicos.

Finalmente, fueron evaluados los tres aceites esenciales, el tiempo de contacto y la concentración, lo anterior permitió conocer la eficacia de cada uno de los tratamientos evaluados. El tratamiento con aceite esencial de orégano fue el que presentó el mayor efecto significativo ($p<0.05$), sobre la población de *Salmonella entérica* al disminuir 1.98Log_{10}UFC/g a una concentración de 2000ppm en comparación con el tomillo que redujo 1.38Log_{10}UFC/g. Asimismo, a una concentración de 1000ppm y con 144h de contacto el aceite esencial de orégano y tomillo reduce a 0.98Log_{10}UFC/g y 0.96Log_{10}UFC/g respectivamente. presentando la misma reducción a un tiempo de 72h a una concentración de 1500ppm siendo estadísticamente significativa ($p<0.05$) dicha reducción logarítmica. Para el aceite esencial de orégano y de tomillo se puede atribuir este carácter antimicrobiano al carvacrol, biocompuesto presente de manera mayoritaria en dichos aceites esenciales en un 70% para el aceite esencial de orégano (Albado Plaus, E. *et al.,* 2001) y un 81% para el tomillo (Sadjia, B., Naima, S., & Chahrazed, B., 2012) en las mismas condiciones extraídas por la bibliografía. Por otro lado, el aceite esencial de naranja presentó el menor efecto sobre el microorganismo en estudio, ya que al tiempo de contacto de 144h y a una concentración de 2000ppm la reducción fue de 1.01Log_{10}UFC/g, atribuyéndole su capacidad antimicrobiana al limoneno presente en

el aceite esencial en un 89.6% en las mismas condiciones de extracción realizadas por León Méndez, G. *et al.,* (2015). De acuerdo con los resultados obtenidos se puede comprobar que el aceite esencial de orégano funge como el mejor antimicrobiano de los tres aceites esenciales evaluados.

Después de analizar la actividad antimicrobiana de la fase de vapor de los aceites esenciales evaluados se sugiere que el aceite esencial reduce la actividad microbiana en las muestras presentes, pero no inhibe la presencia del patógeno. Lo anterior queda demostrado con el kit de confirmación de *Salmonella,* el cual indica que la bacteria aún se encuentra presente pues la acidificación del medio por parte de la sepa de Salmonella reacciona con el rojo de fenol presente en la formulación de la fase solida del medio de cultivo como indicador de pH cambiando el color verde en el fondo de las muestras a amarillo o anaranjado (Figura 9)

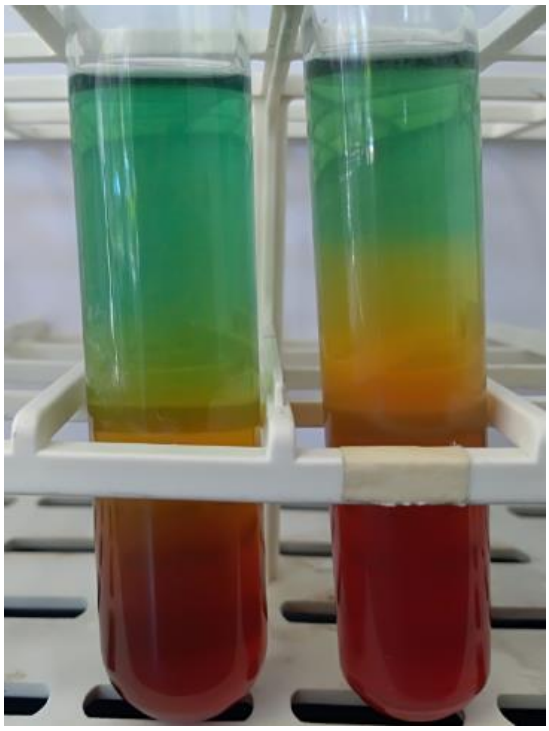


Figura 9. Muestras positivas (Fondo amarillo/anaranjado) de SALMONELLA AND LISTERA ASSAY METHODS AND KITS para Salmonella entérica después del tratamiento con aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) a 2000ppm por 144h.

3.4 Evaluación sensorial

Una vez determinados los tratamientos que tuvieron mayores reducciones logarítmicas sobre la población de *Salmonella entérica,* se realizó una evaluación sensorial del producto sin inoculo para conocer la modificación de las propiedades sensoriales en la salchicha posteriormente a la aplicación de los aceites en fase de vapor. Los parámetros evaluados fueron sabor, aroma, textura, color y su aceptación general.

Figura 10. Evaluación sensorial del tratamiento

En la tabla 4 se puede observar la calificación final que obtuvieron los atributos y la salchicha en los diferentes tratamientos seleccionados.

Tabla 4. Evaluación sensorial de salchicha tipo Viena al contacto con la fase de vapor de diferentes aceites esenciales

Atributo	Aceite esencial de Naranja (*Citrus × aurantium*)	Aceite esencial de Orégano(*Origanum vulgare*)	Aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*)
Aroma	3.70∓1.13 A	3.40∓1.15 A	3.67∓0.82 A
Textura	3.80∓0.072 A	3.75∓0.83 A	3.55∓0.90 A
Color	3.95∓1.15 A	4.22∓0.69 A	4.15∓0.53 A
Sabor	3.17∓1.03 A	2.87∓1.20 A	2.62∓1.25 A
Acept. General	3.65∓0.80 A	3.25∓1.05 AB	2.97∓1.18 B
Calificación final	3.61A	3.49B	3.39C

[a] Letras diferentes en los renglones indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

Como se puede observar, la evaluación de los parámetros organolépticos presenta diferencia significativa ($p \leq 0.05$), entre ellos de acuerdo al aceite esencial evaluado. El sabor obtuvo una calificación que corresponde en la escala hedónica de 3.1 y un aroma de 3.7 obteniendo una calificación de 3.6 en su aceptación general para las muestras con aceite esencial de orégano, atributos que fueron graficados por tener mayor influencia en el sistema alimentario estudiado. Dichos parámetros evaluados se pueden observar en la figura 11.

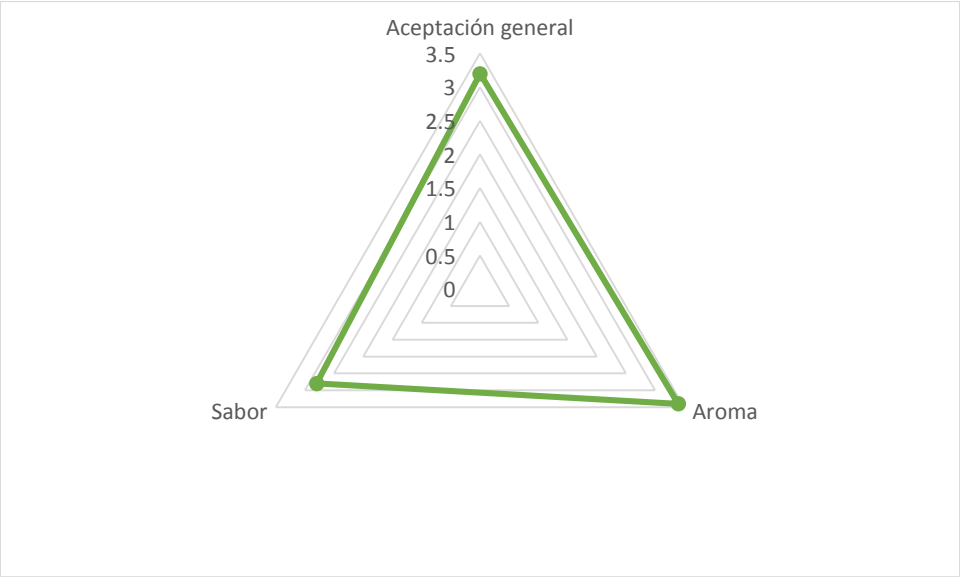


Figura 11. Resultados de la evaluación sensorial de la salchicha en contacto por 144h con aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) en fase vapor a 2000ppm.

Para las muestras con aceite esencial de tomillo se obtuvieron las calificaciones de 2.87 para el sabor, aroma de 3.6 y aceptación general de 2.97, así como se muestra también en la figura 12 lo cual indica un sabor poco agradable de acuerdo con los jueces. Al igual que el tratamiento anterior, éste presento una diferencia significativa en la aceptación general obteniendo una calificación baja. Esto puede deberse al sabor y aroma penetrante que presenta.

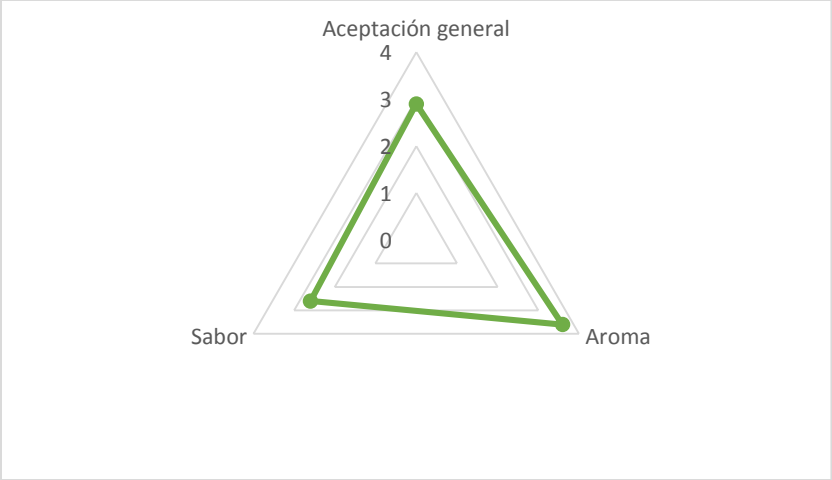


Figura 12. Resultado s de la evaluación sensorial de la salchicha en contacto por 144h con aceite esencial de tomillo (Thymus vulgaris) en fase vapor a 2000ppm.

El aceite esencial de naranja ya que estos obtuvieron una calificación final de 3.7 para el aroma, sabor de 3.1 y una aceptación general de 3.6, siendo este el tratamiento predilecto por parte de los jueces, tal como se puede observar en la figura 13.

Figura 13. Resultado s de la evaluación sensorial de la salchicha en contacto por 144h con aceite esencial de naranja (Citrus × aurantium) en fase vapor a 2000ppm.

Diversos autores han debatido sobre el uso de aceites esenciales y su repercusión en las características organolépticas en los alimentos cuando éstos se usan de manera directa. Tal es el caso de Tunc, S. *et al.* (2007), quienes usaron diferentes mezclas de

aceites esenciales en productos de panadería generando efectos adversos en los productos tales como la alteración del sabor y la textura.

Finalmente, y de acuerdo con la bibliografía consultada, el uso de los aceites esenciales afecta las características sensoriales de los alimentos, dependiendo del tipo de alimento, así como de las concentraciones que se utilicen y la manera en que se apliquen en los mismos. Sin embargo, dichos compuestos pueden generar sabores agradables en los sistemas alimenticios como se mostró en el tratamiento con aceite esencial de naranja, actuando al mismo tiempo como un conservador natural, sin detrimento de las cualidades sensoriales.

IV. Conclusiones

- La extracción de aceites esenciales por el método de hidrodestilación es el método más óptimo para la extracción de aceites esenciales para uso en alimentos puesto que al utilizar vapor de agua como medio de arrastre puede ser aplicado de manera directa sin el riesgo de que contenga trazas de otros compuestos que pueden ser tóxicos para el organismo.
- La fase vapor de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y naranja (*Citrus × aurantium*) tienen un efecto antimicrobiano sobre *Salmonella entérica* sobre salchichas tipo viena.
- El timol y el carvacol, presentes en el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), actúan como antimicrobianos naturales, mientras que el efecto antimicrobiano del aceite esencial de naranja (*Citrus × aurantium*) es debido al limoneno, compuesto mayoritario en el mismo.
- El vapor del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) presentó una actividad antimicrobiana mayor, reduciendo 1.9 Log_{10}UFC/g ciclos logarítmicos, seguido del vapor del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) con una reducción de 1.5 Log_{10}UFC/g *Salmonella entérica*. Finalmente el vapor del aceite esencial de naranja (*Citrus × aurantium*) tuvo la menor capacidad antimicrobiana de los tratamientos evaluados reduciendo 1 Log_{10}UFC/g.
- Los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y naranja (*Citrus × aurantium*) en su fase vapor evitan alteraciones importantes en las salchichas tipo Viena. Su uso en concentraciones bajas provee de un aroma y sabor agradable.
- Se recomienda aumentar las concentraciones evaluadas y determinar su efecto en otro tipo de bacterias y productos cárnicos.
- El continuar con esta investigación contribuirá con brindarle alternativas de conservación a los productos cárnicos disminuyendo el uso de antimicrobianos o conservadores de origen sintético.

Bibliografía

- Albado Plaus, E., Saez Flores, G., & Grabiel Ataucusi, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del Origanum vulgare (orégano). Revista Medica Herediana, 12(1), 16-19.
- Adams, M. R., & Marteau, P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *International journal of food microbiology*, *27*(2-3), 263.
- *Alzamora, S. M., LOPEZ MALO, A., & Tapia, M. S. (2000). Minimally processed fruits and vegetables (No. 664.8/A478).*
- *Alzamora, S. M., Salvatori, D., Tapia, M. S., López-Malo, A., Welti-Chanes, J., & Fito, P. (2005). Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. Journal of Food Engineering, 67(1-2), 205-214.*
- Amadio, C., Medina, R., Dediol, C., Zimmermann, M. É., & Miralles, S. (2011). Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, *43*(1), 237-245.
- Arias, B. A., & Ramón-Laca, L. (2005). Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, *97*(1), 89-95.
- Arias, F. H., & García-Rico, R. O. (2006). Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, *4*(2), 13-19.
- Avila-Sosa, R., Palou, E., Munguía, M. T. J., Nevárez-Moorillón, G. V., Cruz, A. R. N., & López-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International journal of food microbiology*, *153*(1-2), 66-72.
- Bhandare, S. G., Sherikar, A. T., Paturkar, A. M., Waskar, V. S., & Zende, R. J. (2007). A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops*. Food Control,* 18(7), 854-858.
- Bertrand, S., Dierick, K., Heylen, K., De Baere, T., Pochet, B., Robesyn, E., ... & Collard, J. M. (2010). Lessons learned from the management of a national outbreak of Salmonella Ohio linked to pork meat processing and distribution. *Journal of food protection*, *73*(3), 529-534.

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, *94*(3), 223-253.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). Cuenta en placa de bacterias. *Técnicas para el Análisis Microbiológico Aliment, 1-10.*
- Cabrera-Diaz, E., Barbosa-Cardenas, C. M., Perez-Montaño, J. A., Gonzalez-Aguilar, D., Pacheco-Gallardo, C., & Barba, J. (2013). Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of Salmonella in ground beef at retail stores in Jalisco state, Mexico. *Journal of food protection*, *76*(12), 2004-2010.
- Caccioni, D. R., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A., & Ruberto, G. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on Penicillium digitatum and Penicillium italicum. *International journal of food microbiology*, *43*(1-2), 73-79.
- Sánchez, M. M., & Castro, N. M. C. (2004). Desarrollo y evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando la secuencia del gen hilA para diagnóstico de fiebre entérica por Salmonella spp. *Biomédica*, *24*(2), 194-199.
- Chemnitz, C. & Becheva, S. (2014). *Atlas de la carne . Santiago de Chile: Editorial e Imprenta MAVAL Ltda., Santiago de Chile*
- Callaway, T. R., Elder, R. O., Keen, J. E., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2003). Forage feeding to reduce preharvest Escherichia coli populations in cattle, a review. *Journal of dairy science*, *86*(3), 852-860
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC. (2006). Multistate outbreak of Salmonella typhimurium infections associated with eating ground beef--United States, 2004. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 55(7), 180.*
- Colmenero, F. J. (1996). Technologies for developing low-fat meat products. *Trends in Food Science & Technology*, *7*(2), 41-48.
- Cosentino, S. C. I. G., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, *29*(2), 130-135.
- Dabbah, R., Edwards, V. M., & Moats, W. A. (1970). Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, *19*(1), 27-31.
- Del Valle, J. M., & Aguilera, J. M. (1999). Revision: Extracción con CO2 a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos/Review: High pressure CO2

extraction. Fundamentals and applications in the food industry. *Food Science and Technology International*, *5*(1), 1-24.

- Serrano, M. E. D., López, M. L., & Espuñes, T. D. R. S. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *37*(4), 58-68.
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 21(4), 308-323.*
- FAO. (2006). *Procesados de Carnes. Mexico: PRODAR*
- *Rousseau, R. W. (Ed.). (1987). Handbook of separation process technology. John Wiley & Sons.*
- Fisher, K., Phillips, C., & McWatt, L. (2009). The use of an antimicrobial citrus vapour to reduce Enterococcus sp. on salad products. *International journal of food science & technology*, *44*(9), 1748-1754.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in food science & technology*, *19*(3), 156-164.
- Fisher, K., & Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(6), 1232-1240.
- Heredia, N., Garcia, S., Rojas, G., & Salazar, L. (2001). Microbiological condition of ground meat retailed in Monterrey, Mexico. *Journal of food protection*, *64*(8), 1249-1251.
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food microbiology*, *22*(4), 273-292.
- 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*(5), 565-573.
- Jiménez, R. J., Muñoz, C. A., Delgado, A. D., Román, A. R., & de la Torre Cisneros, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, *10*(52), 3497-3501.
- Kim, Tae Jo, and Juan L. Silva (2016) "*Salmonella and Listeria Assay Methods and Kits." U.S. Patent Application No. 14/871,836.*

- Kopper, G., Calderón, G., Scheneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico.
- *Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. Letters in Applied Microbiology, 54(3), 169-174..*
- Lanciotti, R., Belletti, N., Patrignani, F., Gianotti, A., Gardini, F., & Guerzoni, M. E. (2003). Application of hexanal,(E)-2-hexenal, and hexyl acetate to improve the safety of fresh-sliced apples. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*(10), 2958-2963.
- Leal-Torres, E., López-Malo-Vigil, A., & Sosa-Morales, M. E. (2013). Extracción, composición y caracterización de los aceites esenciales de hoja y semilla de cilantro (Coriandrum sativum). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, *7*(1), 97-103.
- León Méndez, G., Fortich, O., del Rosario, M., & Martínez Useche, S. R. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de Citrus sinensis L. *Revista Cubana de Farmacia*, *49*(4), 0-0.
- Linscott, A. J. (2011). Food-borne illnesses. *Clinical microbiology newsletter*, *33*(6), 41-45.
- Llontop, S., Milagritos, M. & Nunura, A. (2015) *Extracción Y Caracterización Del Aceite Esencial Y Pectina De Naranja (Citrus Sinensis) Obtenidos De Los Desechos Recolectados En Las Juguerías Del Mercado Modelo Del Distrito De Lambayeque. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo*
- López-Malo, A., Palou, E., Leon-Cruz, R. y Alzamora, S. (2005). *Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. Advances in Food Mycology. 57(11) 261-286.*
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2007). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(11), 4348-4356.
- Guevara, J. J. L., & Beltrán, J. Á. G. (2013). Caracterización de jamones adicionados con pastas residuales de la extracción mecánica de aceite de frutos secos. *Scientia Agropecuaria*, *4*(2), 77-88.
- Guevara, M. L. L., Guevara, J. J. L., Espinosa, H. R., Abascal, L. L., & González, C. B. D. (2015). Eficiencia de la desinfección con aceites esenciales y ultrasonido sobre Escherichia coli inoculada en frutos de tomate y el impacto sobre la actividad antioxidante. *Revista argentina de microbiología*, *47*(3), 251-255.
- Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. http://farmacia.udea.edu.co/ff/esencias200lb.pdf, accesado: 04/12/2018*

- Masago, R., Matsuda, T., Kikuchi, Y., Miyazaki, Y., Iwanaga, K., Harada, H., & Katsuura, T. (2000). Effects of inhalation of essential oils on EEG activity and sensory evaluation. *Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science*, *19*(1), 35-42.
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, *13*(8), 833-839.
- McLaughlin, J. B., Castrodale, L. J., Gardner, M. J., Ahmed, R., & Gessner, B. D. (2006). Outbreak of multidrug-resistant Salmonella Typhimurium associated with ground beef served at a school potluck. *Journal of food protection*, *69*(3), 666-670.
- McDonald, K., & Sun, D. W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International journal of food microbiology*, *52*(1-2), 1-27.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2013) *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Documento de Estado Actual de Inocuidad de los Alimentos. Bogotá, D. C.: Departamento de Salud Nutricional, Alimentos y Bebidas.*
- Maruzzella, J. C., & Sicurella, N. A. (1960). Antibacterial activity of essential oil vapors. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*, *49*(11), 692-694.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food control*, *20*(2), 157-160.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2002). *Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor. Ginebra: Departamento de Inocuidad de los Alimentos.*
- Sánchez, M. F. O. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. aiyana ediciones.
- Olivares-Cruz, M. A., & López-Malo, A. (2013). Potencial antimicrobiano de mezclas que incluyen aceites esenciales o sus componentes en fase vapor. *Temas Selectos de Ingeniería*, *7*(1), 78-86
- Perineau, F., Ganou, L., & Vilarem, G. (1992). Studying production of lovage essential oils in a hydrodistillation pilot unit equipped with a cohobation system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *53*(2), 165-171.
- Peredo, H., Palou, E., & López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, *3*(1), 24-32.

- Quesada, A., Reginatto, G. A., Ruiz Español, A., Colantonio, L. D., & Burrone, M. S. (2016). Resistencia antimicrobiana de Salmonella spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *33*, 32-44.
- Rotger, R., & Casadesús, J. (1999). The virulence plasmids of Salmonella. *International Microbiology*, *2*, 177-184.
- Roberfroid, M. B. (1999). Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *The Journal of nutrition*, *129*(7), 1398S-1401S.
- Sadjia, B., Naima, S., & Chahrazed, B. (2012). Extraction of thyme (Thymus pallecens de Noé) essential oil by steam-distillation, steam-diffusion and hydro-distillation processes: optimization of operating conditions and antioxidant activity. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *15*(2), 336-347.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, *17*(1), 7.
- Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Ciecwierz, J., Denys, P., & Kowalczyk, E. (2011). Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Medicinal Chemistry*, *7*(6), 674-689.
- Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *59*(2), 201-222.
- Skandamis, P. N., Nychas, G. J. E., & Sofos, J. N. (2010). Meat decontamination. *Handbook of Meat Processing*, 43.
- Sorensen, O., VAN DONKERSGOED, J. O. Y. C. E., McFALL, M. A. R. G. A. R. E. T., Manninen, K., Gensler, G., & Ollis, G. (2002). Salmonella spp. shedding by Alberta beef cattle and the detection of Salmonella spp. in ground beef. *Journal of food protection*, *65*(3), 484-491.
- Stevens, A., Kaboré, Y., Perrier-Gros-Claude, J. D., Millemann, Y., Brisabois, A., Catteau, M., ... & Dufour, B. (2006). Prevalence and antibiotic-resistance of Salmonella isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). *International journal of food microbiology*, *110*(2), 178-186.
- 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*(4), 665-674.
- Tessmann, C., Zocche, F., Lima, A. D., Bassani, M., Lopes, G. V., & Silva, W. D. (2008). Ocorrência e perfil de sensibilidade a antibióticos de Salmonella spp. isolada em cortes de

carne suína comercializados em feiras-livres de Pelotas (RS). *Bol Cent Pesqui Process Aliment*, *26*(2), 307-313.

- Torres-Vitela, M. R., Navarro, V. M., López, A. V., & Rodríguez, M. D. L. Á. O. (2011). Prevalencia de Salmonella y Staphylococcus aureus en chorizo y longaniza. *Nacameh*, *5*(1), 96-107.
- Torres, M., Ovono, D., Hugues, B., & Amaro, B. (2013). Incidencia de Salmonella en diferentes tipos de productos cárnicos. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, *14*(11B), 1-5.
- Terrel, R. (1980). *What's going on inside that casing?. Meat Industry, 26(10), 56.*
- Tosun, Ş. Y., Üçok Alakavuk, D., Ulusoy, Ş., & Erkan, N. (2018). Effects of essential oils on the survival of Salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes on fresh Atlantic salmons (Salmo salar) during storage at 2±1° C. *Journal of Food Safety*, *38*(1), e12408.
- Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M. A., ... & Carlone, N. A. (2007). Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *Journal of applied microbiology*, *102*(6), 1544-1550.
- Tunc, S., Chollet, E., Chalier, P., Preziosi-Belloy, L., & Gontard, N. (2007). Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of Penicillium notatum. *International Journal of food microbiology*, *113*(3), 263-270.
- Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos*. (2011). Los embutidos y la Inocuidad de los Alimentos. Estados Unidos: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.*
- Valles, M. V., Salinas, P. A., Haro, I. R., Sevilla, W. S., Lázaro, W. R., & Huamán, A. V. (2014). Efecto del aceite esencial de Origanum vulgare en la supervivencia de Staphylococcus aureus, Salmonella thypi, Salmonella parathypi y Salmonella enteritidis en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. *REBIOL*, *34*(1), 57-68. vasques
- Villada, J. (2010). Conservadores químicos utilizados en la Industria Alimentaria. *Universidad Autónoma Agraria. Buenavista, Saltillo, Cohauila-México*..
- *Wankat, P. C. (1988) Equilibrium staged separations. Separations in chemical yield and chemical composition of the essential oil of Satureja hortensis. Food Chemistry. Vol. 99(1) 19-23*
- Yamini, Y., Khajeh, M., Ghasemi, E., Mirza, M., & Javidnia, K. (2008). Comparison of essential oil compositions of Salvia mirzayanii obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, *108*(1), 341-346.

Anexo 1: Papeleta de evaluación sensorial

Nombre: Fecha: Edad:

Evaluación sensorial de salchichas expuestas al aceite esencial de naranja, tomillo y orégano.

Instrucciones: Pruebe por favor las muestras e indique el nivel de agrado marcando el punto en la escala que mejor describa su reacción para cada uno de los atributos.

	Muestra 354					Muestra 801					Muestra 783				
Escala	Color	Aroma	Sabor	Textura	Aceptación general	Color	Aroma	Sabor	Textura	Aceptación general	Color	Aroma	Sabor	Textrua	Aceptación general
5) Me gusta mucho															
4) Me gusta															
3) Ni me gusta, ni me disgusta															
2) Me disgusta															
1) Me disgusta mucho															

Observaciones:

¡Gracias!