RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Padín, Emilse Verónica

Obtención, caracterización y determinación de la actividad antimicrobiana de la oleorresina de las bayas de Aguaribay (schinus molle linn.)

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Padín, E. V. (2017). Obtención, caracterización y determinación de la actividad antimicrobiana de la oleorresina de las bayas de Aguaribay (Schinus molle Linn.). (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/646

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad
Nacional
de Quilmes

Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Padín, Emilse Verónica, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
diciembre de 2015, 86 pp.,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Obtención, caracterización y determinación de la actividad antimicrobiana de la oleorresina de las bayas de Aguaribay (*Schinus molle* Linn.)

TESIS DOCTORAL

Emilse Verónica Padín

emilsepadin@gmail.com

Resumen

Las especias son utilizadas en los alimentos desde hace cientos de años. En la actualidad, sus aceites esenciales y oleorresinas se utilizan no solo como saborizantes y aromatizantes sino también como conservantes de origen natural.
Las diferentes oleorresinas y aceites esenciales actúan como antimicrobianos, no solo inhibiendo el crecimiento de bacterias, sino también, inhibiendo el crecimiento de levaduras deteriorantes de alimentos y hongos toxicogénicos. Además algunas de ellas poseen la capacidad asociada de ser antioxidantes.
Hay especias que existen en forma salvaje y cuyas propiedades no han sido analizadas. Tal es el caso del Aguaribay, *Schinus molle* Linn, cuyas bayas levemente picantes y de color rosado, conocidas como pimienta rosa, son utilizadas, desde hace algunos años, en los alimentos. El Aguaribay es un árbol oriundo de América que crece en forma silvestreen Entre Ríos, Buenos Aires, Catamarca, Santiago del Estero, Córdoba, San Luis y Mendoza, entre otras provincias argentinas.
El objetivo de este trabajo de tesis es la obtención, caracterización y determinación de la capacidad antimicrobiana dela oleorresina extraída de las bayas del Aguaribay.
La oleorresina se obtuvo por medio de una extracción con etanol con un rendimiento del 21 %. La densidad fue de 1,7262 mg/ml, el pH de 4 y la longitud máxima de absorción en el UV-Visible de 292,5 nm.
La composición química se realizó mediante GC-MS (Cromatografía Gaseosa – Espectrometría de Masa) dando como resultado que posee un 40 % de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, 34 % de alcoholes sesquiterpénicos y compuestos relacionados (óxido de cariofileno y acetato de guaiol) y 17 % de otros compuestos tales como ácidos palmítico y oleico libres o como ésteres etílicos, 1-octadecanol, octadecanal y (Z)-9-octadecenal**.** Los compuestos individuales principales son el acetato de guaiol (11,96 %), δ-cadineno (8,64 %) y γ-cariofileno (7,12 %). Algunos compuestos presentes en la oleorresina no pudieron ser completamente identificados, pero muestran espectros de masas e índices de retención similares a los de alcoholes sesquiterpénicos.
En la determinación de la capacidad antimicrobiana se utilizaron bacterias, hongos y levaduras deteriorantes de alimentos. Los resultados obtenidos demuestran que el extracto etanólico de las bayas del aguaribay inhibe el desarrollo de bacterias Gram positivas y negativas a partir de una concentración de 2 mg/ml. Para los hongos testeados (*P.rugulosum, P. citrinum, P. brevicompactum, P. griseofolvum, P. nalgiovence, A. alternata* y *F. graminearum*) a los 7 días de incubación había inhibición en el crecimiento micelial en todas las concentraciones estudiadas (0,125 mg/ml, 0,187 mg/ml y 0,250 mg/ml). Los resultados encontrados para la inhibición de esporulación fueron positivos para *A. flavus* y *A. ochraceus* y negativos para *A. niger* y *A. clavatus*.

Para levaduras los valores de mínima concentración letal (MCL) fueron de 11 mg/ml para *Saccharomyces piss*, *Rodotorula spp.* y*Zygosaccharomyces spp.* y de 17 mg/ml para *Zygosaccharomyces rouxii*. En *Saccharomyces cereviceae* no se obtuvo inhibición en el crecimiento.

Los estudios de estabilidad dieron como resultado que la oleorresina se puede calentar hasta los 80 ºC y almacenarla en refrigeración (4 ºC) sin que se produzca alteración en su capacidad antibacteriana.

Una de las posibles aplicaciones de la oleorresina estudiada es en productos cárnicos. Se incorporó oleorresina en medallones de carne vacuna picada para analizar si esta inhibe el desarrollo de microorganismos mesófilos y si disminuye la velocidad de acumulación de la metamioglobina, responsable del color pardo de la carne. Los resultados obtenidos muestran que, con una concentración de 0.5 % (1 mg de oleorresina por cada 100 g de carne) se retarda el desarrollo de los microorganismos mesófilos dentro de las primeras 24 hs de almacenamiento y la acumulación de metamioglobina, cuando los medallones son almacenados durante 3 días en refrigeración (4 ºC).

A fin de determinar si el agregado de oleorresina a las hamburguesas producía cambios desagradables en el sabor, se realizó un análisis sensorial utilizando la prueba de medición del grado de satisfacción mediante la utilización de una escala hedónica de 5 puntos. La concentración testada de oleorresina fue del 0,5 %(0,5 g/100 g de mezcla). Las hamburguesas tuvieron buena aceptación ya que el 80 % delos jueces le otorgó valores de 4 y 5 que corresponden a *Me gustó mucho* y *Me gusta poco*.

De acuerdo a los resultados obtenidos la oleorresina de las bayas del Aguaribay resulta una interesante propuesta como antimicrobiano de origen natural de amplio espectro.

Obtención, caracterización y determinación de la actividad antimicrobiana de la oleorresina de las bayas de Aguaribay (*Schinus molle* Linn.)

Tesis Doctoral

Doctorado en Ciencia y Tecnología

Doctorando: Lic. Padin Emilse Verónica

Directora: Dra. Pollio María Lucia

Diciembre 2015

PRODUCCIONES

Artículos en Revistas con referato

PADIN EMILSE V. POSE GRACIELA N. Y POLLIO MARIA L.“Antibacterial activity of oleorresin from Aguaribay (*Schinus molle*L.)”.
Journal of Food Technology: Medwell Journals. 2007 vol. 5 n° 1. p 5 - 8. Issn. 1684-8462**.**

CABALLERO GERARDO; PADIN EMILSE V.; POLLIO MARÍA L “Chemical Composition of Oleoresins from Berries of *Schinus molle* L. Grown in Buenos Aires Province (Argentina)”. Journal of Food Technology: Medwell Journal. 2014 vol.12 n°3. p73 - 77. Issn 1684-8462.

Artículos en Revistas especializada

PADIN EMILSE V.; POLLIO MARÍA L. “Oleorresinas como antimicrobianos de origen natural y su potencial empleo en productos cárnicos”. La Industria Cárnica Latinoamericana nº 137 año 2005 (46-48).

PADIN EMILSE V.; POLLIO MARÍA L. “Aceites esenciales y oleorresinas. Nueva generación de aditivos naturales.Ingeniería Alimentaria: Edigar. 2009 vol. n°79. p54 - 56. Issn 0328-865X.

INDICE

1	**INTRODUCCIÓN**	7
1.1	Especias	7
1.2	Uso de las especias	7
1.3	Composición de las especias	4
1.4	Oleorresina y aceites esenciales	11
1.5	Deterioro de alimentos	13
1.6	Antimicrobianos de origen natural	13
2.0	El Aguaribay (*Schinus molle* Linn)	17
2.1	Taxonomía	17
2.2	Hábitat y distribución geográfica	19
2.3	Descripción de la especie	19
2.4	Silvicultura	21
2.5	Utilidad del Aguaribay	22
2.6	Usos	22
2.6.1	Usos varios	23
2.6.2	Usos medicinales	23
2.6.3	Usos en alimentos	24
2.7	Aceites esenciales y oleorresina de Aguaribay	24
2	**OBJETIVOS**	25
2.1	Objetivo general	25
2.2	Objetivos particulares	25
3	**MATERIALES Y MÉTODOS**	26
3.1	Materiales, preparación y caracterización	26
3.1.1	Materiales	26
3.1.2	Preparación de la muestra	27
3.1.3	Caracterización	28
3.1.3.1	Determinación de la actividad de agua de las bayas	28
3.1.3.2	Determinación de la humedad de las bayas	29
3.2	Obtención y caracterización de la oleorresina	30
3.2.1	Obtención de la oleorresina	30
3.2.2	Caracterización	31
3.2.2.1	Determinación de la densidad	31
3.2.2.2	Determinación del pH y absorción en UV-Visible	32
3.2.2.3	Determinación de la composición química	32
3.3	Determinación de la capacidad antimicrobiana	32
3.3.1	Bacterias	33
3.3.1.1	“Screening” de la actividad antimicrobiana	34
3.3.1.2	Determinación de la mínima concentración letal	35
3.3.2	Hongos	36
3.3.2.1	Ensayo de la inhibición del crecimiento micelial	37
3.3.2.2	Efecto sobre la germinación se esporas del genero *Aspergillus* (CN fungistático y fungicida)	38
3.3.3	Levaduras	39
3.3.3.1	Efecto del etanol el levaduras	40
3.3.3.2	Ensayo de la inhibitorio en levaduras	40
3.4	Análisis de la estabilidad de la oleorresina en el efecto antibacteriano	41

3.5	Aplicaciones	41
3.5.1	Formulación de medallones	41
3.5.2	Elaboración de los medallones	42
3.5.3	Determinación del efecto de la oleorresina sobre la flora nativa de medallones de carne vacuna picada.	43
3.5.4	Porcentaje de acumulación de metilmioglobina	44
3.5.5	Análisis sensorial	45
4	**RESULTADOS Y DICUSIÓN**	47
4.1	Caracterización de las bayas	47
4.1.1	Actividad de agua	47
4.1.2	Humedad	48
4.2	Obtención y caracterización de la oleorresina	51
4.2.1	Obtención	51
4.2.2.	Caracterización	54
4.2.2.1	Densidad	54
4.2.2.2	pH y absorción en UV-Visible	54
4.2.2.3	Composición química	54
4.3	Capacidad antimicrobiana	57
4.3.1	Bacterias	57
4.3.1.1	"Screening"(susceptibilidad) de la capacidad antimicrobiana	57
4.3.1.2	Mínima concentración letal	59
4.3.2	Hongos	60
4.3.2.1	Inhibición del crecimiento micelial	60
4.3.2.2	Efecto sobre la germinación se esporas del genero *Aspergillus* (CN fungistático y fungicida)	62
4.3.3	Levaduras	64
4.3.3.1	Efecto del etanol sobre levaduras	64
4.3.3.2	Inhibición del crecimiento de levaduras	65
4.4	Estabilidad de la oleorresina	66
4.5	Aplicaciones	68
4.5.1	Efecto de la oleorresina en la flora nativa de los medallones de carne vacuna picada.	68
4.5.2	Porcentaje de acumulación de metamioglobina	70
4.5.3	Análisis sensorial	72
5	**RESUMEN DE LOS RESULTADOS ENCONTRADOS**	73
6	**CONCLUSIONES FINALES**	74
7	**BIBLIOGRAFÍA**	74
	ANEXO I	84

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Especias

Se considera especia, según Gerhardt (1975), a “la parte de ciertas plantas (raíces, rizomas, bulbos, cortezas, hojas, tallos, flores, semillas) en estado natural, desecadas y/o sometidas a elaboración mecánica que por su sabor o aroma característico, sazonan a los alimentos para consumo humano”. Las especias generalmente carecen de clorofila e incluyen rizomas o raíces (jengibre), cortezas (canela), yemas florales (clavo), frutos (eneldo, pimienta) y semillas (nuez moscada, mostaza).

Las hierbas en cambio, según los esquemas botánicos de clasificación, comprenden materiales aromáticos tales como plantas herbáceas, como la albahaca, mejorana, orégano, romero, tomillo, así como los arbustos aromáticos (salvia) y hojas de árbol (laurel) (Fennema, 2000).

En el mundo hay 250 mil especies vegetales. En el mercado mundial, el 50% de las plantas son utilizadas en alimentación, 25% en la industria cosmética, 20% en la industria farmacéutica y un 5% en otros rubros (Cañigueral *et al*., 2001). En la industria agroalimentaria forman parte de los condimentos alimenticios.

1.2 Usos de las especias

Se tienen innumerables registros del uso de las especias. En China durante la dinastía Yin (1500 a.C.) se realizaban grabados sobre huesos acerca de las virtudes de numerosas plantas. En papiros egipcios (1900 a.C.) se mencionan plantas como el ajenjo, ajo, coriandro, enebro, genciana, hinojo y tomillo. Los pueblos de sumeria, asiria y babilonia hacían referencia a las virtudes de aproximadamente 250 especies vegetales entre las que se destacan la mirra, el pino, la hoja del dátil, el aloe, la amapola, la belladona y el coriandro. En la India, se encontraron registros que correspondían al año 1000 a.C., en el que se mencionan especias y plantas aromáticas para uso alimenticio como el jengibre, nuez moscada, pimienta, regaliz, albahaca, comino, azafrán y ajo.

También, desde la antigüedad, las especias fueron utilizadas por sus propiedades terapéuticas. En la Imagen 1 se puede ver un papiro de 20 m de longitud, hallado en Luxor en el año 1873, en el cual se dan 870 prescripciones a base de mirra, flores de ciprés, aceite de castor, aceite de ricino, trementina y dátiles.

Imagen 1: Papiro antiguo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Como ejemplo, en la Tabla 1 se mencionan usos medicinales de la pimienta negra (Balasubramanian *et a.,* 2015).

Tabla 1: Usos medicinales de la pimienta.

Usos	Beneficios de la pimienta
Estómago	Aumenta las secreciones del estómago ayudando a la digestión y favorece la eliminación de gases.
Colesterol	Su uso habitual favorece la disminución del colesterol, esto se debe a la piperina, un alcaloide, que actúa sobre los niveles de colesterol. Posee además fitoesteroles vegetales que disminuyen la absorción del colesterol dietario.
Sangre	Es utilizada para tratar la arterioesclerosis ya que posee propiedades fluidificantes de la sangre.
Piel	Ayuda a curar el Vitíligo, enfermedad que provoca despigmentación en algunas áreas de la piel.
Catarros y gripe	El cataplasma de pimienta se utiliza como expectorante en bronquitis y pulmonías. Se puede añadir en los tónicos para combatir catarros y gripe. Alivia la sinusitis y congestión nasal.

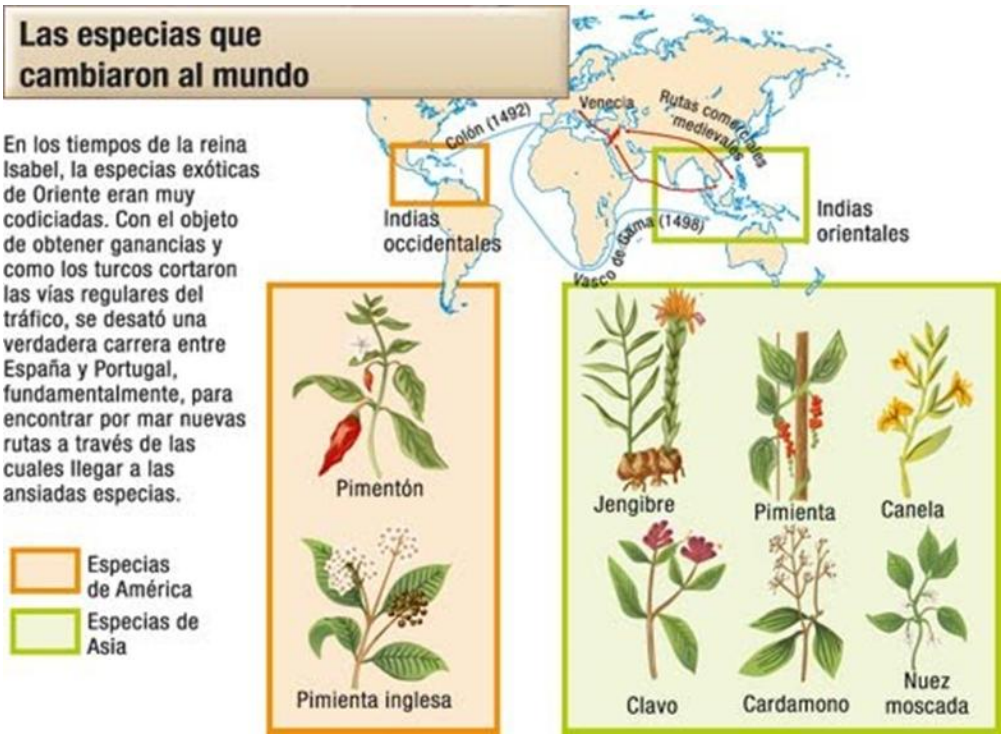
Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Antioxidante	Previene o repara el daño causado por los radicales libres, lo que a su vez previene el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y los problemas de hígado.

(http://otramedicina.imujer.com/4067/beneficios-de-la-pimienta-negra-para-la-salud).

Así mismo, las expediciones europeas a América, África y Asia llevaron a Europa especias junto con otros productos alimenticios que transformaron la cocina europea. La Figura 1 muestra las especias intercambiadas entre América y Asia pasando por Europa (https://sites.google.com/site/historiaalimentacion/el-intercambio-de-alimentos-entre-amrica-y-europa)(Toffoli de Matheos, 1982).

Figura 1: Intercambio de especias.



1.3 Composición de las especias

Las hierbas y las especias poseen compuestos volátiles (abundantes o escasos) responsables del aroma y sabor (“flavor”) característico de ellas. En la Tabla 2 se resumen los compuestos más importantes existentes en las principales hierbas y especias utilizadas en la preparación de alimentos y en la Figura 2 se muestran algunas de sus estructuras químicas, Fennema (2000).

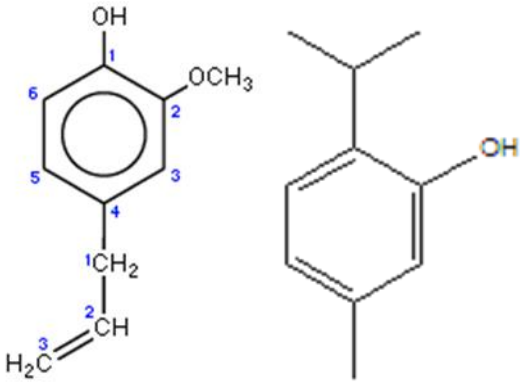
Tabla 2: Compuestos presentes en algunas hierbas y especias.

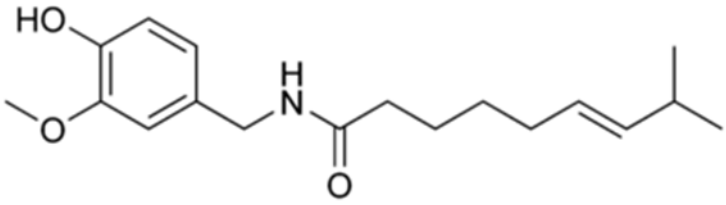
Especia	Parte de la planta	Compuestos del flavor
Pimienta	Bayas, hojas	Eugenol, β-cariofileno
Anís	Frutos	(E)-Anetol, metilcavicol
Pimienta(caspsicum)	Frutos	Capsaicina, dihidrocapsaisina
Alcaravena	Frutos	*d*-Carvona, derivados de carvona
Cardamomo	Frutos	Ace. de α-terpenilo, 1,8-cineol, linalool
Canela,casia	Corteza, hojas	Aldehído cinámico, eugenol
Clavo	Brotes florales	Eugenol, acetato de eugenol
Cilantro	Frutos	*d*- linalool, 2-alquenales-C_{10}-C_{14}
Comino	Frutos	Aldehído cumínico *p*-1,3-mentadienal
Eneldo	Frutos, hojas	*d*-Carvona
Hinojo	Semillas, frutos	(E)-Anetol, fenchona
Jengibre	Rizona	Gingerol, shogaol, neral, geranial
Macis	Arilo	α-Pineno, sabineno, 1-terpenin-4-ol
Mostaza	Semillas	Isotiocianatos de alilo
Nuez moscada	Semillas	Sabinina, α-pineno, miristicina
Perejil	Hojas, semillas	Apiol
Pimienta	Frutos	Piperina, δ-3-careno, b-carifileno
Azafrán	Estigma	Safranal
Cúrcuma	Rizoma	Turmerona, zingeribereno, 1-8-cineol
Vainilla	Frutos, semillas	Vanillina, éter *p*-OH-bencilmetilico
Albahaca	Hojas	Metilchavicol, linalool, metileugenol
Laurel	Hojas	1,8-Cineol
Mejorana	Hojas, flores	Hidratos de c-t-sabineno, terminen-4-ol
Orégano	Hojas, flores	Carvacrol, timol
Salvia clara	Hojas	Salvia 1-4(14)-en-1-ona, linalool
Salvia dálmata	Hojas	Tuyona, 1-8-Cineol, alcanfor
Salvia española	Hojas	c- y t-acetato de sabinilo, 1,8-cineol
Ajedrea	Hojas	Carvacrol
Estragón	Hojas	Metilchavitol, anetol
Tomillo	Hojas	Timol, carvacrol
Menta piperina	Hojas	l-mentol, mentona, mentofurano
Menta	Hojas	l-carvona,derivados de carvona
Romero	Hojas	Verbenona, 1,8-cineol, alcanfor, linalol

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Figura 2: Estructuras químicas de los compuestos.

Eugenol ***Timol***





Capsaicina

1.4 Oleorresinas y aceites esenciales

En la actualidad, se utilizan los extractos de las hierbas aromáticas y de las especias en lugar de las plantas secas. Los compuestos volátiles y no volátiles extraídos de las especias, representan el sabor completo de la especia fresca en una forma concentrada evitando la variación de las intensidades y de las características del sabor que pueden ocurrir ya sea por variaciones de la especie vegetal, época de cosecha, origen o adulteraciones (Ribeiro *et al*., 2001; Benezet *et al*., 2003). Los extractos aseguran una mayor vida de anaquel debido a la baja degradación por oxidación o pérdida de sabor y se elimina el deterioro debido a plagas y microbios.

Los extractos son denominados aceites esenciales u oleorresinas, según el método de obtención.

Los aceites esenciales, en el caso de las especias, se obtienen por destilación por arrastre con vapor y contienen los compuestos responsables del aroma. Se obtienen de flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza de árboles, hierbas, maderas, frutas y raíces.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Son volátiles y, usualmente, solubles en alcohol o éter, siendo muy pocas veces solubles en agua (Tainter, *et al*., 1993).

Las oleorresinas se extraen a partir de la especia molida y contienen además de los aceites volátiles, resinas, gomas y los componentes responsables de las características pesadas del sabor, así como de la pungencia y el color. Por ejemplo, el aceite esencial de la pimienta negra solo posee el aroma de la especia recién molida pero no su pungencia que le confiere la piperina que sí se encuentra en la oleorresina. Lo mismo sucede con la oleorresina extraída del jengibre que tiene un sabor ardiente debido a sustancias no volátiles que no están presentes en el aceite esencial (Ribeiro *et al*., 2001).

Las oleorresinas son estables en las aplicaciones a altas temperaturas y su sabor es idéntico al de la especia seca natural ya que el solvente es eliminado casi en su totalidad. El empleo de solventes orgánicos en la extracción de productos naturales representa un proceso que debe ser cuidadosamente desarrollado por los impactos que tiene sobre el medioambiente y sobre la salud de operarios y consumidores. La inflamabilidad, volatilidad y eventual toxicidad de algunos de ellos como el hexano, éter de petróleo, acetato de etilo y acetona hace que se manejen con ciertas restricciones aunque esto no necesariamente implica que se prohíbe su uso. Por ejemplo, la Comisión Europea en la directiva 94/45/CE (1995) establece que los solventes que pueden emplearse para la extracción de oleorresinas de pimentón son metanol, etanol, acetona, hexano, acetato de etilo, diclorometano y dióxido de carbono. Además determina que los residuos de disolventes, bien sea solos o en conjunto no pueden superar50 mg/kg, en el caso específico de diclorometano no más de 10 mg/kg.

El Código Alimentario Argentino (C.A.A.) (Cap. XVIII, 2014) establece la concentración máxima permitida de los solventes usados en la extracción para su uso en alimentos. Las cantidades máximas permitidas van desde 0,1 mg/kg para el diclorometano a 10 mg/kg para acetato de etilo, entre otros. El etanol está autorizado como diluyente y no se especifica la dosis siendo que el etanol es considerado un compuesto “seguro”.

La mayor ventaja de los aceites esenciales y las oleorresinas es que son productos naturales libre de residuos de pesticidas y con las mismas propiedades de la especia original. A lo largo de la historia de la humanidad estos productos pasaron de tener un papel hegemónico en el arsenal terapéutico y alimenticio a un discreto segundo plano, para volver a tener, en las últimas décadas, una presencia cada vez mayor (Cañigueral *et al*., 2001). Se comenzaron a estudiar años atrás y continúan siendo analizados a fin de determinar sus propiedades y posibles aplicaciones. Es común, en el presente, encontrar en farmacias y dietéticas productos a base de aceites esenciales y oleorresinas de especias con propiedades calmantes, adelgazantes, energizantes, etc.. La tendencia al uso de productos naturales también llegó a la industria de alimentos por lo que, teniendo como base los estudios de las propiedades medicinales de plantas, los investigadores

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

comenzaron a analizar si las especias que se utilizaban en alimentos como saborizantes y aromatizantes, se podían usar, además, como conservantes de origen natural. El análisis se focalizó en determinar su aptitud para actuar sobre dos de los principales deterioros que sufren los alimentos como son la oxidación de lípidos y el ataque por agentes microbianos (Fennema, 2000).

1.5 Deterioro de alimentos

Una de las principales causas del deterioro de alimentos se produce por el ataque de hongos entre los cuales se encuentran, entre otros, especies del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Restaino *et al.,* 1983*;* Pitt *et al*., 1997). Otro posible agente causante del deterioro en alimentos son las levaduras tales como las del género *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Isamil *et al.,* 2000; Quintas *et al.,* 2000; López-Malo *et al.,* 2002; Medawar et *al.,* 2003; Salo *et al.,* 2005). Así mismo, los alimentos pueden ser susceptibles a la contaminación, directa o cruzada, por diversas bacterias entre los que se pueden mencionar *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli,E. coli* O157: H7, *Bacillus cereu* y *Listeria monocytogenes*, siendo estás, además, responsables de las ETAs (enfermedades transmitidas por alimentos) (Kampelmacher 1983; Rubeglio*et al.,* 2007; Martino 2010). Otro deterioro importante, en alimentos grasos, es la rancidez oxidativa.

Estos deterioros se evitan con el uso de conservantes químicos que son compuestos no totalmente inocuos. La Organización Mundial de la Salud, en el año 1962, en el Informe Técnico 228, evalúa la toxicidad de antioxidantes y antimicrobianos sintéticos. Entre ellos, se encuentra el BHA (Butilhidroxianisol), utilizado como antioxidante de grasas animales, que tiene efecto cancerígeno a largo plazo y los parabenos. Los parabenos (ésteres del ácido para-hidroxibenxoico con metanol, etano o propanol) se utilizan en fiambres como antimicrobianos. En algunos casos pueden presentarse problemas de alergia a los mismos y, además, confieren un cierto sabor fenólico a los productos (Organización Mundial de la Salud, 1962). Otros conservantes, utilizados también en productos cárnicos, son los nitritos y nitratos, que al unirse a la hemoglobina de la sangre impiden el transporte de oxígeno. Uno de los más antiguos, el anhídrido sulfuroso, usado en vinos y en alimentos congelados, eficaz contra bacterias, hongos y levadura, produce la destrucción de la tiamina (vitamina B_1) que es esencial para el crecimiento y desarrollo normal del corazón y del sistema nervioso central (Benezet *et al,* 2003; Ibañez *et al,* 2003).

1.6 Antimicrobianos y antioxidantes de origen natural

Es basta la bibliografía que describe el poder antimicrobiano y antioxidante de los aceites esenciales no así el de las oleorresinas. Rodríguez Saucedo (2011) hace

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

referencia a la capacidad antimicrobina del aceite esencial de el orégano la cual inhibe el crecimiento de bacterias y hongos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Rodotorrula* y *Aspergillus niger.*

Rodriguez *et al*., (1996) estudiaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial y la oleorresina de la pimienta dioica o pimienta de jamaica encontrando que eran efectivos contra bacterias, hongos y levadurasTanto el aceite esencial como la oleorresina inhiben el crecimiento de bacterias tales como *Escherichia coli* y*Klebsiella pneumoniae* mientras que *Pseudomona aeruginosa* fue resistente al aceite esencial pero no a la oleorresina, el crecimiento de los hongos y de levaduras se inhibe tanto por el aceite esencial como por la oleorresina. Daferera *et al*., (2000) analizaron el poder antifúngico de aceites esenciales extraídos de tomillo, orégano y mejorana hallando que inhiben la germinación de esporos de *Penicillium digitatum*. Delaquis *et al*., (2002) determinaron que los aceites esenciales de cilantro, eneldo, coriandro y eucalipto son eficaces contra *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus y Listeria monocytogenes* siendo el aceite esencial de cilantro el que mostró mayor poder para inhibir el crecimiento de las bacterias estudiadas. Soliman *et al*., (2002) encontraron que los aceite extraídos de tomillo, menta y albahaca eran efectivos sobre hongos toxicogénicos del género *Aspergillus*. Ngueфack *et al*., (2004) analizaron aceites esenciales de lemongras y jengibre como inhibidores del crecimiento de hongos productores de micotoxinas. Lee *et al.* (2004) plantean la alternativa de usar aceites esenciales por su poder antimicrobiano no solo en medicina sino también en la industria de los cosméticos y principalmente en la industria alimenticia. Es particularmente interesante destacar que ciertos aceites esenciales son más efectivos que los agentes antimicrobianos sintéticos. Por ejemplo, el aceite de albahaca de clavo posee la misma eficacia que el sorbato de potasio en la preservación de productos alimenticios (Ngueфack *et al*., 2004).

Los principales constituyentes de los aceites esenciales son mono y sesquiterpenos, carbohidratos, alcoholes, éteres, aldehídos y cetonas. Estos compuestos son los responsables de la fragancia, el flavor y de las propiedades como antimicrobianos y antioxidantes Kalemba *et al.,* (2003). La Tabla 3 muestra algunos de los componentes de los aceites esenciales de especias y hierbas aromáticas que presentan propiedades antibacterianas y los porcentajes en que se encuentran y en la Tabla 4 se especifican algunas de las bacterias que son afectadas por estos extractos (Burt, 2004).

Tabla 3: Componentes mayoritarios de los aceites esenciales que presentan propiedad antibacteriana

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Aceite Esencial Nombre Común	Nombre en Latín	Componente Mayoritario	% Composición
Orégano	*Origanum vulgare*	Carvacrol Timol γ- Terpineno p- Cimeno	Traza- 80% Traza- 64% 2- 52% Traza- 52%
Romero	*Rosmarinus officinalis*	α- Pineno Bornilo acetato Alcanfor 1,8- cineol	2- 25 % 0- 17% 2- 14% 3- 89%
Salvia	*Salvia Officinalis L.*	Alcanfor α- Pineno β- Pineno 1,8- cineol α- Tujona	6- 15% 4- 5% 2- 10% 6- 14% 20- 42%

Tabla 4: Efecto de diversos aceites esenciales sobre bacterias contaminantes de alimentos.

Aceite Esencial	Especie Bacteriana
Orégano	*Escherichia coli* *Salmonella typhimurium* *Staphylococcus aureus*
Romero	*Escherichia coli* *Salmonella typhimurium* *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* *Listeria monocytogenes*
Salvia	*Escherichia coli* *Salmonella typhimurium* *Staphylococcus aureus*

Respecto a oleorresinas, Singh *et al*., (2004) estudiaron la actividad antioxidante y antifúngica de la oleorresina de la pimienta extraída con acetona, encontrando una eficiencia del 100% contra *Fusarium graminarum* y *Aspergillus ochraceus*. Chizzola *et al*., (2008) analizaron las propiedades antioxidantes del extracto obtenido por extracción con diclorometano de tomillo. Escudero (2009), analizó el poder antioxidante de la oleorresina extraída de las bayas del aguaribay y demostró que en algunos casos era más efectiva que los antioxidantes sintéticos usados en alimentos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Las oleorresinas están constituidas principalmente por monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados, hidrocarburos policiclícos tales como el ciclohexeno, entre otros. En las Tabla 5 se muestra la composición de algunas oleorresinas y en la Tabla 6, el efecto sobre diversos microorganismos.

Tabla 5: Componentes mayoritarios de las oleorresinas

Oleorresina Nombre Común	Nombre en Latín	Componente Mayoritario	% Composición
Pimienta negra (1)	*Pipernigrum*	Piperina	33,53
		Alcaloides	12
Tomillo (2)	*Thymus pectinatus*	Timol	49,8
		γ-Terpeno	16,1
Orégano (3)	*Origanum vulgare*	Timol	96

(1) Singh *et al.,* (2004); (2) Vardar-Unlu *et al.,* (2003); (3) Salamanca García *et al.* (2009).

Tabla 6: Efecto de diversas oleorresinas sobre bacterias contaminantes de alimentos.

Oleorresinas	Especie Bacteriana
Romero (1)	*Salmonella typhimurium*
	Listeria monocytogenes
	Shigella sonnei
Clavo (2)	*Escherichia Coli*
	Pseudomona aeruginosa
	Staphylococcus aureus
Canela (3)	*Escherichia Coli*
	Bacillus subtilis
	Staphylococcus aureus

(1) Castaño *et al.,* (2020); (2) Kumar *et al.* (2010); (3) Castaño Sepúlveda *et al.,* (2012).

Como se establece en bibliografía, las oleorresinas y aceites esenciales extraídos de hierbas aromáticas y especias muestran actividad antimicrobiana y antioxidante. Es por ello que, en los últimos años se comenzaron a usar en la industria alimenticia como conservantes de origen natural para prevenir el deterioro de los alimentos (Sachetti *el al*., 2005). En especial, las oleorresinas podrían llegar a sustituir a los antimicrobianos y antioxidantes sintéticos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2. El Aguaribay (*Schinus molle Linn*)

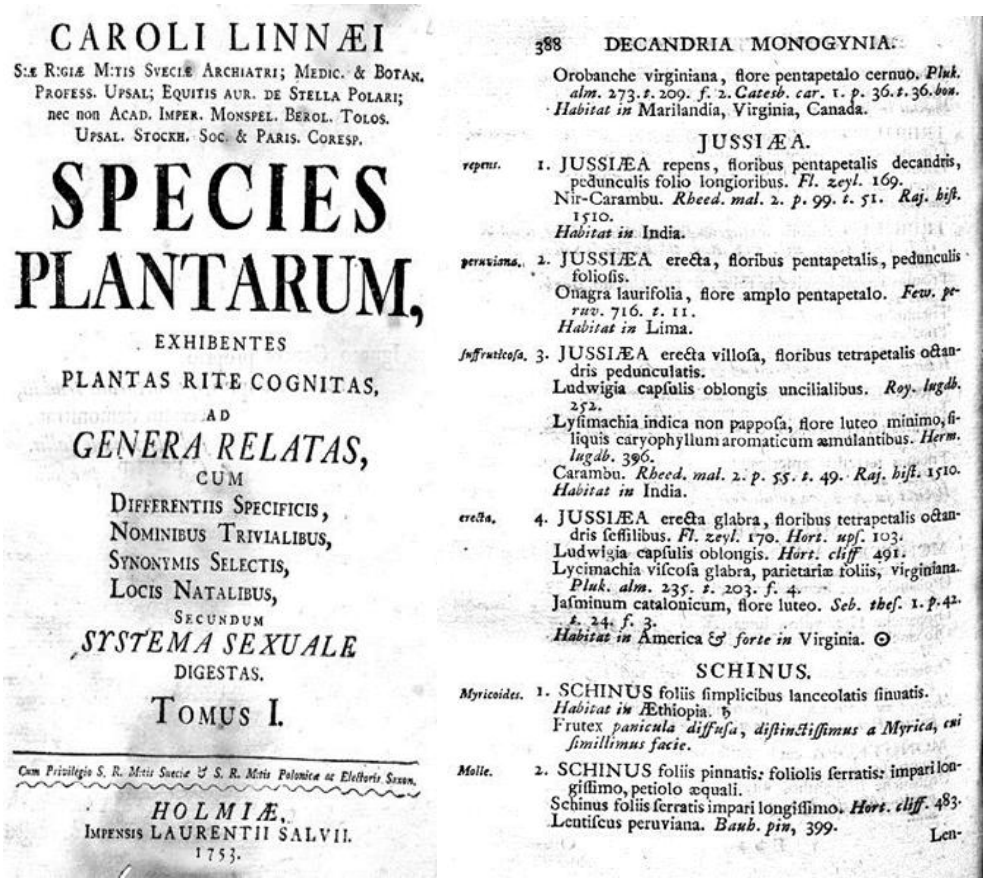
2.1. Taxonomía

El Aguaribay es un árbol de gran porte muy común en América del Sur (Imagen 2) perteneciente a la especie *Schinus molle*. Esta especie fue descripta por primera vez por Carlos Linneo en 1753 en su libro Species Plantarum (tomo I, páginas 388–389) (Imagen 3).

Imagen 2: El Aguaribay.

Imagen 3: Libro Species Plantarum

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes



CAROLI LINNÆI

S:æ R:giæ M:tis Sveciæ Archiatri; Medic. & Botan. Profess. Upsal; Equitis aur. de Stella Polari; nec non Acad. Imper. Monspel. Berol. Tolos. Upsal. Stockh. Soc. & Paris. Coresp.

SPECIES PLANTARUM,

EXHIBENTES

PLANTAS RITE COGNITAS,

AD

GENERA RELATAS,

CUM

Differentiis Specificis,
Nominibus Trivialibus,
Synonymis Selectis,
Locis Natalibus,

Secundum

SYSTEMA SEXUALE

DIGESTAS.

Tomus I.

Cum Privilegio S. R. Mtis Suecie & S. R. Mtis Polonica ac Electoris Saxon.

HOLMIÆ,
Impensis LAURENTII SALVII.
1753.

388 DECANDRIA MONOGYNIA.

Orobanche virginiana, flore pentapetalo cernuo. *Pluk. alm.* 273. *t.* 209. *f.* 2. *Catesb. car.* 1. *p.* 36. *t.* 36. *bon.*
Habitat in Marilandia, Virginia, Canada.

JUSSIÆA.

repens. 1. JUSSIÆA repens, floribus pentapetalis decandris, pedunculis folio longioribus. *Fl. zeyl.* 169.
Nir-Carambu. *Rheed. mal.* 2. *p.* 99. *t.* 51. *Raj. hist.* 1510.
Habitat in India.

peruviana. 2. JUSSIÆA erecta, floribus pentapetalis, pedunculis foliosis.
Onagra laurifolia, flore amplo pentapetalo. *Few. peruv.* 716. *t.* 11.
Habitat in Lima.

suffruticosa. 3. JUSSIÆA erecta villosa, floribus tetrapetalis octandris pedunculatis.
Ludwigia capsulis oblongis uncilialibus. *Roy. lugdb.* 252.
Lysimachia indica non papposa, flore luteo minimo, siliquis caryophyllum aromaticum æmulantibus. *Herm. lugdb.* 396.
Carambu. *Rheed. mal.* 2. *p.* 55. *t.* 49. *Raj. hist.* 1510.
Habitat in India.

erecta. 4. JUSSIÆA erecta glabra, floribus tetrapetalis octandris sessilibus. *Fl. zeyl.* 170. *Hort. upsl.* 103.
Ludwigia capsulis oblongis. *Hort. cliff.* 491.
Lycimachia viscosa glabra, parietariæ foliis, virginiana. *Pluk. alm.* 235. *t.* 203. *f.* 4.
Jasminum catalonicum, flore luteo. *Seb. thes.* 1. *p.* 42. *t.* 24. *f.* 3.
Habitat in America & *forte in* Virginia. ☉

SCHINUS.

Myricoides. 1. SCHINUS foliis simplicibus lanceolatis sinuatis.
Habitat in Æthiopia. ♄
Frutex *panicula diffusa, distinctissimus a Myrica, cui simillimus facie.*

Molle. 2. SCHINUS foliis pinnatis: foliolis serratis: impari longissimo, petiolo æquali.
Schinus foliis serratis impari longissimo. *Hort. cliff.* 483.
Lentiscus peruviana. *Baub. pin,* 399. Len-

El nombre científico del Aguaribay es *Schinus molle Linn* variedad Areira. Pertenece a la familia de las Anacardiáceas. Las Anacardiáceas es una familia constituida por 500 especies herbáceas y arbustivas. El origen de esta familia proviene de regiones de climas cálidos pero también se encuentra en regiones de clima tropical. Otros miembros de esta familia son el mango (*Mangifera indica)* que crece en regiones tropicales, el pistacho (*Pistacia vera*) en la región del Mediterráneo y el zumaque (*Rhus coriaria*) en la región del Etna (www.dipbot.unicit.it/sistematica_es/Anac_fam.html).

El Aguaribay, según el país de origen es la denominación que recibe (Tabla 7).

Tabla 7: Denominación del aguaribay en diferentes países.

País	Nombre
Argentina	molle, aguaribay
Chile	pimiento boliviano
Uruguay	anacahuita, aguaribay
Perú	molle, aguaribay, huaribay, cuyash, falsa pimienta, kullakz

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Estados Unidos	Peruvianmastic
Bolivia	pirul, falsa pimienta
Costa Rica	pimiento de California

2.2. Hábitat y distribución geográfica

Es un árbol originario de América del Sur. En nuestro país se lo encuentra desde La Pampa hasta Jujuy en forma espontánea. Su hábitat normal es en los montes de quebrada aunque no forma asociaciones puras, encontrándose ejemplares aislados a lo largo de toda su distribución natural. Crece en zonas de alta insolación por lo que es muy resistente a la sequía. Su mejor desarrollo lo alcanza con precipitaciones entre 250-600 mm. Sin embargo puede crecer en ambientes extremadamente áridos pero con presencia de acuíferos subterráneos, bien drenados, para lo cual posee raíces profundas. Puede resistir anegamientos estacionales.

Moderadamente resistente al frío, prefiere temperaturas medias mínimas cercanas a los 13ºC, entre 8 y 16.5ºC. Las temperaturas medias máximas son de alrededor de los 26ºC, siendo muy tolerante a las altas temperaturas, pudiendo resistir largos períodos sobre los 34ºC de temperatura.

Se considera una especie vaga con respecto a las preferencias del suelo ya que crece tanto en suelos arcillosos a arenosos. Habita en suelos neutros a alcalinos siendo muy resistente a la alcalinidad.

Presenta alelopatía, es decir, inhibe el crecimiento y/o desarrollo de plantas vecinas, por los alcoholes que elimina a través de hojas y frutos.

Fue el árbol sagrado de los Incas que lo llamaban “Molli” que se convirtió en “Molle” al ser castellanizado. En Estados Unidos de Norte América fue introducido por las misiones españolas, en México se introdujeron semillas provenientes de Perú. En el siglo XVI es introducido en las zonas templadas y subtropicales del mediterráneo. (Agroforestry tree base de datos), (www.herbotecnica.com.ar).

2.3. Descripción de la especie

Es un árbol de porte mediano a grande, su follaje es persistente y sus ramas son pendulares y delgadas. Alcanza alturas entre los 10 y 15 metros. Su tronco es grueso y resinoso, de aproximadamente 80-100 centímetros de diámetro, la copa es globosa y la corteza persistente, escamosa y áspera, de color café claro a ligeramente grisáceo.

Presenta un follaje perenne, denso o abierto, con ramas y ramillas colgantes, de color verde claro y copa amplia. Las hojas son imporipinadas, compuestas de 5 a 9 pares

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

de folios lanceolados, son agudas y aserradas. El tamaño de las hojas oscila entre los 5 y los 12 centímetros de largo, el color varía desde el verde claro hasta el verde grisáceo. (Imagen 4). (www.herbotecnica.com.ar), (Milian, 1998).

La flor masculina posee un cáliz con 5 sépalos, 5 pétalos y 10 estambres mientras que la flor femenina posee estambres rudimentarios y ovarios súperos. (Imagen 5) (Barbosa. *et al.,* 2006).

Imagen 4: Hojas

http://eljardindelospresentes.bligoo.com.armediausers8401259imagespublic28070minimas_aguaribay.jpgv=1274379344242

Imagen 5: Flores

http://www.guayubira.org.uy/monte/Anacahuita.

Algunas de las flores que posee el Aguaribay son hermafroditas, es decir con ambos sexos, en tanto que otras son masculinas, por este motivo es una especie polígamo dioica.

(Lombardo, 1979). Las flores hermafroditas y las masculinas se encuentran en distintos árboles. Las flores masculinas no dan fruto (Carrere, 2009). Por lo que el macho y la hembra se deben hallar juntos. La floración se da durante la primavera y el verano, las flores son amarillentas, dispuestas en amplias panojas axilares y terminales.

Este árbol florece de Octubre a Enero, es decir, en primavera y verano. Su primera floración ocurre después de los 10 años y luego florece anualmente. Las inflorescencias son muy ramificadas, largas y colgantes, con flores pequeñas color blanco verdoso o amarillento.

El fruto es una baya ó drupa globosa con cáliz persistente de unos 5 o 7 milímetros de diámetro con epicarpio papiráceo de color rojizo y en su interior se encuentra una semilla ovoide amarillenta de 2,5 a 3.5 milímetros de diámetro. Fructifica a partir de enero, las bayas se desarrollan desde un color verde hasta rojizo o rosado por el cual las bayas son conocidas como pimienta rosa (Imagen 6) (www.herbotecnica.com.ar), Milian, 1998). Los frutos maduran entre los meses de Febrero a Marzo y permanecen en el árbol prácticamente todo el año presentando un mesocarpio azucarado y exocarpio de un color rojizo llamativo. Las semillas son negras, rugosas, redondeadas, con un diámetro entre 3 y 5 mm.

Imagen 6: Frutos.

2.4 Silvicultura

Este árbol se reproduce fácilmente por semillas. Un kilo de semillas presenta aproximadamente entre 15.000 y 60.000 unidades de las mismas, con alrededor del 80% de capacidad germinativa. Los frutos se recolectan del árbol cuando han adquirido una tonalidad rosada. Luego de un período de exposición al sol, los frutos son escarificados mecánicamente por frotación con arena, lija o esmeril, con el objeto de eliminar la cubierta externa. Enseguida se siembran en cajones con arena o turba húmeda y se almacenan a 4ºC.

Otro procedimiento es el almacenaje en lugares fríos y secos y el posterior remojo de las semillas ya escarificadas en agua durante 48 horas a temperatura ambiente.

Se recomienda sacar las semillas del frío en el mes de agosto para comenzar su germinación a una temperatura entre 18 y 22ºC. La semilla tarda en germinar entre 20 y 35 días, pero es posible reducir este período a 7 días con inmersión en solución de hormonas o con siembra directa en sitios de buena calidad. Cuando las plántulas han alcanzado una altura de 10-15 cm, se trasplantan a envases o macetas individuales, con una mezcla de arena, suelo y materia orgánica. El sistema radicular es abundante y profundo, pudiendo ser repicadas entre las 4 y las 6 semanas.

Una vez en la tierra, presenta rápido crecimiento dependiendo de la calidad de los suelos. En vivero crece entre 50 cm y 1.20 m de altura en el primer año de vida y a los 3-4 años los arbolitos pueden medir entre 2-2.5 m de altura y presentar un diámetro de 10 cm. A los 10 años pueden alcanzar un tamaño de 5 a6 metros.

Al momento de la plantación, se debe considerar que requiere de amplios espacios debido a su vasta cobertura.

(http://foro.fuentedepermacultura.org/index.php?topic=905.0)

2.5 Utilidad del Aguaribay

Las ventajas del cultivo de *S.molle* se basan en la gran versatilidad edáfica y climática y a su rápido crecimiento, lo que permite su aplicación en diversos aspectos. Se asocia con cultivos agrícolas por utilizarse como linderos, cortinas rompevientos, protección de riberas, conservación de cuencas, etc.. También, es muy utilizado como ornamental en el arbolado de calles, parques y también en zonas rurales. (www.herbotecnica.com.ar, http//www.fcapital.com.ar).

2.6 Usos

Las diferentes partes del árbol del Aguaribay, pueden ser empleadas para distintos usos debido al alto contenido de aceites esenciales o aromáticos. La corteza presenta una importante cantidad de extraíbles químicos tales como taninos, oleorresinas, ácido

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

linoléico, erúcico y lignocérico. En las hojas se encuentran, taninos, flavonoides, carbohidratos, ácido linoléico, además de triterpenos y glicósidos. Las semillas contienen ácido linoléico y una gomo-oleorresina con compuestos responsables del sabor y pungencia. Los frutos y semillas presentan aceites esenciales entre los cuales se encuentran mireceno, felandreno, limoneno, cardinal, carvacrol, terpineol (Montes, 1961, Jennings, 1975, Maffei, 1990, Chirino, 2001, Morongiu *et al.*, 2004).

2.6.1 Usos varios

En Perú, las semillas son fermentadas para producir una bebida similar a la chicha.

En los Valles Calchaquíes es usado para teñir tejidos de lana a la que le da un color amarillento. (Martínez, 2006).

Esta especie es utilizada, además, como insecticida y repelente natural. Autores como Millán, (2008) sostiene que *"Sus hojas contienen una resina que posee propiedades insecticidas, funguicidas y repelentes. Se emplea para el control de hormigas, pulgones y polillas de la papa".*

Sobre el aceite esencial de las hojas y de los frutos Morales, (2009) comenta que *"…han mostrado ser un efectivo repelente de insectos, particularmente contra la mosca casera."*

2.6.2. Usos medicinales

Las bayas junto con el jugo de las hojas y la savia del tronco son las tres partes más utilizadas del árbol en la industria farmacológica para la cura de diferentes afecciones (Kramer, 1957).

En medicina tradicional se emplean corteza, follaje y frutos, aunque la especie no se halla inscripta en la Farmacopea nacional de nuestro país.

El uso más popular que se le da al Aguaribay es una infusión realizada con las hojas para tratar resfriados, tos y bronquitis. Según Roig (2002) además de ser benéfica para el catarro tiene propiedades como antivenéreo, emenagogo, antiinflamatorio, etc..

Para enfermedades de los riñones se realiza el cocimiento de 10 gramos de la raíz por cada litro de agua. La corteza de la raíz seca y pulverizada se emplea para enfermedades de la piel.

La cocción de las ramas jóvenes se utiliza para enfermedades de los dientes como ser la piorrea y los dientes flojos.

La resina que produce el árbol, seca y pulverizada, es utilizada para la desinfección de heridas. (Carrere, 2009). El aceite esencial suministrado en cápsulas es útil para la blenorragia.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2.6.3. Usos alimenticios

Los frutos del Aguaribay son utilizados como condimentos sustituyendo a la pimienta tradicional debido a su leve sabor picante. Se los conoce como pimienta rosa y en muchos países recibe el nombre de “pimienta de los pobres” ya que se obtiene de los árboles sin costo alguno. En los últimos años se comenzó a usar en reemplazo de la pimienta tradicional en la cocina “gourmet” debido a su sabor algo picante menos pungente que el de la pimienta tradicional. Los frutos se dejan secar al sol hasta que se desprende su cáscara, luego son horneadas a 100 ºC durante 10 minutos con lo cual están listas para ser molidas (Carrere, 2009) (Imagen 7).

Imagen 7: Izquierda: Fruto del Aguaribay seco. Derecha: Fruto del Aguaribay molido.

http://www.guayubira.org.uy/monte/Anacahuita.

2.7 Aceite esencial y oleorresina de Aguaribay

Hace muchos años que se conoce que el aceite esencial extraído de hojas, tallos y bayas del Aguaribay presenta propiedades antimicrobianas (Forrest *et. al.*, 1975; Gundidza, 1993; Dishit *et al*., 1986). Además, los compuestos hallados en el mismo, son similares a los encontrados en los aceites de otras especias también usados en alimentos como antimicrobianos de origen natural, Maffei *et al.* (1990) encontraon que el aceite esencial de *Schinus molle* L analizada, extraido de bayas y hojas, contenía α-pineno y β-pineno como el aceite esencial de romero y salvia y ρ-cimeno al igual que el aceite esencial de orégano (Burt, 2004).Schulz *et al.,* (2005) analizó el aceite esencial de pimienta negra encotrando que posee α-pineno, β- pineno y limoneno compuestos encontrados por Kasimala *et al.,* (2012) en el aceite esencial de bayas de *Schinus molle* L. En cuanto a la oleorresina, Montes *et al.,* (1961)determina del extractode las bayas,

utilizando cono solvente de extracción éter de petróleo, características organolépticas como ser el aspecto, el olor y el color siendo estos aceite límpido, graso y verde amarillento respectivamente. No analiza su efectividad como antimicrobiano o antioxidante. Hosni *et al.,* (2011) estudiaron las propiedades antimicrobianas frente a bacteriasGram-positivas (*Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*) y Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella typhymurium*) del extracto obtenido con cloroformo y metanol siendo *Salmonella typhymurium* la más sensible. Estos solventes, si bien son eliminados casi en su totalidad, no son tan seguros como el etanol.

La determinación de los efectos antimicrobianos o antioxidantes de la oleorresina extraida con etanol, de los frutos de Aguaribay puede proporcionar un conservante de origen natural especialmente en productos cárnicos proporcionando, además, un agregado de sabor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

El objetivo de este trabajo de tesis es obtener, caracterizar y determinarla capacidad antimicrobiana de la oleorresina extraída de las bayas del Aguaribay sobre hongos, bacterias y levaduras encontradas comúnmente en alimentosy analizar su uso como potencial conservante de alimentos.

2.2 Objetivos particulares

Para alcanzar el objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos particulares

1.- Determinarel método de extracción para lograr el máximo rendimiento en oleorresina.

2.- Caracterizar la oleorresina a fin de estandarizarla y asegurar así propiedades reproducibles.

3.- Determinarla composición química de la oleorresina.

4.- Analizarla capacidad antimicrobiana sobre bacterias, hongos y levaduras contaminantes de alimentos.

5.- Estudiarla estabilidad de la oleorresina frente a temperatura y condiciones de almacenamiento.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

6.- Estudiar el uso de la oleorresina como conservante en un alimento modelo, medallones de carne picada vacuna, evaluando su efecto sobre las propiedades organolépticas del producto (sabor).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales, preparación y caracterización

3.1.1. Materiales

Los frutos, bayas, fueron recolectados en forma manual de árboles que se encuentran en parques y avenidas de Quilmes (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Otras muestras se recolectaron en Berazategui (Provincia de Buenos Aires, Argentina) y en San Rafael (Provincia de Mendoza, Argentina).

Estas muestras conformaron tres lotes, denominados 1, 2 y 3:

- Lote 1: Recolectado en la ciudad de Quilmes, provincia de Buenos Aires, Argentina
- Lote 2: Recolectado en la ciudad de Berazategui, provincia de Buenos Aires, Argentina.
- Lote 3: Recolectado en la provincia de Mendoza, Argentina.

La elección de los frutos se realizó bajo diferentes criterios de calidad en cuanto a color y estado fitosanitario.

El color de las bayas debe ser rosado (Imagen 1) y no presentar infecciones o ataque de insectos. Carrere (2009) describe a las bayas infectadas por un gorgojo (Imagen 2) por lo que se tuvo en cuenta que al momento de la recolección no presentaran ningún daño. Las recolecciones se realizaron en Diciembre apenas aparecen los frutos maduros.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Imagen 1: Frutos recolectados

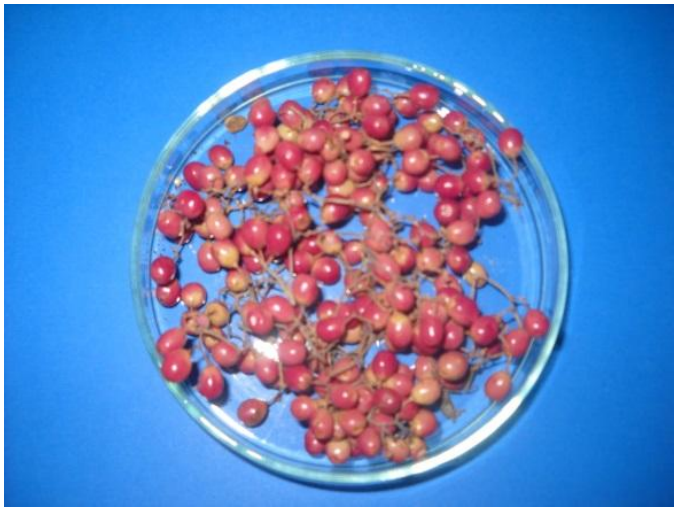


Imagen 2: Gorgojo y frutos infectados

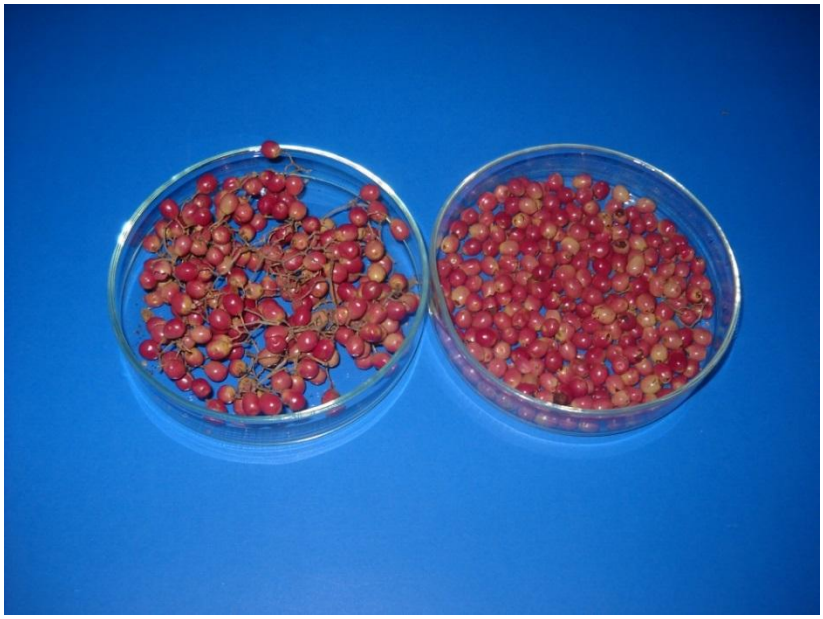
(Autor: Ricardo Carrere, 2009)

3.1.2 Preparación de la muestra

Una vez recolectadas las bayas fueron separadas de las ramas en forma manual (Imagen 3). Se separaron en lotes y se almacenaron a – 4 ºC hasta su utilización.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Imagen 3: Izquierda: bayas sucias. Derecha: bayas limpias.



3.1.3 Caracterización

La determinación de humedad y actividad de agua (a_w) se realizó a los lotes recolectados en los diferentes lugares a fin de establecer si había diferencias en sus características.

3.1.3.1 Determinación de la actividad de agua de las bayas

Las mediciones de a_w se realizaron con un higrómetro eléctrico marca AquaLab (modelo CX-2, Decagon Devices Inc). El equipo se calibró con soluciones salinas saturadas en el rango de actividad de agua 0.328 – 0.903 a 25 ºC. Se aplicó una regresión lineal entre los valores medidos y los de bibliografía (Tabla 1) obteniéndose un r^2 de 0.998 en todo el rango analizado. Las mediciones de a_w de las distintas muestras de semillas se realizaron por duplicado.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla 1: Valores de actividad de agua de soluciones salinas saturadas

Solución salina saturada	Actividad de agua	Referencia
$MgCl_2$	0.328	(1)
$Mg(NO_3)_2$	0.529	(1)
NaCl	0.753	(1)
KCl	0.843	(1)
KNO_3	0.903	(2)

(1) Greenspan, 1977.
(2) Pollio *et al.,* 1988.

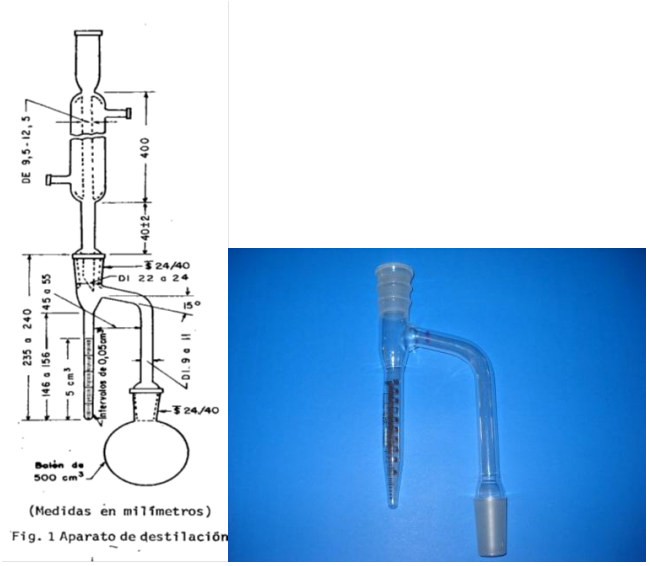
3.1.3.2 Determinación de humedad de las bayas

Para la determinación de humedad, las bayas se molieron en un molinillo de laboratorio marca Moulinex 505 CE. La molienda se realizó en intervalos cortos para evitar que la temperatura de la muestra aumente.

La humedad se realizó por destilación por arrastre con tolueno ya que debido a los componentes volátiles no se puede aplicar calentamiento. Se siguió el método 986.21 de la A.O.A.C. (1997).

El dispositivo para medir la humedad, según especifican las normas, consiste en un balón de 250 ml que es conectado a un tubo colector Bidwell-Sterling de 5ml de capacidad al cual se le adhiere en un extremo un tubo condensador o refrigerante.

Imagen 4: Destilador y tubo conector Bidwell-Sterling.



La determinación se realiza sobre 10 g de muestra molida a la que se le agregan en el balón 80 ml de Tolueno (para análisis (p.a.), ANEDRA). Se colocan unos trozos de plato poroso, para controlar la ebullición y se procede a conectar todo el dispositivo.

Una vez conectado se llena la cavidad graduada del tubo Bidwell-Sterling con el tolueno y se procede a calentar hasta ebullición calentando en manta calefactora.

Producida la ebullición, se toma este instante como tiempo cero y se miden los mililitros (ml) de agua recolectados, en el tubo colector, cada 1 minuto hasta llegar a volumen constante invariante durante, por lo menos, 4 determinaciones.

El porcentaje de humedad se calcula con la fórmula:

$$A = (V \times \rho / m) \times 100$$

Dónde: A = Cantidad de agua por cada 100 g de muestra

V = Volumen de agua en el colector ml

m = Masa de la muestra en g

ρ = densidad del agua a 25 ºC0,997 g/ml. La humedad se expresa en %

(g de agua/ 100 g de muestra).

3.2 Obtención y caracterización de la oleorresina

3.2.1 Obtención de la oleorresina

Para la extracción, las bayas se muelen siguiendo el mismo procedimiento que se utiliza para la determinación de humedad. El material molido se somete a una extracción por solvente. El solvente utilizado fue etanol (marca ANEDRA, calidad p.a.). Según la bibliografía se puede seguir el método descripto por Quiroga *et al.* (2001) (Tratamiento I) o por Borges *et al.,* (1997) (Tratamiento II).

Tratamiento I:

Para la técnica descripta por Quiroga et al. (2001), 10 gramos (g) (± 0.05) de bayas molidas en un molinillo de laboratorio (Moulinex 505 CE) se colocan en un erlenmeyer de 250 ml. Se le agregan 100 ml de etanol (p.a., ANEDRA). Se lleva a agitación, durante 48 horas (hs), a velocidad constante de 40 ciclos por minuto, a temperatura de 40 ºC en un agitador marca FOMRA Scientific. El material insoluble se filtra con papal de filtro

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Whatman Nº 4 y el solvente se evapora a presión reducida y a 40 ºC hasta sequedad en un rotavapor (HeidolhLaborata 4000).

Se pesa la cantidad de oleorresina obtenida y se calcula el rendimiento porcentual de la extracción según la siguiente formula:

Rendimiento% = (masa de oleorresina / masa de materia prima) x 100

Tratamiento II

La preparación de la muestra es igual a la del tratamiento I pero la extracción se realiza en dos etapas.La primera etapa es igual a la del tratamiento I pero se agita la mitad del tiempo (24 hs). El extracto se filtra y la solución se reserva almacenándola a 4 ºC. La micela resultante se somete a un segundo proceso de extracción. En este proceso se le agregan 100 ml de etanol y se lo deja en agitación otras 24 hs. Pasado ese tiempo se filtra y el líquido obtenido se mezcla con el anterior y se procede a la evaporación del solvente, en las mismas condiciones del tratamiento I. (Borges *et al.,* 1997). El cálculo del rendimiento se realiza utilizando la formula anterior.

Ambos procedimientos se repitieron 13 veces y se realizó un análisis de varianza de un factor o análisis dela varianza de Fisher (Miller *et al*., 1992) con los rendimientos, para analizar si había diferencias significativas entre los tratamientos.

Para el análisis de la varianza se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula (H_0): Los dos tratamientos son iguales, no hay diferencias entre ellos.

$$H_0: \mu_i = \mu \text{ para todo } i$$

Hipótesis alternativa (H_1): Los dos tratamientos no son iguales, hay diferencias significativas entre ellos.

$$H_1: \mu_i \neq \mu \text{ para todo } i$$

Una vez obtenida dicha oleorresina es almacenada en viales y en refrigeración a 4 ºC hasta el momento de ser utilizada.

3. 2.2 Caracterización

3.2.2.1 Determinación de la densidad

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La densidad se determinó por medio de un picnómetro. Para ello, se determinaron las siguientes masas:

Masa 1 (m_1): masa del picnómetro lleno de agua destilada más porción de oleorresina (en forma de bolita) separada.

Masa 2 (m_2): masa del picnómetro lleno da agua destilada.

Masa 3 (m_3): masa del picnómetro conteniendo la oleorresina (en forma de bolita) y el agua destilada.

Las masas se midieron con una balanza analítica marca Acculab L-Series, con 0,0001 g de precisión. Las mediciones se realizaron por duplicado y la diferencia entre los mismos fue de ± 0.005

Cálculo para determinar la densidad:

$$\rho = \frac{m_1 - m_2}{m_3 - m_1}$$

3.2.2.2 Determinación del pH y la absorción en UV-Visible

La determinación del pH se realizó por medio de varillas reactivas. Universal Indikator de Merk.

La longitud de onda máxima de absorción en el UV-Visible se determinó utilizando un espectrofotómetro Metrolab 1700. Para su determinación se diluyo la oleorresina a una concentración de 1 mg/ml en etanol.

3.2.2.3 Determinación de la composición química

La composición química de la oleorresina se determinó mediante la técnica GC Masa (cromatografía gaseosa y espectrometría de masa (GC-MS por sus siglas en inglés)).

La muestra se analizó con un cromatógrafo de gases – espectrómetro de masa de cuadrupolo QP 5000 – GC 17A equipado con un inyector “split-splitless” y una columna de sílica fundida Ultra 2 (5% fenil-metilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm d.i.; 0,25 µm de espesor de film). Las condiciones de la cromatografía de gases fueron: calentamiento programado de 60 °C a 290 °C a 3 °C/min, y luego 5 min a 290 °C; inyector a 250 °C; helio como gas de transporte a 0,95 ml/min; inyección de 1 µl de muestra en modo “split” (10:1); interfaz mantenida a 280 °C. Condiciones de espectrometría de masa: energía de ionización 70 eV; temperatura de la fuente de ionización 250 °C; velocidad de barrido 2 espectros por segundo; rango de masas: 40 – 700 u. La muestra se diluyó 1:100 en diclorometano (Caballero *et al.,* 2014).

3.3 Determinación de la capacidad antimicrobiana

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La capacidad antimicrobiana de la oleorresina se estudió en bacterias, hongos y levaduras más comúnmente contaminantes de los alimentos.

El estudio se realizó con las técnicas recomendadas en bibliografía para los distintos tipos de microorganismos.

Los medios de cultivo utilizados en los ensayos, o en su defecto, los componentes para la preparación de los mismos, fueron de la marca Britania. En el caso de los medios, las fichas técnicas donde se detallan fundamento, composición y preparación se encuentran en el Anexo I.

3.3.1 Bacterias

Las bacterias utilizadas en los diferentes ensayos fueron:

Bacterias Gram-positivas (*):

- *Bacillus cereus*
- *Bacillus subtilis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Listeria monocytogenes*

Bacterias Gram-negativas (*):

- *Salmonella enteriditis*
- *Escherichia coli sp.*
- *Escherichia coli O 157:H7*
- *Pseudomona aeruginosa*
- *Klepsiella pneumoniae*

Las bacterias fueron proporcionadas por el Instituto Malbrán (Buenos Aires, Argentina) y se mantuvieron en agar nutritivo y refrigeración (4ºC) hasta ser utilizadas.

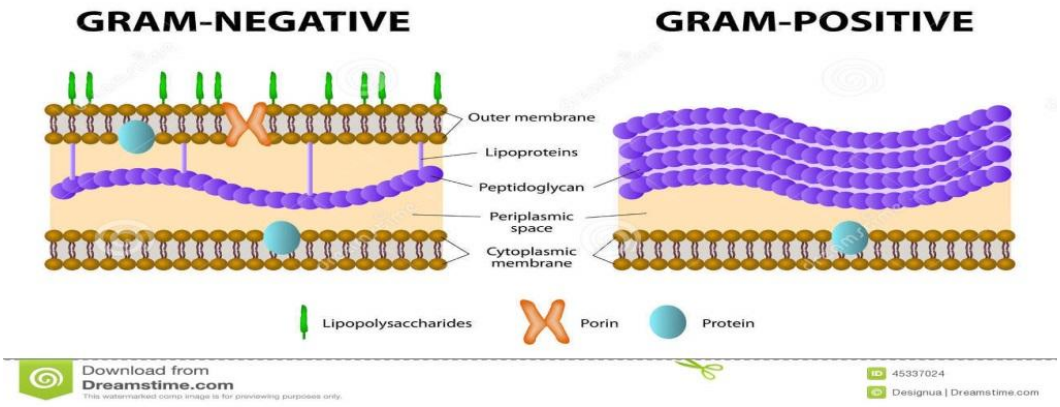
(*) Bacterias Gram-positivas: se tiñen de azul oscuro o violeta en la tinción de Gram. Esta característica está relacionada con la estructura de la envoltura celular. La envoltura celular está comprendida por la membrana plasmática y una pared celular compuesta por una capa gruesa de péptido glucano que la rodea, la cual está unida a la membrana por moléculas de ácido lipoteico. Esa capa le confiere gran resistencia y es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram.

Bacterias Gram-negativas: no se tiñen de azul oscuro o violeta pero se tiñen de un color rosa tenue. Esta característica se debe a la estructura de bicapa de membrana celular.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Entre las dos membranas lipídicas se localiza una fina capa de peptidoglucano. Al ser una pared fina no se retiene el colorante durante la tinción.

Tinción de Gram: Es una tinción diferencial que se utiliza para visualizar bacterias como también es una primer aproximación a la diferenciación bacteriana. La técnica fue desarrollada por Christian Gram en 1884.



3.3.1.1 "Screening" de la actividad antibacteriana

El método de difusión en agar propuesto por Kalemba *et al.,* (2003) es una técnica cualitativa que permite estimar rápidamente el grado de inhibición del crecimiento de microorganismos. Este método fue utilizado para determinar si la oleorresina poseía propiedades antibacterianas.

Placas de Petri con Agar Nutritivo se inoculan uniformemente con 1 ml de un cultivo "overnigth" (*) de las bacterias *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. enteriditis.* Los medios de cultivo fueron preparados con drogas marca Britania.

Sobre las placas inoculadas se colocan discos de papel de filtro, Whatman Nº4, estériles e impregnados con diferentes concentraciones de oleorresina. Las concentraciones estudiadas fueron 2 mg/ml, 3 mg/ml y 4 mg/ml. Los discos control fueron impregnados con etanol. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Las placas fueron incubadas a 35 ºC ± 2 ºC durante 48 hs en una incubadora CFC – 100 (marca Medición y Control) La zona neta de inhibición del crecimiento fue determinada en milímetros (mm) (Sivropoulou *et al.,* 1996).

(*) Cultivo "overnight": Es un cultivo fresco que ha crecido de la noche a la mañana en un medio líquido, consiste en pasar una asada de un cultivo previo (líquido o sólido) a un medio estéril y luego llevarlo a incubación (6 a 8 hs.).Habitualmentelo que se hace es prepararlo de un día para otro, por tal motivo es que se lo conoce con ese nombre "overnight".

3.3.1.2 Determinación de la mínima concentración letal (MCL)

Se define a la MCL como la mínima concentración de oleorresina que posee efecto bactericida y para su determinación se usó el método de dilución en medio líquido recomendado por Burt (2004). Las especies de bacterias utilizadas son *B. cereus*, *E. coli*, *E. coli*O157:H7, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. enteriditis* y *S. aureus*.

Para cada especie bacteriana se preparó una serie de tubos conteniendo Caldo nutritivo y diferentes concentraciones de oleorresina. El volumen final de cada tubo fue de 5 ml y las concentraciones ensayadas fueron de 1 mg/ml a 15 mg/ml (variación 1 en 1), 20 mg/ml y 25 mg/ml. El tubo control contenía 0,1 ml de etanol. El caldo y/o agar nutritivo es adecuado para el crecimiento de la mayoría de las bacterias utilizadas (Tortora *et al.,* 2007).

Los tubos se inocularon con 0,1 ml de cultivo "overnight" de las diferentes especies bacterianas. Las concentraciones de los inóculos eran en promedio de 1 10^8 UFC/ml (UFC, unidades formadoras de colonias). Se incubaron a 35 ºC por 48 hs. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Pasadas las 48 hs se tomó 0,1 ml de cada tubo y se lo inoculó, por el método de siembra por extensión (Imagen 5), en placas de Petri conteniendo Agar nutritivo para determinar la MCL.

Imagen 5: Siembra por extensión

En el caso de *L. monocytogenes* se utilizó Caldo (agar) para *Listeria*. Esto se debe a que es una bacteria muy susceptible a los cambios. La Listeria es considerada un microorganismo fastidioso, por tal motivo el medio de cultivo debe contenerlos nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo de esta (Schneebeli, 2013).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.3.2 Hogos

Los hongos utilizados fueron:

- *Alternaria alternata*
- *Aspergillus flavus*
- *Aspergillus ochraceus*
- *Aspergillus paraciticus*
- *Aspergillus niger*
- *Eurotium sp.*
- *Epicoccum sp.*
- *Fusarium graminearum*
- *Paecylomyces sp.*
- *Penicillium nalgiovence*
- *Penicillium citrinum*
- *Penicillium rugulosum*
- *Penicillium brevicompactum*
- *Penicillium griseofolvum*
- *Trichoderma sp.*

Para *Fusarium graminearum* y *Alternaria alternata* la reactivación de las cepas almacenadas se realizó en caldo Extracto de malta, esto se debe realizar ya que los cultivos puros de los hongos utilizados se encuentran depositados en un cepario, siendo su estado de conservación congelados a -20C. Las demás especies fueron reactivadas en Agar Extracto de malta(MEA).

Los medios de cultivo fueron preparados con drogas marca Britania. La incubación para *F. graminearum* y *A. alternata* se realizó con agitación durante 7 días a 25 ºC. Para los restantes la incubación fue durante 7 días a 25 ºC. Se utilizó una estufa de cultivo CFC – 100, con una precisión de ± 2ºC.

Los hongos fueron donados por el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.3.2.1 Ensayo de inhibición del crecimiento micelial

La técnica utilizada para este estudio es la que se conoce con el nombre de "poisined-food", técnica del alimento envenenado.Esta técnica consiste en incorporar al medio de cultivo distintas concentraciones de la sustancia a ensayar (CITA).

Para las especies de hongos *P. rugulosum, P. citrinum, P. brevicompactum, P. griseofolvum*y *P. nalgiovence* fueron inoculadas según lo descripto por Dikshit *et al.* (1980, 1982, 1983, 1986) inoculando una suspensión de esporas.

Primeramente, se prepararon soluciones con una concentración de 2.5 10^5esporas/ml (según recuento en cámara de Neubauer*) en agua destilada estéril y posteriormente se sembraron en el centro de cada placa de Petri descartable (diámetro 8,5 cm) 1 ml de la suspensión de esporas. Las placas contenían Agar extracto de malta. El extracto etanólico concentrado de la oleorresina, se suspendió con etanol hasta lograr una concentración de 500 mg de oleorresina por ml de etanol. Se tomaron de la dilución preparada los volúmenes necesarios para lograr las diferentes concentraciones. Las concentraciones usadas fueron 0.125 mg/ml, 0.187 mg/ml y 0.250 mg/ml siendo el volumen final de cada placa de 16 ml (medio de cultivo más oleorresina).

(*) Recuento en cámara de Neubauer

1. A partir de los micelios que desarrollaron los hongos reactivados en medio sólido, se prepara una solución de esporos en un tubo de ensayo conteniendo agua destilada estéril. Para obtener las esporas se raspa el borde de la colonia con un ansa esterilizada.
2. Se carga la cámara de Neubauer con la solución preparada y se realiza el recuento, en microscopio (40 X), de la cantidad de esporas presentes en los campos predeterminados (Figura 1).

Figura 1: Campos contados

X				**X**
		X		

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

X				**X**

X Sectores donde se debe contar las esporas

3. Cálculo de la concentración de esporas (esporas/ml)

$$\frac{\sum X}{5} \times 25 \times 10^4 = esporas/ml$$

En el caso de *F. graminearum* y *A. alternata* se utilizó la inoculación propuesta por Li *et al.,* (2005), la cual consiste en sembrar un disco de micelio de 3mm de diámetro en el centro de las placas. Las concentraciones utilizadas fueron las mismas del ensayo anterior (Adam *et al.,* 1998).

La cepas pertenecientes al género*Eurotium sp.*, *Epicoccum sp.*, *Trichodermasp.*y*Paecylomycessp.*fueron inoculadas por punción con ansa aguja (Pitt et al 1997) en placas conteniendo MEA y las cantidades suficientes de oleorresina para que las concentraciones finales en cada placa sean de 5 mg/ml, 10 mg/ml y 15 mg/ml con un volumen final de 20 ml cada placa (Sing *et al.,* 1980).

En todos los casos, las placas se incubaron a 25 ºC en una incubadora CFC - 100. Los resultados fueron medidos a los 7 días después de la siembra. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Transcurrido el tiempo de incubación se midió el crecimiento micelial y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento con la siguiente formula (Quiroga *et al,* 2001).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Crecimiento micelial control} - \text{Crecimiento micelial extracto}}{\text{Crecimiento micelial control}} \times 100$$

3.3.2.2 Efecto sobre la germinación de esporas de genero *Aspergillus* (CM fungistática y fungicida)

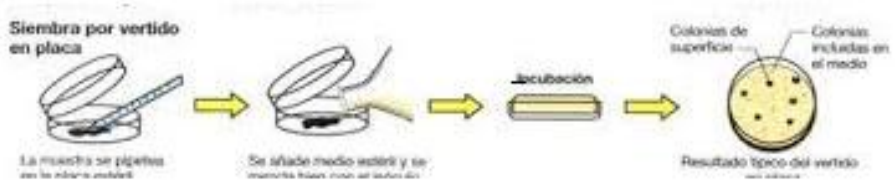
Este estudio se realizó sobre hongos del genero *Aspergillus* debido a que ellas son importantes productoras de micotoxinas, tales como aflatoxina (*A. flavus* y *A.paraciticus*) y ocratoxina (*A. ochraceus* y A. *niger*).

Se inocularon, por medio de siembra por suspensión o vertido en placa (Imagen 6), placas de Petri con 0.1 ml de una solución de esporas de concentración 1 10^5 esporas/ml (según recuento en cámara de Neubauer) preparada con agua destilada estéril. Las placas

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

contenían agar extracto de malta y diferentes cantidades de oleorresina para obtener concentraciones finales desde 1mg/ml hasta 25 mg/ml (variación de 1 en 1). Los medios de cultivo fueron preparados con drogas marca Britania. El volumen final de cada placa fue de 20 ml. Como control se utilizaron placas con etanol. Las placas se incubaron a 25 ºC durante 7 días. Todos los ensayos se realizaron por duplicado (Hitokoto *et al.,* 1980).

Imagen 6: Método de siembra por suspensión



Pasado el tiempo de incubación a las placas que mostraban ausencia de crecimiento se les practicó la técnica descripta por Garber y Houston (1959). Esta técnica se utiliza para determinar si la concentración de oleorresina tiene sobre los hongos efecto fungistático o efecto fungicida y poder así determinar la MCI (mínima concentración inhibitoria del crecimiento, efecto fungistático) y la MCL (mínima concentración letal, efecto fungicida).

Se tomaron 5 discos de 3 mm cada uno cortados, en forma aleatoria, de la placa que presentó ausencia de crecimiento. Los discos se colocan sobre una placa que contiene solamente agar extracto de malta y se incuban a 25 ºC durante14 días. Pasado este tiempo se verifica si hay o no crecimiento. Este procedimiento se aplicó a todas las placas que mostraron ausencia de crecimiento.

3.3.3 Levaduras

Las levaduras utilizadas fueron:

- *Rhodotorula sp.*
- *Saccharomyces cerevisiae.*
- *Saccharomyces piss.*
- *Zygosaccharomyces rouxii*

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

- *Zygosaccharomyces sp.*

Las levaduras fueron donadas por el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes.

Fueron reactivadas en medio MEBG líquido, el cual contiene extracto de malta (20 g), peptona (1 g) y glucosa (20 g) en 1 l de agua destilada (Betts *et al.,* 2000). Se incubaron con agitación durante 24 hs a 35 ºC antes de su utilización en los distintos ensayos.

Debido a que las levaduras son susceptibles de inhibición por etanol se realizaron ensayos de tolerancia (Medawar *et al.,* 2003).

3.3.3.1 Efecto del etanol en levaduras

La tolerancia al etanol por las levaduras se realizó mediante la técnica de dilución en medio líquido (Quintas *et al.,* 2000).

Aun Erlenmeyer conteniendo 20 ml de medio de cultivo MEBG y 1 ml del medio con las levaduras activadas, se le añadió la cantidad de etanol suficiente para obtener las siguientes concentraciones1, 1.15, 1.25, 1.35 y 1.5 %v/v (porcentaje volumen en volumen). Como control se utilizó por cada levadura un erlenmeyer que solo contenía medio de cultivo. Esto se repitió con todas las levaduras estudiadas.

Los erlenmeyers se incubaron a 35 ºC durante 48 hs. Pasado ese tiempo se tomó 0.1 ml de cada erlenmeyer y se los plaqueó, en placas separadas, conteniendo medio MEBG para ver supervivencia.

3.3.3.2 Ensayo del poder inhibitorio en levaduras

Para este ensayo se utilizó la técnica de dilución en medio líquido propuesto por Kalemba *et al.,* (2003). Se tomaron tubos conteniendo MEBG como medio de cultivo y a cada tubo se le agregó la cantidad suficiente de oleorresina para obtener un rango de concentraciones de 1 a 25 mg/ml (con variación de 1 en 1). El volumen final de cadatubo fue de 5 ml. Como control se utilizó medio de cultivo y etanol con una concentración final en el tubo de25 mg/ml. Los tubos se incubaron a 35 ºC durante 48 horas. Los ensayos se realizaron por duplicado. Para la determinación de la MCL, seguido a la incubación, se tomaron 0.1 ml de los tubos y se sembraron en placas con medio MEA. Las placas se incubaron a 35 ºC durante 48 hs. El valor que se toma como MCL es el de la placa que no presenta crecimiento.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.4. Análisis de la estabilidad de la oleorresina en el efecto antibacteriano

Para analizar el efecto de la temperatura, la oleorresina se calentó a 40 ºC, 60 ºC y 80 ºC durante 15 minutos y para estudiar el efecto del envejecimiento, se almacenó bajo refrigeración (4 ºC) y a temperatura ambiente (25 ºC) (Mau *et al.* 2001).

Posteriormente se analizó el efecto bactericida de las muestras calentadas y almacenadas. En este último caso el estudio se realizó después de 30 días de almacenamiento.

Dos especies estudiadas anteriormente, *S. enteritidis* y *S. aureus*, fueron seleccionadas para estos ensayos. La concentración de oleorresina que se utilizó fue la que produce el 100% de inhibición (15 mg/ml). El método utilizado fue el de dilución en medio líquido en las mismas condiciones que se utilizó para la determinación de la MCI. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.En el Anexo I se describen los fundamentos de la elección de los medios de cultivos utilizados

Así mismo, se analizó la influencia de la cantidad de bacterias inoculadas. Para ello, a los tubos conteniendo 5 ml de caldo nutritivo y la cantidad necesaria de oleorresina, para obtener un concentración final de 15 mg/ml, se inocularon con 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml y 0,4 ml de cultivo “overnight” (concentración 1 10^8 UCF/ml), de las especies a ser testeadas (Dabbah *et al.,,* 1970).

3.5 Aplicaciones

Para estudiar el potencial uso de la oleorresina de las bayas de Aguaribay como antimicrobiano se utilizaron medallones de carne vacuna picada denominados comúnmente hamburguesas. El objetivo era determinar si producía inhibición del crecimiento de la flora nativa de la carne y la formación de metamioglobina responsable del color marrón que adquiere la carne almacenada.

3.5.1 Formulación de los medallones

Los medallones se prepararon con carne picada común proveniente de la góndola del Supermercado Jumbo, Av. Calchaquí 3959, Quilmes, Provincia de Buenos Aires, Argentina. La carne fue envasada para la venta el mismo día que se utilizó en la preparación de las hamburguesas.

Para la preparación de la mezcla o pasta madre, se utilizaron los ingredientes en las proporciones recomendadas por Piñero *et al.,* (2005) (Tabla 2).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

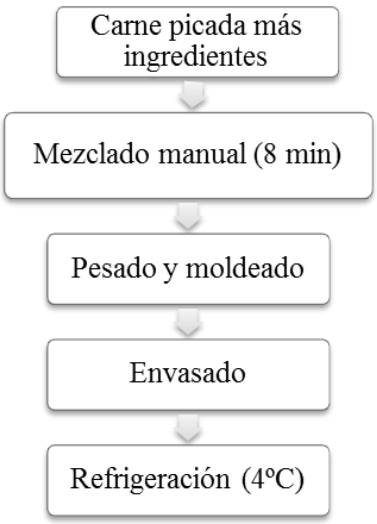
Tabla 2: Ingredientes utilizados en la formulación de hamburguesas

Ingredientes	Gramos por cada 100 g de mezcla
Carne picada	76,88
Sal	1,30
Almidón de maíz	13,13
Agua	8,69

3.5.2 Elaboración de los medallones

Se utilizaron 1,2 kg de carne que se dividió en 4 Lotes de 300 g cada uno. A cada Lote se le agregaron los ingredientes (sal, almidón y agua) en forma de sal muera, es decir se mezcló la sal, el almidón y el agua antes de ser incorporados a la carne. Junto con los ingredientes a 2 de los 4 Lotes se le agregó además, 0,5 % y 1 % de oleorresina. Al 4º Lote se le agregó etanol (3,5 %) a fin de ser utilizado como control, se eligió este valor de concentración de etanol dado que era la cantidad máxima que se podía agregar por cada 100 g de mezcla y esta no se viera afectada en el olor y el color. Al no contar con bibliografía respaldatoria se la determinó empíricamente. Luego se procedió al mezclado a fin de obtener la pasta madre para la elaboración de hamburguesas. Este procedimiento fue propuesto por García *et al.,* (2009) (Figura 2).

Figura 2: Proceso de elaboración de las hamburguesas



Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los Lotes quedaron conformados de la siguiente manera:

Lote 1: carne, sal, almidón y agua.

Lote 2: carne, sal, almidón, agua y etanol (3,5 g/100g de mezcla).

Lote 3: carne, sal, almidón, agua y oleorresina 0,5 % (0,5g/ 100g de mezcla).

Lote 4: carne, sal, almidón, agua y oleorresina 1 % (1 g/ 100g de mezcla).

Cada Lote se dividió en medallones de 5 cm de diámetro y 1 cm de espesor de 30 g de peso (Lai *et al*., 1995). Se colocaron en cajas de Petri estériles y se almacenaron refrigerados a 4 ºC. Estos medallones se utilizaron para el estudio de la capacidad antimicrobiana y la aparición de color marrón debida a la metamioglobina.

3.5.3 Determinación del efecto de la oleorresina sobre la flora nativa de medallones de carne vacuna picada

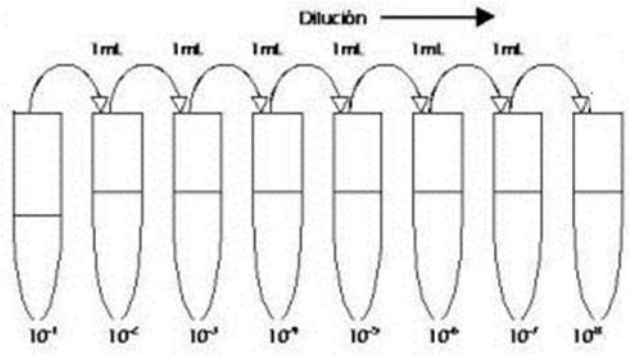
A cada uno de los lotes se le determinó el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales. El recuento se realizó a tiempo 0, es decir después de la elaboración y a las 24 horas de almacenamiento. Se utilizó la técnica recuento en placa por siembra en todo el medio, propuesta por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) en Análisis microbiológico de los alimentos, Metodología oficial, volumen 1 (2014). Esta técnica permite determinar el número de microorganismos por gramo de muestra. Se utilizan diluciones seriadas que se preparan de la siguiente manera:

- Se pesan 25 g de muestra en forma aséptica.
- La muestra se mezcla con 225 ml de diluyente (Agua peptonada), dilución 1/10 o 10^{-1}).
- La muestra se tritura y homogeniza. Este procedimiento se realizó con una licuadora, Philips *Cucina,* previamente esterilizada con etanol en una proporción 70/30. Esta primera dilución es la denominada dilución madre.
- A partir de la dilución madre se realizan las diluciones seriadas decimales hasta obtener una dilución de 10^{-8}.

El primer tubo corresponde a la suspensión madre, dilución 10^{-1}. Los siguientes tubos contienen 9 ml de agua peptonada a los que se le transfiere 1 ml de suspensión madre. Se homogeniza y se pasa al tubo siguiente con el mismo procedimiento (Figura 3).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Figura 3: Diluciones seriadas



A cada tubo se realiza el recuento en placa, por duplicado siguiendo los siguientes pasos:

- Siembra de 1 ml de suspensión de cada tubo en placas de Petri.
- Agregado de 15ml de medio agar para recuento (20 g) en 1 l de agua destilada, estéril y atemperado sobre la placa conteniendo 1ml de suspensión.
- Mezcla con movimientos circularespara homogeneizar y se dejan solidificar.
- Incubación de las placas invertidas a 30 ºC durante 48 hs.

Se cuentan las placas que presentan entre 30 y 300 colonias. La cantidad de colonias contadas se multiplica por el inverso del factor de dilución y el resultado se expresa como Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra (UFC/g).

3.5.4 Porcentaje de acumulación de metamioglobina

Para medir el porcentaje de acumulación de metamioglobina (%MetMb), se tomaron fracciones de 5 g de las hamburguesas de cada uno de los lotes anteriores. Se utilizaron concentraciones de 0.5% y 1% de oleorresina. Las muestras fueron analizadas a los 0, 1 y 3 días de almacenamiento en refrigeración a 4 ºC. Se eligió el tiempo máximo de 3 días como el tiempo promedio de almacenamiento en el refrigerador de un hogar tipo.

Para el cálculo de %MetMb a cada muestra se la homogenizó con 25 ml de buffer fosfato con una concentración 40 mM (milimolar) y pH 6,5. El homogenizado se llevó a

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

refrigeración a 4 ºC durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 4500 rpm durante 30 min a 4 ºC. Luego se filtró el sobrenadante utilizando papel de filtro Whatman Nº1. A cada filtrado se le mide la absorbancia a 572, 565, 545 y 525 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (Metrolab 330). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

El cálculo del % MetMb se realizó utilizando la fórmula propuesta por Ulu (2004).

$$\%MetMb = \left(-2{,}51 \times \frac{A_{572}}{A_{525}} + 0{,}777 \times \frac{A_{565}}{A_{525}} + 0{,}8\,\frac{A_{545}}{A_{525}} + 1{,}098\right)$$

Siendo A_{572}, A_{565} y A_{525} las absorbancias a cada una de las longitudes de onda consideradas.

3.5.5 Análisis sensorial

A fin de determinar si el agregado de oleorresina a las hamburguesas producía cambios desagradables en el sabor, se realizó un análisis sensorial mediante la prueba de medición del grado de satisfacción. Se utilizó una escala hedónica de 5 puntos (Tabla 3) y un panel de 100 jueces no entrenados (Anzaldua-Moral, 1994).

Tabla 3: Escala hedónica de 5 puntos

Descripción	Valor
Me gusta mucho	5
Me gusta poco	4
Ni me gusta ni me disgusta	3
Me disgusta poco	2
Me disgusta mucho	1

Domínguez M. (2007) plantea una serie de reglas para tener en cuenta a la hora de realizar el análisis sensorial:

1. Ambiente de prueba limpio, libre de malos olores, ruidos y bien iluminado.
2. Ausencia de potenciales distracciones para los panelistas.
3. Brindar agua o galletitas sin sal, para limpiar el paladar.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

4. La paciencia es importante, dar tiempo para evaluar cada muestra.

5. Motivar a los panelistas.

6. Los panelistas deben entender el procedimiento y los cuestionarios para la degustación. No asumir nada.

7. Establecer condiciones estándares para tamaño de la muestra, volumen, temperatura y otros que puedan afectar las respuestas.

Para este análisis se prepararon los medallones tal como se describe el punto 3.5.2 pero utilizando 0,5 g de oleorresina cada 100g de carne. Las hamburguesas se cocinaron sobre una plancha de teflón en una cocina convencional durante el tiempo necesario para asegurar 71 ºC en el centro. Según Piñero *et al.,* (2005) este punto de cocción corresponde al término “Bien cocido”. La temperatura se midió con un termómetro común de laboratorio.

En la Imagen 5 se muestra como se armó el panel de degustación y en la Figura 3 se describe el cuestionario para la prueba del grado de satisfacción.

Imagen 5: Panel de degustación

La degustación se realizó en una sala alejada dela zona de cocción, con luz clara y temperatura entre 20 y 22 ºC. La degustación se realizó en las horas de la tarde, 14 a 17 hs., con el fin de no alterar las apreciaciones por efecto del hambre o la saciedad (Zapata *et al.,* 2013).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los medallones fueron colocados en el centro de cada plato. La evaluación se realizó en tandas de dos jueces por ronda de degustación. Se le pidió a cada juez que tomaran agua antes de probar las hamburguesas y marcaran una de las opciones, si creían necesario podían realizar algún comentario (Dupetruis *et al.,* 2004).

Figura 3: Cuestionario para la evaluación del grado de satisfacción.

Fecha: Número de la prueba:

Nombre del producto: Medallones de carne vacuna

Por favor tome un poco de agua antes de comenzar

Pruebe el producto que se presenta a continuación y marque la opción elegida

Comentarios:

MUCHAS GRACIAS

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de las bayas

4.1.1 Actividad de agua

Los valores de a_w (promedio de las dos determinaciones realizadas) de los tres lotes estudiados se muestran en la Tabla 1.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla 1: Actividad de agua.

Muestra	**a_w**	**a_w**	**a_w promedio**
Lote 1	0,499	0,496	0,498
Lote 2	0,412	0,415	0,414
Lote 3	0,509	0,508	0,508

Alcalá *et al.,* (1995) sostiene que para las especias hay un rango de a_w que determina su estabilidad, que va de 0,2 a 0,6. Dentro de este rango, según el autor, no hay posibilidades de crecimiento microbiano como así también las reacciones químicas y enzimáticas ocurren a muy baja velocidad. Como podemos observar en nuestros resultados estamos dentro el rango de estabilidad. El lote 3, que corresponde a la muestra recolectada en la Provincia de Mendoza, muestra una a_w ligeramente superior. Esta muestra correspondía al inicio de aparición de los frutos.

4.1.2 Humedad

Para la puesta a punto del método, se hicieron cuatro determinaciones de humedad en muestras de bayas del Lote 1. El volumen de agua recolectado va variando hasta que llega a un valor constante. En los siguientes gráficos (1 a 4) podemos ver como aumenta el volumen a medida que transcurre el tiempo. Entre los 8 y 9 minutos (min), contados a partir del inicio de la ebullición, el volumen recolectado permanece constante. Según le método 986.21 de la A.O.A.C. (1997), a partir de este tiempo se deben tomar 4 determinaciones. Una vez determinado el tiempo, en las sucesivas determinaciones de humedad el volumen que se considera es el de dicho tiempo. En nuestro caso el tiempo fue de 12 minutos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Grafico 1: Volúmenes recolectados (Muestra 1)

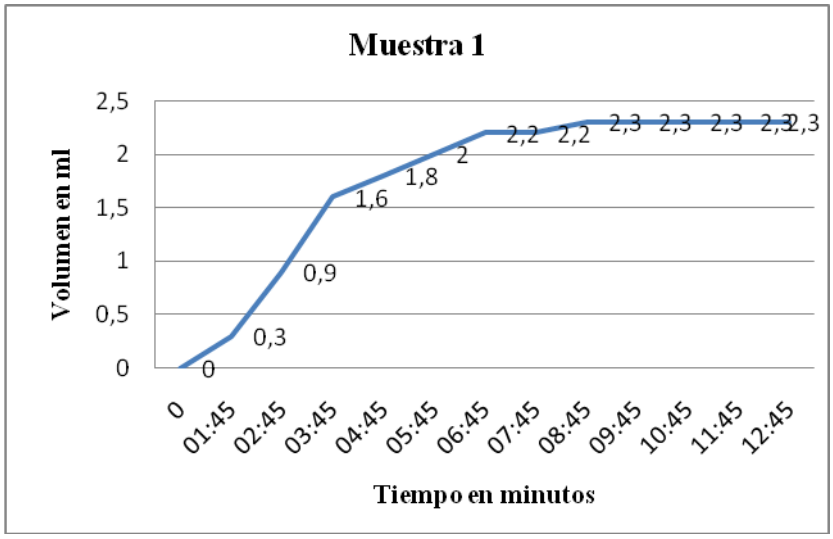


Grafico 2: Volúmenes recolectados (Muestra 2)

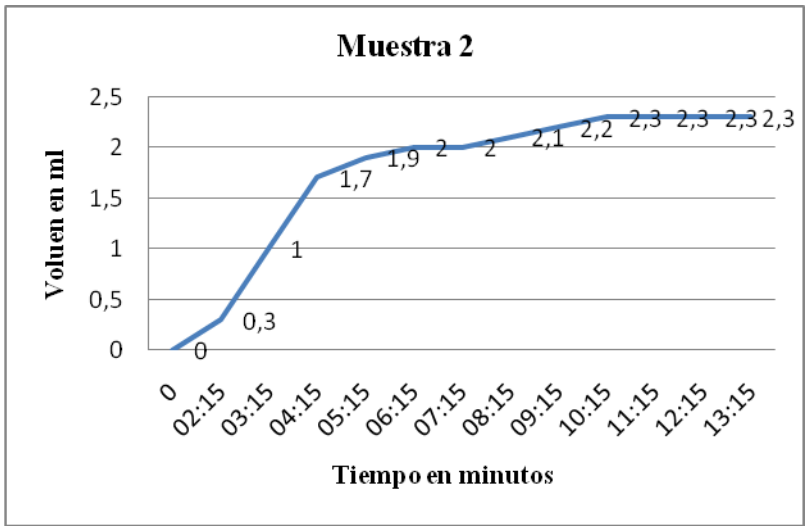


Grafico 3: Volúmenes recolectados (Muestra 3)

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

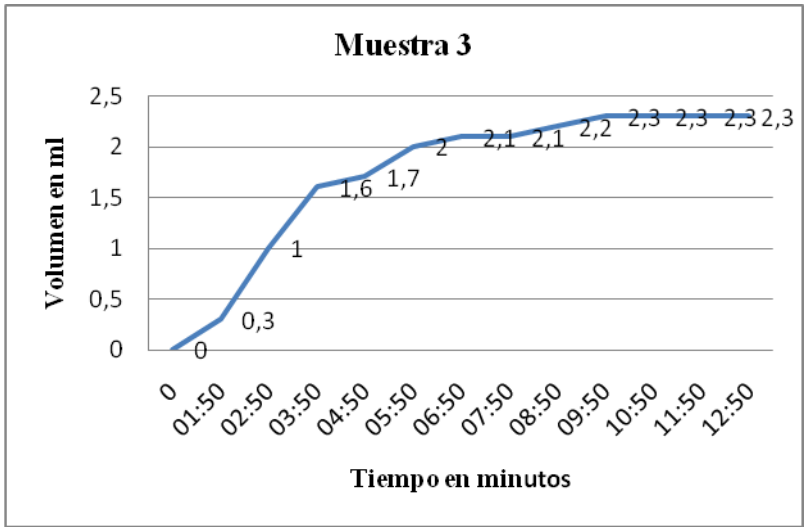
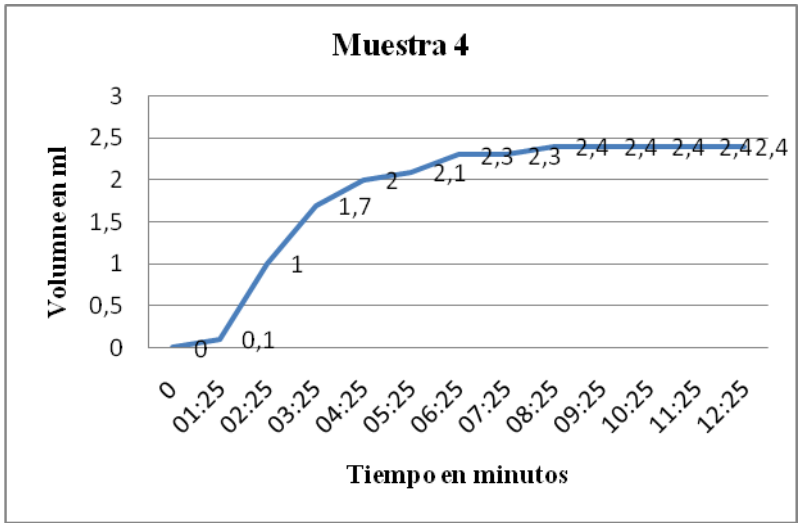


Grafico 4: Volúmenes recolectado (Muestra 4)



En la Tabla 2 se muestran los 4 valores de % de humedad obtenidos.

Tabla 2: Porcentaje de humedad (Lote 1).

Muestra	% Humedad
1	22.54
2	22.85
3	22.45
4	23.13

Desvío promedio de 0,40 % y valor promedio de 22.74%

Tabla 3: Porcentaje de humedad (Lote 2 y Lote 3).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Lote	Muestra	Masa (g)	Volumen de agua recolectado (ml)	% Humedad
2	1	10,3063	2,3	22,31
2	2	10,0109	2,3	22,97
3	1	9,8729	2,4	24,30
3	2	10,0714	2,2	22,83

Para las bayas pertenecientes a los otros dos Lotes (2 y 3) la humedad fue de:

- Lote 2: 22.64%
- Lote 3: 24.30%.

Tal como sucedía con la a_w, la muestra del lote 3 presenta valores más altos ya que corresponde a frutos recogidos al inicio de la maduración. Como ya se mencionó, la fructificación va de Octubre a Enero. Las muestras correspondientes a los Lotes 1 y 2 se recolectaron en Diciembre mientras que las del Lote 3 en Noviembre.

En base a los resultados anteriores, se descartó el Lote 3. De los otros dos Lotes, se seleccionó el Lote 1 para todos los ensayos posteriores ya que la cantidad de muestra recolectada fue mayor.

Los valores de a_w y humedad obtenidos se podrán utilizar como parámetros de caracterización para los futuros frutos recolectados y de esa manera poder tener una población homogénea de muestra para ser utilizada.

Si se quisiera utilizar las bayas como especia los valores de a_w, como se ha mencionado anteriormente, se encuentran dentro del rango de estabilidad pero los valores de humedad resultan elevados en comparación con los que presenta la pimienta negra comercial el cual debe rondar el 13 %, valor indicado en la norma ISO 959-1: 1998 (E).

4.2 Obtención y caracterización de la oleorresina

4.2.1 Obtención

Se realizó la extracción de la oleorresina siguiendo los dos tratamientos descriptos en el inciso 3.2.1 de Materiales y Métodos. En la Tablas 4 y 5 se muestran los rendimientos encontrados paran los dos Tratamientos.

Tabla 4: Extracción y rendimiento de la oleorresina según Tratamiento I

Muestra	Masa de oleorresina (g)	Rendimiento (%)
1	2,67	25,97
2	2,73	26,79

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3	2,06	20,00
4	2,13	19,72
5	2,13	21,02
6	2,00	19,92
7	2,25	22,16
8	2,06	20,52
9	2,08	20,63
10	2,24	22,38
11	1,83	18,13
12	1,97	19,43
13	1,87	18,38

Tabla 5: Extracción y rendimiento de la oleorresina según Tratamiento II

Muestra	Masa de oleorresina (g)	Rendimiento (%)
1	2,39	23,90
2	2,63	26,30
3	2,26	21,96
4	3,09	30,62
5	2,83	27,71
6	2,43	23,84
7	2,41	23,91
8	2,82	27,92
9	2,65	26,11
10	2,70	25,47
11	2,15	21,48
12	2,42	21,89
13	2,01	20,02

Para definir cuál de los Tratamientos utilizar se realizó un análisis de la varianza de un factor utilizando como datos los valores de masa (en gramos) de oleorresina obtenida (Tabla 6) para determinar si había o no diferencias significativas entre ellos.

Tabla 6: Tabla de ANOVA de un factor

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Calculada	F De tablas
Entre tratamientos	1	-1,077	- 1,077		

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Dentro de tratamientos	24	12,92	0,54	-1,99	4,26
Total	25	11,84			

El valor obtenido para el cociente de Fisher (F) fue de 1,99. Este valor es menor que el valor de Tablas que es de 4,26 para un nivel de significación de 0,05.

Como el valor de F calculado es menor que el valor de F de tablas se acepta la hipótesis nula (H_0) y por lo tanto se concluye que no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos.

Debido a que en el Tratamiento I se utilizan 100ml de solvente contra 200 ml en el Tratamiento II, el tratamiento I es el elegido para la extracción de oleorresina.

Los procesos de extracción de aceite esencial de Aguaribay, por el método de hidrodestilación tienen un rendimiento del 2 % al 4 % al procesar 1Kg de muestra, según lo reportado por Ljalem *et al.,* (2014) y Baser *et al.,* 1997, respectivamente. La extracción con etanol supera este rendimiento siendo este en promedio del 21,16 % utilizando una cantidad de muestra mucho menor, solo 10 g,este valor de rendimiento supera al encontrado por Montes *et al.,*(1961) que fue del 12 % en peso para la oleorresina extraída con éter de petróleo.

Para otras especias, los rendimientos de extracción por medio de solventes, reportados por otros autores se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Rendimientos de oleorresina de especias

Autor	Especie	Rendimiento (%)
Borges *et al.,* 1997	Cúrcuma	21
	Nuez moscada	38,8
	Pimentón dulce	33
	Pimentón picante	24,9
	Pimienta negra	14,1
Mila *et al.,* 2002	Pimentón (trompa de elefante)	20,02
Fernández Trujillo 2007	Pimentón	17,4

Las oleorresinas están constituidas por una mezcla de resinas, principios aromatizantes no volátiles, aceites grasos además de los aceites esenciales que son los que contienen los principios odoríferos volátiles (Salamanca et al., 2009). Por otra parte, las oleorresinas poseen ventajas muy convenientes para su uso en alimentos tales como las que especifican Daghero *et al.,* (2000):

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

- Económicamente rentables dado que se sustituye el vegetal en cuanto a las características de olor y sabor.
- Aromas con más cuerpo que los aceites esenciales.
- Bajo costo de obtención.
- Alta pureza y larga vida útil.
- Uniformidad en sus características.
- Inocuidad confiable.

4.2.2 Caracterización

La oleorresina obtenida es de color ámbar verdoso, de aroma picante y de estructura gomosa, al igual que la obtenida por Montes *et al.,*(1961).Este tipo de extractos se caracterizan por la densidad, el pH, longitud de onda (λ) máxima de absorción en el UV-Visible y su composición química.

4.2.2.1 Densidad

La densidad de la oleorresina obtenida fue de 1,7264 g/ml.

En bibliografía no existen valores de densidad de oleorresinas. La densidad, en este trabajo, se propone como parámetro de comparación entre sucesivas extracciones.

4.2.2.2 pH y absorción en UV-Visible

El pH de la oleorresina obtenida fue 4.Montes *et al.,* (1961) obtuvo el mismo valor de pH para la oleorresina, extraída con éter de petróleo, de las bayas de Aguaribay mientras que Dikshit *et al.,* (1986) obtuvo una valor de pH de 4 para el aceite esencial de las hojas.

Para determinar la máxima longitud de onda de absorción en el UV – Visible, se realizó un barrido entre 200 y 780 nanómetros (nm). La máxima absorción se encuentra a 292.5 nm. Si bien tampoco existen valores en bibliografía, este es otro de los parámetros que pueden ser utilizados en sucesivas extracciones.

4.2.2.3 Composición química

Una de las herramientas más utilizadas en la separación, identificación y cuantificación de componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas es la cromatografía gaseosa acoplada con la espectrometría de masa. Este acoplamiento es lo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

que se conoce como GC-MS, GC de “Gas Chromatogrphy” y MS de “Mass Spectromery” (Gutiérrez *et al.*, 2002).

La composición de la oleorresina determinada por GC-Masa, se muestra en la Tabla 6. Se informan los porcentajes de área como una función de los índices de retención (IR). Las identificaciones se hicieron haciendo coincidir espectro e índices de retención de masa de cada compuesto con los reportados en la literatura (Gundidza 1993 y Vekiari *et al.,* 2002). Las bases de datos utilizadas para la identificación fueron:

- NIST Chemistry Webbook: webbook.nist.gov/chemistry
- www.pherobase.com/database

Tabla 6: Composición química de la oleorresina

IR	Compuestos	%
994	β-Mirceno	0.96
1005	α-Felandreno	1.12
1035	Limoneno + β-Felandreno	5.19
1376	α-Copaeno	0.66
1398	3-Cedrene	0.73
1404	γ-Cariofileno	7.12
1438	α-Humuleno	1.12
1439	Aromadendrene	1.42
1444	γ-Muuroleno	0.42
1452	β-Selineno	0.85
1457	9-epi-(E)-Cariofileno	1.17
1463	α-Muuroleno	1.99
1471	*E*-β-Farneseno	0.61
1476	γ-Cadineno	4.16
1517	α-Selineno	0.60
1522	δ-Cadineno	8.64
1532	1,4-Cadinadiene	0.53
1534	α-Cadineno	0.63
1536	cis-α-Bisaboleno	0.37
1547	Elemol	0.54
1556	Germacreno B	1.12
1569	Palustrol	0.44
1573	Cariofilene oxide	0.81
1580	Globulol	4.96
1588	Epiglobulol	0.51

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

1627	α-Cadinol	2.79
1633	epi-α-Muurolol (*T*-Muurolol)	1.17
1636	δ-Cadinol	1.70
1640	epi-α-Cadinol (*T*-Cadinol)	1.50
1724	Acetato de guaiol	11.96
1917	Hexadecanoico acido	0.60
1968	Ethylhexadecanoato	1.33
2010	Octadecanal	8.28
2010	(Z)-9-Octadecenal	3.50
2039	1-Octadecanol	2.86
2188	Ethyloctadecanoato	0.51

La oleorresina se compone de casi un 40 % de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, 34 % de alcoholes sesquiterpénicos y compuestos relacionados (óxido de cariofileno y acetato de guaiol) y 17 % de otros compuestos tales como ácidos palmítico y oleico libres o como ésteres etílicos (artefactos del procedimiento de extracción), 1-octadecanol, octadecanal y (Z)-9 -octadecenal**.**

Los compuestos individuales principales son el acetato de guaiol (11,96 %), δ-cadineno (8,64 %) y γ-cariofileno (7,12 %). Algunos compuestos presentes en la oleorresina no pudieron ser completamente identificados, pero muestran espectros de masas e índices de retención similares a los de alcoholes sesquiterpénicos. Este grupo de " alcoholes sesquiterpénicos desconocidos" de fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$ suma un 7.83 % de la composición total de oleorresina. También hay presentes otros compuestos menores no identificados (% de área < 0.35), cuyo espectro de masas no fueron registrados y como grupo suman hasta el 9,3% del total.

Los resultados hallados en bibliografía muestran diferencias en la composición de los extractos obtenidos con otros métodos. El aceite de bayas recolectadas de plantas cultivadas en las costas de Liguria, obtenido por destilación con vapor de una mezcla de éter dietílico y hexano (5:1), estaba compuesto principalmente de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos (93,59 %), siendo el α - felandreno (55,42 %) y elβ-felandreno (15,39 %) los compuestos principales (Maffei *et al.,* 1990). El extracto obtenido en este trabajo, contiene estos compuestos pero en otras proporciones. Por ejemplo los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos se encuentran en un 40%.

Otros compuestos, reportados porDeveci *et al.,* (2010) y Ibrahim *et al.,* (2014) para el aceite esencial de bayas de Aguaribay, tales como α y β Pineno, Canfeno, Sabineno, α-Terpineno, ρ-Cymeneo, Terpinoleno, Metiloctanoato, α-Cubeneno, Terpinen-4-ol,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Germacreno-D, β-Guaineno y γ-Eudesmol, no se han encontrado en la oleorresina obtenida por extracción con etanol. El aceite obtenido por hidrodestilación de bayas de *Schinus molle* L. recolectado en las costas del mar Egeo (Izmir, Turquía), contiene hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos (75,38% en total). La fracción conteníaα-Felandreno (22,11 %), β-Felandreno (10,37 %), Limoneno (9,59 %) y α-Cadinol (5,57 %) entre los principales componentes individuales (Baser *et al.* 1997). En cambio, en la oleorresina la fracción de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos es mucho menor (40 %).

Jenninig *et al.*, (1975) estudiaron el aceite esencial de bayas de *Schinus molle* L. extraído mediante destilación por vapor encontrando compuestos tales como β-Pineno, Sabineno, Terpineno, γ-Terpineno, Bourboneno, α-trans-Bergamoteno y el α- Terpineol. Algunos de estos compuestos coinciden con lo hallado por Maffei *et al*., (1990). Como se puede apreciar, los extractos coinciden en algunos componentes y difieren en otros. La diferente composición conlleva a diferentes propiedades lo que hace que sea necesario caracterizarlos y analizarlos en forma individual.

4.3 Capacidad antimicrobiana

En bibliografía, existen trabajos donde se analiza el poder antimicrobiano de las especias y de sus aceites esenciales y oleorresinas, como ya se mencionó. Se ha encontrado que inhiben el crecimiento de bacterias indeseadas en alimentos así como el de levaduras deteriorantes y hongos toxicogénicos (Padin *et al.,* 2007; 2009). En este trabajo, se estudió, mediante diferentes procedimientos, la capacidad antimicrobiana de la oleorresina de las bayas de Aguaribay sobre diferentes microorganismos contaminantes y deteriorantes de alimentos.

4.3.1 Bacterias

4.3.1.1 “Screening” de la capacidad antibacteriana

Por medio de este métododе carácter cualitativo, se pretendió determinar cuál o cuáles de las bacterias testadas resultaban susceptibles a la acción de la oleorresina. La eficacia de la oleorresina se demuestra por el tamaño del halo de inhibición de los microorganismos alrededor de disco de papel filtro, resultado que se expresa como el diámetro de esa zona. En la Imagen 1 se pueden observar los halos de inhibición del crecimiento de *B. cereus* (Gram-positiva) y de *S. enteriditis* (Gram-negativa).

Imagen 1: Capacidad antibacteriana. Halos de inhibición.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Izq. *B. cereus*. Der. *S. enteriditis*

La Tabla 8 nuestra los halos de inhibición del crecimiento (en mm) producido por las concentraciones de oleorresina testeadas para las diferentes bacterias seleccionadas. Se informa el valor medio de los duplicados (error de ± 0.05mm).

Tabla 8: Halos de inhibición del crecimiento (en mm)

	Concentraciones de oleorresina (mg/ml)		
Bacterias	**2**	**3**	**4**
Gram- positivas			
S. aureus	6,5	8,5	9,5
B. cereus	6,5	9,0	14,0
B. subtilis	8,5	9,0	ND
Gram-negativas			
S. enteriditis	6,5	8,3	10,5
E. coli sp.	7,0	9,5	ND

ND: No determinado.

Se puede observar que la oleorresina posee la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y que este efecto aumenta al aumentar la concentración de oleorresina, en las concentraciones ensayadas.

Ljalem, *et al.,* (2014) estudiaron la actividad antimicrobiana del aceite obtenido por hidrodestilación de *Schinus molle* Linn, en plantas provenientes de Etiopia, con el método de difusión en disco, los autores encontraron que recién en una concentración de 20

mg/ml se producía inhibición en el crecimiento para *E. coli*, mientras que no era efectivo para *S. aureus*. La oleorresina resultó ser más efectiva que el aceite esencial ya que a partir de una concentración de 2 mg/ml se produce inhibición en el crecimiento de ambas bacterias.

Hosni *et al*., (2011) encontraron que el extracto obtenido con cloroformo y metanol (2:1) de bayas se *Schinus molle*L. procedentes de plantas de Mograne, Túnez, era efectivo para inhibir el crecimiento sobre las mismas bacterias Gram-positivas, *B. subtilis* y *B. cereus*, y Gram-negativas, *E. coli,* ensayadas en este trabajo.

Nassar-Abbs *et al.*, (2004) encontraron que la bacteria *S. enteriditis* era menos resistente que*E. coli* frente al extracto acuoso de zumaque, sin embargo, frente a la oleorresina estudiada *S. enteriditis* resultó ser más sensible que *E. coli*. En el caso de las bacterias Gram-positivas, la *B. cereus* resulto ser más sensiblepara el extracto acuoso de zumaque, mostrando también sensibilidad a la oleorresina de Aguaribay.

Ross *et al.,* (1980) determinaron que el aceite esencial de *Schinus molle* L, oriundo de Egipto, no era efectiva sobre*E. coli* y *B. cereus,* es decir no afectaba el crecimiento de dichas bacterias, en el caso de *P. aeruginosa* y *S. aureus* el aceite esencial si produjo inhibición en el crecimiento de estas. En este trabajo, se ve que la oleorresina sí tiene efecto bactericida para *E. coli* y *B. cereus.* Esta diferencia en los resultados podría deberse a que la composición de la oleorresina es diferente a la del aceite esencial (Caballero *et al.*2014).

4.3.1.2 Mínima concentración letal

La Mínima Concentración Letal (MCL), es decir la mínima concentración de oleorresina que posee efecto bactericida, resultó ser de 2 mg/ml para *L.* monocytogenes, de 14 mg/ml para *E. coli* O 157:H7, *K. pneumoniae* y *S. enteriditis* y de 15 mg/ml para *B. cereus*, *S. aureus*, *E. colli sp.* y *P. aeruginosa* (Tabla 9).

Tabla 9: Mínima concentración letal (MCL)

	Concentraciones (mg/ml)					
Bacterias	**2**	**14**	**15**	**20**	**25**	**Control**
Gram-positivas						
B. cereus	–	–	+	+	+	–
L. monocytogenes	+	+	+	+	+	–

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

S. aureus	−	−	+	+	+	−
Gram-negativas						
E. coli sp.	−	−	+	+	+	−
E. coli O 157:H7	−	+	+	+	+	−
K. pneumoniae	−	+	+	+	+	−
P. aeruginosa	−	−	+	+	+	−
S. enteriditis	−	+	+	+	+	−

(+) Ausencia de crecimiento y **(-)** Crecimiento.

En todos los ensayos se utiliza como blanco etanol lo cual nos permite asegurar que el este no es el responsable de la inhibición del crecimiento.

Como podemos observar, *L.* por extracción con isopropanol. Deveci *et al.,* (2010), encontraron que el extracto obtenido por extracción con hexano a partir de hojas y frutos de *Schinus molle* L. no fue efectivo para inhibir el crecimiento de *E. coli* con una concentración de 8mg/ml. En este trabajo la MCL es de 15 mg/ml, si bien el solvente utilizado es etanol.

Según *Burt,* (2004) establece que la acción de aceites esenciales son más activos contra bacterias Gram-positivas que contra bacterias Gram-negativas. Esta resistencia de las Gram-negativas se debe a que están rodeadas por una capa exterior que cubre la pared celular que es la responsable de la resistencia a la difusión de los antimicrobianos. Los resultados que se han obtenido muestran que la oleorresina ha sido efectiva para todas las bacterias ensayadas tanto Gram-negativa como así también Gram-positivas.

4.3.2 Hongos

4.3.2.1 Inhibición del crecimiento micelial

En la Tabla 13 se detallan los resultados obtenidos en el estudio de la inhibición del crecimiento micelial.

Tabla 11: Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial.

	Concentración (mg/ml)		
Hongos	**0,125**	**0,185**	**0,250**

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

P. rugulosum	9,54	14,12	13,35
P. citrinum	6,07	8,09	16,19
P. brevicompactum	0,96	8,21	4,83
P. griseofolvum	7,14	0	7,65
P. nalgiovence	0	1,27	7,65
A. alternata	2,8	12,93	15,51
F. graminearum	7,05	9,41	13,52

Podemos observar que el 50 % de los hongos estudiados (*P. citinu, P. nalgiovence, A. altrnata* y *F. graminearum*), a los 7 días incubación, presentan un aumento en el porcentaje de inhibición del crecimiento a medida que se aumenta la concentración de oleorresina. Gundidza (1993) estudio la capacidad antimicrobina del aceite esencial de *Schinus molle* Linn y encontró que era efectivo en la reducción del crecimiento micelial de *P. citrinum* especie que resultó ser la más sensible al uso de laoleorresina en comparación a las otras especies de *Penicillium* estudiadas.

Los restantes hongos ensayados, muestran inhibición del crecimiento micelialaunque en la concentración más alta ensayada, 0,250 mg/ml para el caso de *P. rugulosum* y *P. brevicompactum* y de 0,185 mg/ml para *P. griseofolvum*, se vio estimulado el crecimiento de estos. Este comportamiento podría deberse a que en bajas concentraciones, puede observarse un efecto estimulante del crecimiento, fenómeno que es denominado hormesis (Orden, 2005). El fenómeno de hormesis es la relación dosis-respuesta en donde se ve un efecto estimulante a bajas dosis y un efecto inhibitorio a altas dosis, es un fenómeno natural de todos los sistemas biológicos. El primer reporte de hormesis fue en el año 1943 por Chester Southam y John Ehrlich cuando investigaban el efecto del extracto de cedro rojo sobre el metabolismo de hongos (Pérez Davison *et al.,* 2009).

Los aceites, extraídos con dimetil–éter, de lavanda, romero y salvia, con una concentración de 1 mg/ml, producen una inhibición del crecimiento micelial de 29.5 %, 24 % y 9 %, respectivamente, sobre el género *Penicillium*, mientras que el aceite de orégano, con concentración de 0,25 mg/ml, produce un 100 % de inhibición en el crecimiento de este género (Daferera *et al.,* 2000). Los valores encontrados en este trabajo para *P. rugulosum* y *P. citrinum*, con una concentración de 0,25 mg/ml, son de 13,35 % y 16,19 % respectivamente. Estos valores son menores a los hallados por Daferera *et al.* (2000) para otras especias.

En la Tabla 12, se ve que a concentraciones de 15 mg/ml se obtiene el 100 % de inhibición en el crecimiento micelial ara *Epicoccum sp*, valores superiores al 80 % para *Eurotium sp.* y *Trichoderma* sp. y un 50 % para *Paecylomyces sp.*, se observa que a

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

medida que se aumenta la concentración de oleorresina aumenta el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.

Tabla 12: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. Técnica poissoned-food.

	Concentración (mg/ml)		
Hongos	**5**	**10**	**15**
Eurotium sp.	52,17	71,73	82,60
Epicocum sp.	44,60	78,64	100
Trichoderma sp.	27,21	41,77	85,88
Paecylomyces sp.	24,60	44,60	47,60

El extracto etanólico de mejorana, según Vági *et al.,* (2005), presenta una inhibición de 100% con una concentración de 500 mg/ml para *Trichoderma sp.*. En el caso de la oleorresina se obtiene una inhibición de 85,8 % con una concentración de 15 mg/ml.

4.3.2.2 Efecto sobre la germinación se esporas del genero *Aspergillus* (CN fungistático y fungicida)

La inhibición de la germinación de las esporas es de importancia ya que los hongos de este género son productores de micotoxinas, como por ejemplo, *A. flavus* es productor de *Aflatoxina* B1 y B2 (Ngueface *et al.,* 2004) al igual que *A. parasiticus*.*A. ochraceus* es productor de *Ochratoxina* (Basilico *et al.,* 1998)y *A. niger* de *Fumonisinas* además de ser productor de *Ochratoxina*.Las *Aflatoxinas* son hepatocarcinógenas no solo en animales sino que también afectan a los seres humanos.La *Ochratoxina* (OTA), en cambios, es mutagénica y carcinogénica en animales, además de estar relacionada con nefropatías en cerdos y humanos (Soliman *et al.,* 2002).

Para analizar la inhibición de la geminación de esporos se utilizó la técnica de siembra por suspensión. Se sembró una suspensión de esporos con 1 10^5 esporos/ml en placas, conteniendo agar extracto de malta y diferentes concentraciones de oleorresina (1mg/ml hasta 25 mg/ml, variación de 1 en 1) según la técnica de Garber y Houston (1959) (Materiales y Métodos, 3.3.2.2). Se determinaron la mínima concentración inhibitoria del crecimiento con efecto fungistático (MCI) y la mínima concentración letal con efecto fungicida (MCL).

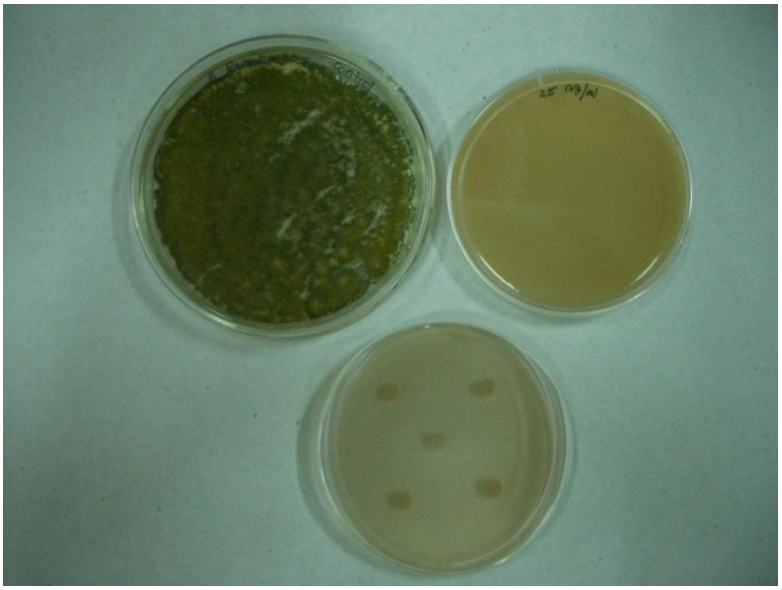
Los valores de MCI y de MCL para *A. flavus* y *A. ochraceus* son coincidentes (6 mg/ml) esto nos indica que el efecto de la oleorresina sobre estos hongos tiene solo efecto

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

fungicida. Briceño *et al.,* (2013) han encontrado una MCI de 23,3 mg/ml para el extracto etanólico de melisa para *A. flavus*, valor que supera, aproximadamente en 4 veces el valor encontrado en este estudio. En el caso de *A. paraciticus* se observa que a partir de una concentración de 17 mg/ml se presenta ausencia de crecimiento. Al analizar la supervivencia, es decir después de aplicar la técnica de Garber-Houston, las placas que correspondían a las concentraciones de 17 mg/ml a 24 mg/ml de oleorresina presentaron efecto fungistático (MCI) mientras que la concentración de 25 mg/ml presentó un efecto fungicida (MCL).

En la Imagen 2, se muestra a la izquierda, la placa control para *A. paraciticus*, se puede observar el crecimiento normal del hongo a los 7 días de incubación. En la placa de la derecha no se observa crecimiento para la concentración de 25mg/ml. Debajo de estas dos placas está la que corresponde a la de la técnica descripta por Garber y Houston. La ausencia de crecimiento, después de 14 días en medio sin oleorresina, indica que el valor de esta concentración, 25 mg/ml, corresponde a la MCL, es decir, la mínima concentración de oleorresina que tiene efecto fungicida.

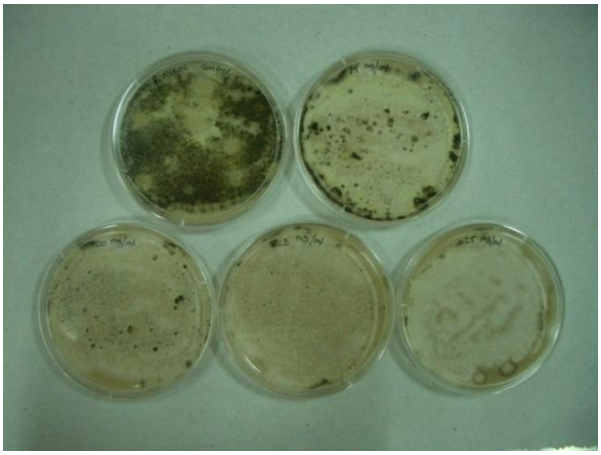
Imagen 2: Inhibición de la geminación de esporos de *A. paraciticus*



Los resultados para la especies *A. niger* fueron negativos dado que en las concentraciones estudiadas no hubo inhibición en la germinación de las esporas. Lo que se observa (Imagen 3) es que, además, de la geminación de estas, hay crecimiento del micelio y esporulación. Si lo comparamos con el control se podría decirque el crecimiento fue más lento debido a la presencia de la oleorresina en el medio de cultivo

Imagen 3: *A. niger.* Control, 19, 20, 23 y 25 mg/ml. 7 días de incubación

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes



Davicino *et al.* (2007) ha reportado que el extracto etanólico de hojas de *Schinus molle* L. y de semillas de *Schinus terebenthifolius* no inhibían la germinación de esporas del *A. niger* de la misma manera que no lo inhibe la oleorresina.

El extracto obtenido con una mezcla de etanol y hexano de siempreviva es efectivo contra el *A. niger* con un valor de MCI de 8 mg/ml. (Navarro García *et al.,* 2003). Carpinella *et al.,* (2003) han encontrado para *A. niger*, que el extracto del árbol del paraíso posee un valor de la MCI de 100 mg/ml y el de la MCL de 200 mg/ml.

Gulluce *et al.* (2003) indica que el aceite esencial de *Saturdeja hortensis* inhibe el crecimiento se .*A niger* con un valor de MCI de 31,25 µg/ml y a su vez Sokmen *et al.* (2004) encontró un valor MCI de 62,5 µg/ml para *A. flavus* y para *A. niger*utilizando extracto de *Origanum acutidens.*

4.3.3 Levaduras

4.3.3.1 Efecto del etanol sobre las levaduras

El estudio de la tolerancia al etanol por las levaduras dio como resultado que el crecimiento no se veía afectado en las concentraciones ensayadas (1, 1.15, 1.25, 1.35 y 1.5 (%v/v)). Este análisis permite asegurar que el etanol no va a interferir con los resultados posteriores dado que la oleorresina debe ser diluida en etanol para su uso.

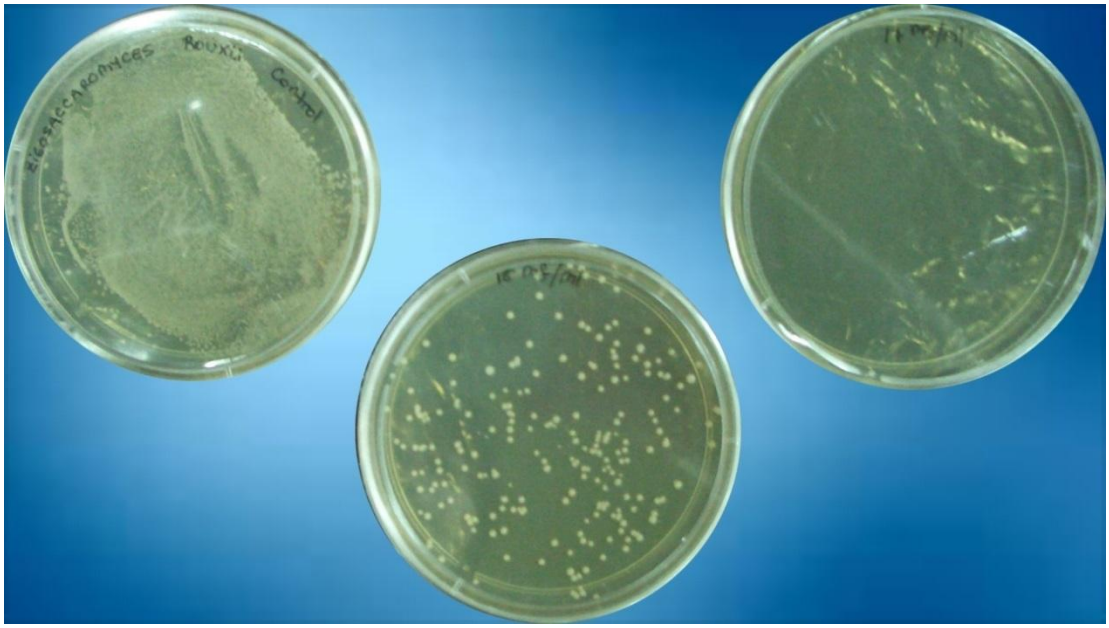
Medawar *et a.,*(2003) han demostrado que la concentración de etanol que afecta el crecimiento de levaduras, que contribuyen al deterioro de los vinos, es de 91 mg/ml. A su vez Quintas *et al.,* (2000) reportan que *Z. bailli* posee una resistencia al etanol semejante a la de *S. cerevisiae*, siendo los valores máximos de tolerancia de 180 mg/ml y de 175 mg/ml, respectivamente. La concentración de 1 %v/v testeada, tomando como densidad del etanol 0,788 g/ml, correspondería a tener una concentración de 11,82 mg/ml, los valores reportados de tolerancia en la bibliografía superan notablemente la cantidad de etanol que se utilizará en los ensayos futuros.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

4.3.3.2 Inhibición del crecimiento de levaduras

Los valores de MCL obtenidos para levaduras son de 11 mg/ml para *S. piss*, *Rodotorula spp.* y *Zygosacharomyces* spp. y de 17 mg/ml para *Zygosaccharomyces rouxii* En la Imagen 5 se muestran las placas correspondientes al control (placa de la izquierda), la correspondiente a una concentración de 15 mg/ml (placa del centro) y la de 17 mg/ml (placa de la derecha).

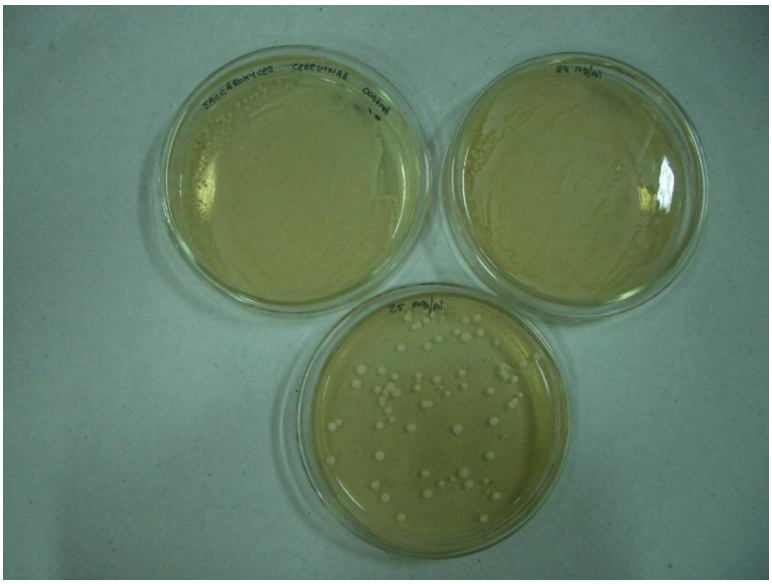
Imagen 5: Inhibición del crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii.*



Para *Saccharomyces cereviciae* se vio que la oleorresina no es efectiva ya que hubo crecimiento en todas las concentraciones estudiadas (Imagen 6).

Imagen 6: Supervivencia *Saccharomyces cereviciae.*

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes



Las levaduras tales como *Z. rouxii, Z. bailli*, *S. cereviciae y Rodotorula spp.* son importantes como agentes deteriorantes de alimentos cuando estos no son preparados con buenas prácticas de manufactura. Se han dado casos de gastroenteritis y de reacciones alérgicas donde las levaduras son sospechosas de ser las causantes (Salo *et al.,* 2005).

Ciani *et al.,*(2003) ha encontrado que el aceite esencial de Saturdeja *montana* inhibe el crecimiento de *Z. rouxii* y *Z. bailli* a una concentración de 0,12 mg/ml, mientras que Matan *et al.,* (2006) determinó que los aceites esenciales de canela yclavo, cuando son mezclados en una proporción 1:1,inhiben el crecimiento de *Z. rouxii* utilizando la técnica de difusión en disco de papel.La concentración necesaria de oleorresina es muchos mayor comparada con la del aceite esencial de Saturdeja *montana,* a la visat de los resultados se podría pensar que estas levaduras resultan sensibles al uso de antimicrobianos naturales.

Los resultados anteriores demuestran que la oleorresina de las bayas de Aguaribay tiene efecto letal sobre levaduras deteriorantes de alimentos. Si bien el resultado para *S. cerevisiae* es negativo, en la industria de los alimentos y en particular en la de producción de productos panificados fermentados, este resultado podría ser positivo ya que no afectaría al crecimiento de esta levadura y podría ser usada como saborizante.

4.4 Estabilidad de la oleorresina

Los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad se muestran en la Tabla 13. En todas las condiciones ensayadas la oleorresina mantuvo su capacidad inhibitoria ya que produjo un 100 % de inhibición en el crecimiento de las bacterias estudiadas. Este estudio se realizó sobre una Gram- positiva y una Gram- negativa. La *S. aureus* contamina a los alimentos por una mala manipulación de los mismos y la *S. enteriditis* por

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

contaminación cruzada (Manual de Manipuladores de Alimentos, Ministerio de salud, www.ms.gba.gov.ar)

Tabla 13: Estabilidad de la oleorresina

	Almacenamiento			
Bacterias	**4ºC**		**25ºC**	
	Día 0	**Día 30**	**Día 0**	**Día 30**
S. aureus	+	+	+	+
S. enteritidis	+	+	+	+

Bacterias	**Temperatura de calentamiento**		
	40ºC	**60ºC**	**80ºC**
S. aureus	+	+	+
S. enteritidis	+	+	+

Bacterias	**Cantidad de bacterias/ ml de medio de cultivo**			
	2 10^6	**4 10^6**	**6 10^6**	**8 10^6**
S. aureus	+	+	+	+
S. enteritidis	+	+	+	+

(+) Ausencia del crecimiento

Estos resultados son comparables con los reportados por Dikshit *et al.,* (1986) en cuanto a las condiciones de almacenamiento y de calentamiento. La oleorresina muestra que soporta un calentamiento hasta 80ºC sin perder su capacidad antibacteriana. En cuanto al tiempo de almacenamiento, podemos observar que a los 30 días conserva sus cualidades aun almacenada a temperatura de refrigeración (4ºC) como a temperatura ambiente (25ºC).

Poder calentar la oleorresina hasta 80ºC y que esta no pierda su capacidad antimicrobiana es un resultado muy favorable ya que se la puede incorporar en alimentos, que se deben cocinar antes de ser consumidos, como saborizante y como conservante.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

4.5 Aplicaciones

La Administración de Alimentos y Drogas (Food and Drug Administration (USA)) en el Código Federal de Regulación, Título 21, da una lista de aceites esenciales y oleorresinas que se pueden considerar GRAS (por sus siglas en inglés (Generally recognized as safe)). Dentro de esa lista se encuentra la oleorresina de *Schinus molle* utilizada en este trabajo con lo cual puede considerarse segura cuando se utiliza en alimentos. Por lo tanto, la oleorresina extraída de la pimienta rosa, debido a su efectividad como antimicrobiano, podría ser agregada a productos elaborados con carne vacuna ya que su color y sabor son aptos para este tipo de alimentos. En este trabajo se incorporó a medallones de carne vacuna picada (hamburguesas).

A efectos de analizar la microflora total que aparece en alimentos, se realiza el recuento de microorganismos mesófilos totales. En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30º C en las condiciones establecidas. En este recuento se estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Este parámetro es el que especifica el C. A. A. en el Artículo 255, Capítulo VI (Alimentos Cárneos y Afines) (2007).

4.5.1 Efecto de la oleorresina en la flora nativa de los medallones de carne vacuna picada

En la Tabla 14 se muestran las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra para el recuento de mesófilos totales a tiempo 0 y a las 24 hs de refrigeración (4 ºC) para todos los lotes analizados.

Tabal 14: Recuento de aerobios mesófilos totales en hamburguesas.

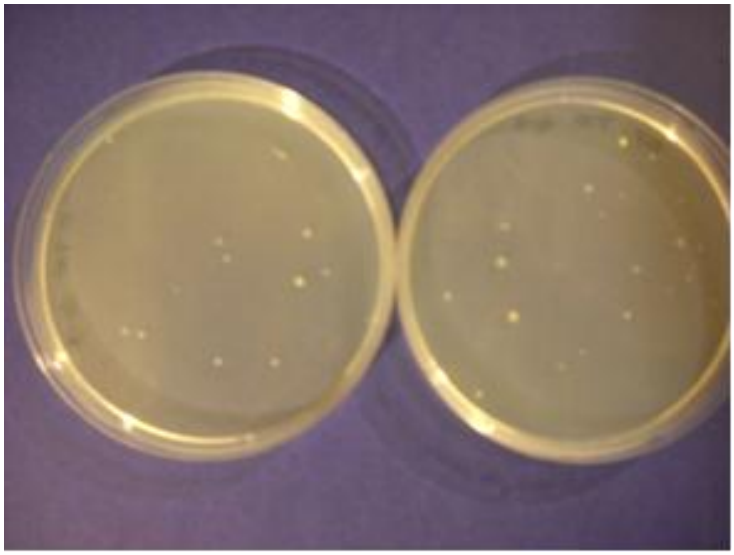
	UFC/g de muestra	
Lotes	**0 hs**	**24 hs.**
1. Control	$1{,}5\ 10^4$	$2{,}9\ 10^5$
2. Con etanol	$1{,}6\ 10^4$	$1\ 10^5$
3. 0,5% oleorresina	$1{,}6\ 10^4$	$2\ 10^4$
4. 1 % oleorresina	$1.5\ 10^4$	$1.6\ 10^4$

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Este resultado muestra que el agregadode oleorresina, en las concentraciones ensayadas, retarda el crecimiento de los microorganismos presentes en las hamburguesas, en 1 unidad logarítmica, ya que no aumenta el recuento inicial como sucede en el lote sin oleorresina y con etanol.

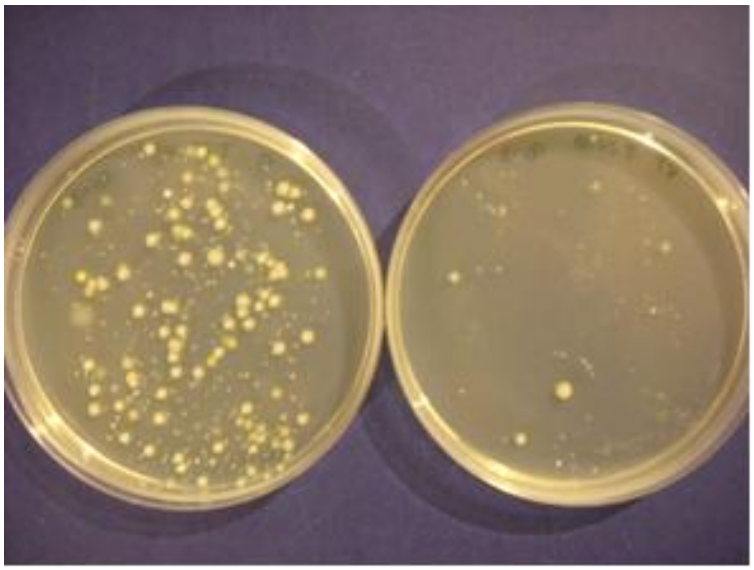
En las Imágenes 7 y 8 se muestran las placas con el recuento de microorganismos para el control y para la concentración del 1% de oleorresina a tiempo 0 y a 24 hs, respectivamente.

Imagen 7: Recuento de microorganismos a tiempo 0.



Placa de la izquierda: Control. Placa derecha: oleorresina (1 %)

Imagen 8: Recuento de microorganismos a tiempo 24 hs.



Placa de la izquierda: Control. Placa derecha: oleorresina (1 %)

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La oleorresina de romero es capaz de inhibir significativamente el crecimiento de *E. coli* O157:H7 después de 9 días almacenamiento en medallones de carne vacuna cocida (Ahn *et al.,* 2004a) mientras que el extracto de corteza de pino lo disminuye en una unidad logarítmica, para la misma bacteria pero en medallones de carne vacuna cruda(Ahn *et al.,* 2004b). Medina de Días *et al.,* (2003) reporta que el agregado de aceite de tomillo a hamburguesas de carne, en concentraciones de 0 a 0,15 g/kg de carne, no presenta diferencias significativas en el crecimiento de microorganismos aerobios.

4.5.2 Porcentaje de acumulación de metamioglobina

Durante el almacenamiento no solo hay crecimiento microbiano que afecta el olor y el sabor sino que también cambia el color de las mismas. El color pardo de la carne se debe a la acumulación de la metamioglobina producida por la oxidación del hierro hemo (ferroso) a férrico (Medina de Días *et al.,* 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo, se ven en la Tabla 15 ya su vez son presentados en los Gráficos 7 y 8.

Tabla 15: Porcentaje de acumulación de MetMb

	Tiempo en días		
Concentración	**0**	**1**	**3**
Control	53	79	83
0,5 %	49	71	80
1 %	48	67	79

Grafico 7: Acumulación de MetMb, concentración 0,5 %

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

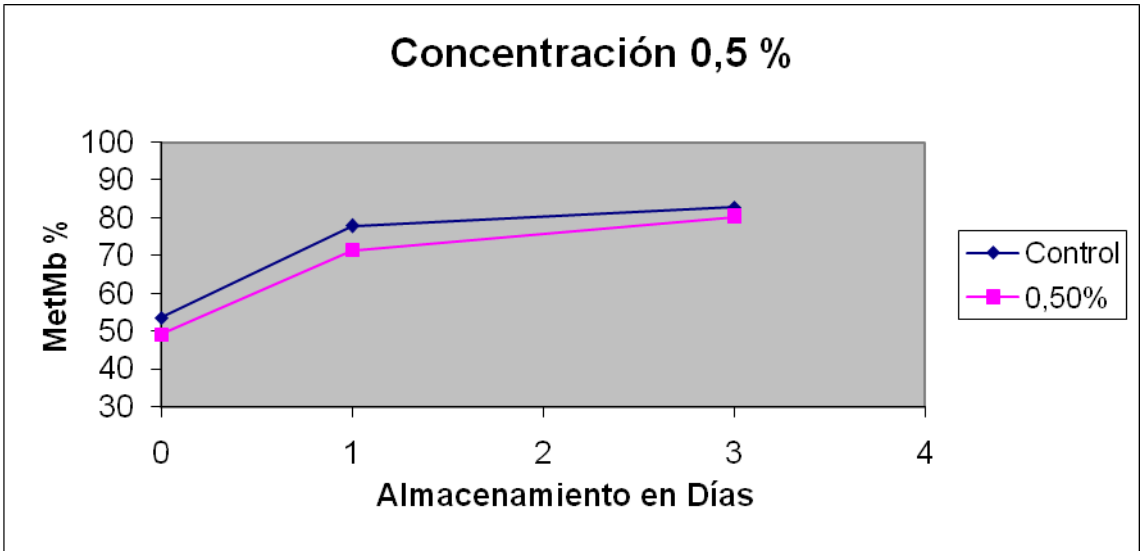
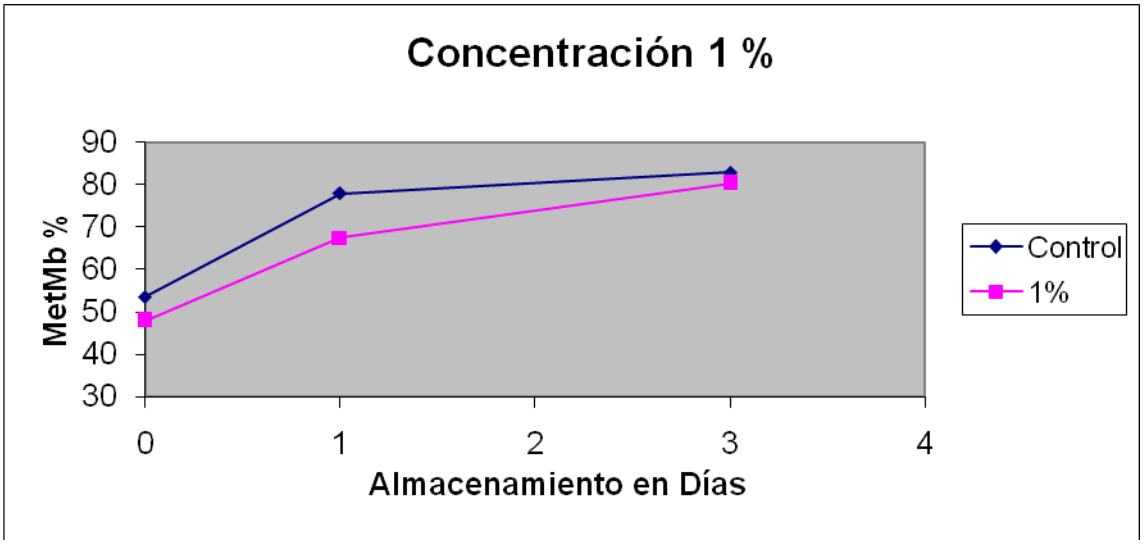


Grafico 8: Acumulación de MetMb, concentración 1 %.



La acumulación de MetMb resultó ser menor para las concentracionesestudiadas, podemos observar que dentro del primer día de almacenamiento la deferencia en la acumulación de la MetMb es más evidente que al tercer día donde la diferencia con el control ya no es tan significativa.

Bekhit *et al.,* (2003) estudiaron el retardo de la formación de MetMb en empanadas de carne con el agregado de carnosina, quercetina, rutina y resveratrol en una concentración de 0.0125 %, 0,0166 %, 0,0335 % y 0,0125 % (g/100 g de carne)

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

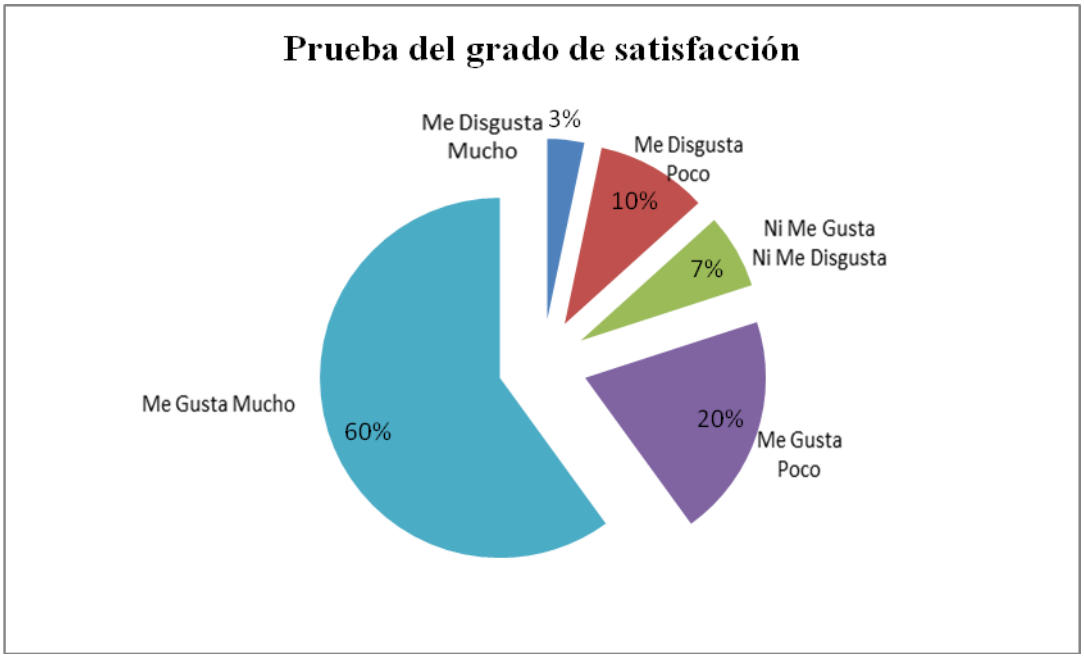
encontrando que, en los tres primeros días de almacenamiento las muestras con oleorresinas poseen un porcentaje de acumulación de MetMb menor al del control.

El sabor, el aroma y el color de un producto pueden ser los criterios para el rechazo de cualquier tipo de alimento. En las hamburguesas la oxidación de lípidos, la aparición de olores indeseables y el cambio de color por la transición de mioglobina a metamioglobina se da mucho antes que en otros productos cárnicos (Karpinska *et al.,* 2001; Armenteros *et al.,* 2012). La oleorresina de las bayas del Aguaribay retarda la oxidación de la mioglobina a partir de una concentración de 0,5 %.

4.5.3 Análisis sensorial

En el gráfico 9 se muestran los resultados del análisis sensorial, prueba del grado de satisfacción, utilizando una escala hedónica de 5 puntos, para una concentración del 0,5%. Las hamburguesas con un 1% de oleorresina no se sometieron al análisis sensorial porque tenían un olor muy pungente aún después de cocidas.

Gráfico 9: Prueba del grado de satisfacción



El análisis demuestra que las hamburguesas condimentadas con oleorresina tuvieron una buena aceptación ya que al 60% de los panelistas le gustó mucho (correspondiente a un valor 5 en la escala hedónica) y al 20 % le gustó poco (valor 4 en la escala hedónica).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

A un 7% le resultó indiferente (valor 3) mientras que a un 10% le disgustó poco (valor 2) y solo a un 3 % (valor 1) le disgustó mucho.

Además, a los jueces se les había pedido que realizaran observaciones si lo consideraban necesario. A continuación se detallan las observaciones más relevantes:

- Tiene como un sabor a especias.
- Está bien de sal y consistencia.
- Tiene un sabor muy suave y da la sensación de carne de primera calidad.
- Muy rica, con el gusto de la hamburguesa casera.
- Está rica, tiene un gusto diferente a la común.
- El medallón de carne es muy sabroso, le colocaría un poco más de sal.
- Me gusta que no tenga el sabor "artificial" de las compradas, se nota que es natural.
- Noto un gusto diferente a las tradicionales, quizás algún condimento, pero muy buena.
- No se le siente ninguna diferencia.
- No tiene el gusto típico de las hamburguesas.

Hayoumi *et al.,* (2008) utilizó al aceite esencial de bayas de *Schinus molle* L. (Aguaribay) para condimentar bollos de carne picada que sometió a un análisis sensorial por medio de jueces no entrenados. Al igual que los resultados de este trabajo, una concentración de aceite esencial de 0,5 % resultó muy bien aceptada.

5. RESUMEN DE LOS RESULTADOS ENCONTRADOS

El rendimiento de extracción, utilizando etanol, para la obtención de la oleorresina de las bayas de Aguaribay resultó ser de 21,15 %.

- La composición de la oleorresina obtenida por GC-MS resulto ser un 40 % de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, un 34 % de alcoholes sesquiterpénicos y compuestos relacionados (óxido de cariofileno y acetato de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

guaiol) y un 17 % de otros compuestos tales como ácidos palmítico y oleico libres o como ésteres etílicos.

La oleorresina presenta capacidad antimicrobiana para bacterias, hongos y levaduras.

- La Mínima Concentración Letal para bacterias Gram-positivas y negativas, fue de 2 mg/ml para *L. monocytogenes*, de 14 mg/ml para *E. coli* O 157 H.7, *K.pneumoniae* y *S. enteriditis* y de 15 mg/ml para *B. cereus*, *E. coli* y *P. aeruginosa.*
- En hongos se encontró que inhibía el crecimiento micelial de *P. griseofolvum, P. rugulosum, P. brevicompactum, P. citinum, P nalgiovence, F. graminearum A. alternata, Eurotium spp, Epicocum spp. Trichoderma sp.* y *Paecylomyces spp.*
- La inhibición de la germinación de esporos dio como resultado una Mínima Concentración Inhibitoria y una Mínima Concentración Letal de 6 mg/ml para *A. Flavus* y *A. ochraceus*, mientras que para *A. paraciticus* fue de 17 mg/ml la inhibitoria y de 25 mg/ml la letal.
- En levaduras la Mínima Concentración Letal fue de 11 mg/ml para *S. piss*, *Rodotorula spp.* y *Zygosacharomyces* spp. y de 17 mg/ml para *Zygosaccharomyces rouxii.*
- La oleorresina muestra que soporta un calentamiento de hasta 80ºC y que puede ser almacenada durante 30 días a 4 ºC y a25 ºC sin que afecte su capacidad antibacteriana.

La oleorresina puede ser usada como antimicrobiano en medallones de carne picada ya que:

- El agregado de oleorresina, en concentraciones de 0,5 % y 1%, retardan el crecimiento de microorganismos mesófilos totales y disminuye la acumulación de metamioglobina.
- Las hamburguesas con 0,5 % de oleorresina han tenido una buena aceptación ya que el grado de satisfacción que se encontró está entre 5 y 4 de la escala hedónica que se utilizó para el análisis sensorial.

6. CONCLUCIONES GENEALES

En función de los resultados obtenidos se puede concluir que la oleorresina extraída de las bayas de Aguaribay, *Schinus molle* Linn, presenta actividad anitimicrobiana

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

inhibiendo el crecimiento de bacterias, hogos y levaduras responsables del deterioro de alimentos.

El proceso de obtención de la oloerresina es rápido, económico y presenta un alto rendimiento que permite que esta sea un producto que podría ser aceptado en la indusria de los alimentos. Se puede almacenar tanto en refrigeración como a temperatura ambiente, sin perder sus propiedades. Es termoestable ya que resiste el calentamiento lo que o hace que pueda ser aplicada en alimento que requieran ser cocinados antes de su consumo. Puede ser utiliada para saborizar y conservar medallones de carne picada debido a su sabor agradable. Esta aplicación se podría extender a otros productos alimenticios de consumo humano como conservante y saborizante de origen natural.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. y Arsenakis, M. (1998). *"Antifungal activities of Origanum vulgare subsp. hirtum, Mentha spicata, Lavándula angustifolia, and Salvia fruticosa essential oils against human pathogenic fungi".* Journal Agricultural and Food chemistry, 46, 1739-1745.

Agroforestry Tree. Base de datos. World Agroforrestry Center.

Ahn j., Grun I. y Mustapha. (2004a)*"Effects of extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef".* Food Microbiology, 24, 7-14.

Ahn j., Grun I. y Mustapha. (2004b) *"Antimicrobial and antioxidant activies of natural extracts in vitro and in ground beef".* Journal of Food Protection. Nº1, Vol 67, 148-155.

Alcalá, M., Gómez, R., Espejo, J., Esteban , A. y Marcos, A. (1995), *"Isotermas de adsorción de humedad a 30 ºC de algunas especias desecadas".* Alimentaria, Enero-Febrero 53-59.

Administración Nacional de Medicamentos y Tecnología Médica (ANMAT). (2011). *"Análisis microbiológico de alimentos. Metodología oficial".* Volumen 1.

Anzaldua-Morales A. (1994) "*La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica".*Acriba.Zaragoza. Cap 3, 70-72.

A.O.A.C. Official Method 986.21 (1997). Moisture in spices.

Armenteros M., Ventans S., Morcuende D., EstévezM. y Ventanas J. (2012) *"Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos".* Eurocarne. Nº207,Junio, 63-73.

Balasubramanians, S., Roselin, P., Singh, K., Zachariah, J. y Saxena, N. (2015). *"Post harwest processing and benefit of black pepper, coriander, cinnamon, fenugreet and Tumeric spices".* Critical Reviews in Food Science and Nutrition.

Barbosa Gloria E., Cantero Juan José, Nuñez César O. y Espinar Luis Ariza. Editores. (2006) "*Pteridófitas y antofitas silvestres y naturales*". Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina). Pág. 238.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Baser, K., Kurkçuoglu, m. y Demirrçakmak, B. (1997). *"Composition of the essential oil of Schinus molle L. Grown in Turkey".* Journal Essential Oil Res., 9, 693-696.

Basilico, M. y Basilico J. (1999). *"Inhibitory effects of some spice essential oils on Aspergillus ochraceus NRRL 3174 growth and ochratoxin A production".* Letters in Applied Microbiology, 29, 238-241.

Bekhit A., Geesink G., Ilian M., Morton J. y Bickerstaffe R. (2003) *"The effects of natural antioxidants on oxidative processer and metmyoglobin reducing activity in beef Pattie".*Food Chemistry. 81, 175-187.

Benezet A., De la Osa J. M., Pedregal E., Botas M., Olmo N. y Pérez-Flores F. (2003). *"Microbiología de especias utilizadas en productos cárnicos".* Alimentaria 65, 65-71.

Betts, G., Linton, P. y Betteridge, R. (2000). *"Synergistic effect of sodium chloride, temperature and pH on growth of a cocktail of spoilage yeasts: a research note".* Food Microbiology, 17, 47-52.

Borges, P., Fernádez, N. y Roncal, E. (1997). *"Obtención y caracterización de oleorresinas se especias".* Alimentaria, Octubre, 97-99.

Briceño, S. y Jaspe, Y. (2013). *"Actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de Melisa officinalis (Lamiaceae) sobre Aspergillus flavus".*Saber, Universidad de Oriente, Venezuela, vol 25, Nº 2, 185-191.

Burt Sara. (2004) *"Essential oil: their antibacterial properties and potential applications in food-a review"*. International Journal of Food Microbiology 94, 223-253.

Caballero, G., Padin, E. y Pollio, M.L. (2014) *"Chemical composition of oleoresins from berries of Schimus molle L. Grown in Buenos Aires Province (Argentina)".*Journal of Food Technolohy, 12 (3): 73-77.

Cañigueral, S., Eduardo Dellacassa & A.L. Bandoni. (2003) "*Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo?* Acta Farm. Bonaerense 22 (3): 265-78.

Cardona Pareja, L. y González P. (2007) *"Obtención y caracterización de la oleorresina de ajo (Allium sativum).*Trabajo final de grado. Universidad de Pereira.

Carpinella, M., Giorda, L., Ferrayoli, C. y Palacios, S. (2003). *"Antifungal effect of different organic extractsfrom Melia aerdarach L. on Phytopathogenic fungi and their isolatedactive components".* Journal of agricultural and Food Chemistry, 51, 2506-2511.

Carrere Ricardo (2009) *"Anacahuita (Schinus molle). La indígena más popular"*. Colección del gripo Guayubira sobre especies indígenas. Nº 15. http//www.guayubira.org.uy/monte/Anacahuita.pdf

Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J. y Jiménez, S. (2010) *"Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de Rosmarinus officinalis L.sobre algunas bacteriasde interés alimentario".* Vita. Reviata de la facultad de Química farmacéutica. Colombia. Vol 17, Nº 2, 149-154.

Castaño Sepúlveda, M. (2012). *"Evaluación dela capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (Syzygiun aromaticun) y de canela (Cinnamomum verum), sobre la levadura(Rhodotorula mucilaginosa) en leche chocolatada.* Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia.

Ciani, M., Menghini, L., Pagiotti, R., Menghini, A. y Fatichenti, F. (2000). *"Antimicrobial properities os essential oil of Saturdeja montana L. on pathogenic and spoilage yeasts".* Biotechnology Letters, 22, 1007-1010.

Código Alimentario Argentino (C.A.A.). (2007). *"Alimentos carneos".*Artículo 255, Capítulo VI.

Código Alimentario Argentino (C.A.A.).(2014) Capítulo XVIII.

Comisión Europea. Directiva 94/45/CE (26de julio de 1995). [online: 23-Feb-2007] URL disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ addit_flavor/flav13_pdf.

Chirino, M., M. García and A. A. Ferrero, (2001). *"Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de Schinus molle L. (Anacardiaceae) sobre larvas neonatas de Cyntia Pomoella (Lepidoptera: Tortricidae)"*. Bol. San Veg. Plagas; 27: 305-314.

Chizzola, R., Michitsch, H., Franz, Ch (2008). *"Antioxidative properties of Thymus vulgaris leaves. Comparison of different extracts and essential oil chemotypes"*. Journal of Agricultural and Food Chemestry, 56, 6897-6904.

Dabbah, R., Edwards, V. y Moats, W. (1970). *"Antiicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria".* Applied Microbiology, vol. 19, 27-31.

Daferera, D.; Ziogas, B.; Polissiou, M. (2000). *"GC-MS Analysis of Esential Oils from Some Greek Aromatic Plants and their Fungitoxicity on Penicillium digitatum"*.J. Agric. Food Chem., 48, 2576-2581.

Daghero, J. y Mattea, M. (2000). *"Obtención de oleorresinas de Ajo (Alliunm sativum) por extracción con etanol".* Anales SAIPA. Volumen XVI, 105-108.

Davicino, R., Mattar, M., Casali, Y., Correa, S., Pettenati, E. y Micalizzi, B. (2007). "*Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina".* Rev. Peru. Biol.14 (2): 247-251.

Delaquis, P. J.; Stanich, K.; Girard, B.; Mazza G. "*Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils"*. . Int. J. Food Microbiology. 2002, 74, 101-109.

Deveci, O., Sukan, A., Tuzun, N. y Kocabas, E. (2010). *"Chenical composition, repellent and antimicrobial activity of Schinus molle L.".* Journal of Medicinal Plants Research, vol. 4 (21), 2211-2216.

Dishit, A., Singh, A. y Dixit, S. (1980). *"Fungitoxic activity of some essential oils aagainst Helminthosporium oryzae".* Indian Perfumer, vol. XXIV Nº 4, 222-223.

Dishit, A. y Dixt, A. (1982). "*Cedrus oil- A promising antifungal agent*". Indian Perfumer, vol. 26 Nº 2-4, 216-227.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Dishit, A. y Husain, A. (1983). *"Antifunal Action of some essential oils againt animal pathogens".* Fitoterapia, vol. IV, Nº 3, 171-176.

Dishit, A., A. A. Naquvi and A. Husain, (1986).*Schinus molle: a new source of natural fungitoxicant*. Appl. Environ Microl., May: 1085-1088.

Dominguez M. (2007) *"Guía para la Evaluación Sensorial de Alimentos".* Agro Salud. 8-9. www.iin.sld.pe.

Dorantes, L., Colenero, R., Hernandez, H., Mota, L., Jaramillo, M., Fernandez, E. y Solano, Cl. (2000). *"Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by Capsicum extracts".* International Journals Food Microbiology, 57, 125-128.

Dupertuis L., Medina R., Zimmermann M., Amadio C. y Miralles S. (2004) *"Medallones de carne vacuna. R*educción *del contenidode sal por incorporación de oleorresinas de especias".* Rev. FCA UNCuyo. Tomo XXXVI Nº2, 67-71.

Escudero, A. (2009). "*Estudio de la capacidad antioxidante de la oleorresina extraída de las bayas de aguaribay"*. Trabajo Final Carrera Ingeniería en Alimentos. Universidad nacional de Quilmes.

Food and Drug Administration (FDA). (2014). CFR- Code of federal Regulations, Título 21,food and drugas, Capítulo I.

Fennema Owen R... (2000) "*Química de los Alimentos*". Acriba. Zaragoza. Cap. 11, 885 - 887.

Fernandez-Trijillo, P. (2007). *"Extracción convencional deoleorresina de pimentón dulce y picante I. Generalidades, composición, proceso e innovaciones y aplicaciones".*Grasas y Aceites, 58 (3), 252-263.

Fitzgerald, D., Stratford, M. y Narbad, A. (2003). *"Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vainillin".* International Journals Food Microbioligy, 86, 113-122.

Forrest J., Aberle E., Hedrick H., Judge M. y Merkel R. (1975) "*Fundamentos de ciencia de la carne"*. Acriba. Zaragoza. Cap 1, 3-9.

Garber, R. H.; Houston, B. R. (1959). *"An inhibitor of verticillium albo-atrum in cotton seed".* Phytopathological notes. Phytopathology, 49, 449-450.

García O., Acevedo I., Mora j., Sánchez A. y Rodríguez H. (2009) *"Evaluación físicay proximal de la carne para hamburguesas elaborada a partir de pulpa de cachama blanca (Piaractusbrachypomus) con harina de soya texturizada".* Revista UDO Agrícola. 9 (4): 951-962.

Gerhardt, U. (1975) "*Especias y condimentos*". Acriba. Zaragoza.

González Flores, T. y Rojas Herrera, R. (2005). *"Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico".* Salud Pública de México, vol. 47, Nº5, 388-390.

Greenspan, L.(1977). *"Humidity fixed point of binary saturated aqueous solutions".* Jpournal of Research of the National Bureau of Standards – A Physics and Chemistry. Vol 81 (A), No. 1, 89-96.

Gundidza, M., (1993). "*Antimicrobial activity of essential oil from Schinus molle L."* C. African J. Med., 39 (11): 231-234.

Gutiérrez, M. y Droguet, M. (2002). *"La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor".*Boletín Intexter (U.P.C.) Nº 122, 35-41.

Hayouni E., Charief I., Abdrabba M.,Bouix M., Leveau J., Mohammed H. y Hamdi M. (2008) *"Tunisian Salvia officinalis L. and Schinus molle L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against inoculated in minced beef meat".* International Journal of Food Microbiology. 125. 242-251.

Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., sakai, S. y Kurata, H.(1980). *"Inhibiory effect of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi".* Applied and Environmental Microbiology, vol. 39, Nº4, 816-822.

Hosni, Ch., Jemli, M., Dziri, S., M'rabet, Y., Ennigrou, A., Sghaier, A., Casabianca, H., Vulliet, E., Brahim, N. y Sebei, H. (2011). *"Changes in phytochemical, antimicrobial and freeradical scavening activities of the peruvian pepper tree (Schinus molle L.)as influenced by fruit maturation".* Industrial Crop Products, 34, 1622-1628.

Ibañez, F., Torre, P.; Irigoyen, A. (2003). *"Aditivos Alimentarios".*www.nutricion.org/publicaciones/revista-agosto-03/fundacionales/aditivos.pdf.

Ibrahim, B. y Al-Naser, Z. (2014) "*Analysis of fruits Schinus molle extractions and theefficacy in inhibition of growth the fungi in laboratory".* International Journal of ChenTech Research. vol. 6 , Nº5, 2799-2806.

Ismail, S. A. S.; Deak, T.; Abd El-Rahman, H. A.; Yassien, M. A. M.; Beuchat, L. R. (2000). "*Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature"*. Int. J. Food Microbiology. 2000, 62, 113-121.

ISO 959-1: 1998 (E) 2º Edisión.

Jennings, W. G. And Bernhard, R. A., (1975). Identification of Components of the Essential Oil from the California Pepper Tree (Schinus molle L.). Chem. Microbial. Technol. Lebensm. 4, 95-96.

Kalemba D., Kunicka A. (2003) *"Antibacterial and antifungal Properties of Essentials oil"* Current Medical Chemistry. 10, 813–829.

Kampelmacher, E. (1983) *"La salmonelosi responsible de intoxicaciones alimentarias. Métodos de prevención para reducir la incidencia de las salmonellae y armonización de los métodos de investigación mediante su normalización"*. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2 (4) 977-995.

Karpinska M., Borowski J. y Danowaska-Oziewicz M. (2001) *"The use of natural antioxidants in ready-to-serve food".*Food Chemistry. 72, 5-9.

Kasimala, M. y Kasimala, B. (2012). *"A review on brazilian pepper plant: Schinus molle".* Journal of Atoms and Molecules, 2 (2), 6-13.

Kramer, F. (1957).*"The pepper tree, Schinus molle".*Economic Botany, 11 (4), 322-326.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Kumar, U., Kumar . B., Bhandai, A. y Kumar Y. (2010) *"Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clave and cardamom".* International Journal of pharmaceutical sciences and research. Vol 1 (12): 138-147.

Lai S., Gray J., Booren A.,CrackelR.y Gill J. (1995) *"Assessemente of-flavor development in restructured chicken nuggets using hexanal and TBARS measurements and sensory evaluation".*J. Sci. Food Agric. 67, 447-452.

Lee, K., Everts, H. y Beyenen, A. (2004). *Essential oils in broiler nutrition".* International Journal of Poultry Science, 3 (12), 738-752.

Li, S., Zhang, Z., Cain, A., Wang, B., Long, M. y Taylor, J. (2005). *"Antifungal activity of camptothecin, trifolin, and hyperoside isolaedfrom Camptotheca acuminate".* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 32-37.

Ljalem, A. y Unnithan C. (2014) *"Chemical composition and antibacterial of essential oil of schinus molle".*Unique Journal of Pharmaceutical and biological Sciences, 02 (01).

Lombardo A. (1979). "*Plantas medicinales de la flora indígena".* En: Almanaque del Banco de Seguros del Estado: 162-171.
http://www.bse.com.uy/almanaque/datos/Almanaque%201979/pdf/0%20-%20042.pdf.

Lopes-Malo, A., Alzamora, S. y Argaiz, A. (1997). *"Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperatura on Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus ochraceus ans Aspergillus parasiticus growth".* Food Microbiology, 14, 117-124.

López-Malo, A.; Alzamora, S. M.; Palou, E. (2002). *"Aspergillus flavus doce-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials". Int. J. Food Microbiology*, 73, 231-218

Maffei Máximo, (1990). Essential oil from *Schinus molle* L. Berries and Leaves. Flavour and Fragance Journal, vol. 5, 49-52.

Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V. y Parker, M. (2006). *"Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions".* International Journal of Food Microbiology, 107, 180-185.

Maroungiu, B., Porcedda, A., Casu, R. y Pierucci, P. (2004). *"Chenical composition of the oil and supercritical CO_2 extract of Schinus molle L.".*Flavour and Fragance Journal, 19, 554-558.

Martínez Silvia María, Andrade Daniel José (2006) Guía de árboles nativos de la provincia de Salta. Noreste Argentino. Pág. 164. 1º edición. Secretaría de cultura de la provincia de Salta. Dirección de acción cultural.

Martino, T., Leyva, V., Puig, Y., Machin, M., Aportela, N. y Ferre, Y. (2010) *"Bacillus cereus y su implicación en la industria delos alimentos. Parte I"*. Revista Cubana de salud Pública, 36 (1) 128-129.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Mau. J., Chen. C. y Hsieh. P. (2001) *"Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and corni fructus".*Journals Agricultura and Food Chemistry, 49, 183-188.

Medawa, W., Strehaiano, P. y Délia, M. (2003). *"Yeast growth: lag phase modelling alcoholic media".* Food Microbiology, 20, 527-532.

Medina de Días R., Dupertuis L., Amadio C., Dip G., Zimmermann M., Espejo C. y Raimondo E. (2003) *"Aceite esencial de tomillo como antioxidante y conservador en hamburguesas funcionales".* Rev. FCA UNCuyo. Tomo XXXV. Nº2 13-23.

Mila, A. Amaya, S., Iriarte, A., García, V., Carabajal, D. y Sosa, B. (2002). *"efecto del sistema de secado en el color y rendimiento de la oleorresina del pimentón en la variedad Capiscum annum trompa de elefante".* Congreso Regional de Ciencia y tecnología NOA. 1-10.

Milian J. Dimitri. (1998) "Descripción de las plantas cultivadas". Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. 3º Edición, Tomo I, 2ª Volumen, Pág. 700.

Millán, C. (2008). "Las plantas: una opción saludable para el control de plagas". Montevideo, RAPAL-Uruguay.
http://webs.chasque.net/~rapaluy1/publicaciones/Plantas.pdf.

Miller, I., Freund., J. y Johnson, R. (1992). *"Probabilidad y estadística para ingenieros".* Prenntice-Hall Hispanoamericana. 4º edición.

Montes, A. L., C. O. Bandinelli and E. Davison, (1961). *Schinus molle* L. Estudio de la composición de los aceites esenciales obtenidos de las bayas y de las hojas y de la oloerresina extraída de las bayas. (1961). An. Soc. Cient. Argentina, 173: 3-16.

Morales H. (2009) *"Plantas medicinales: Schinus molle Linneo"*
http:/ aceiteesencialdemolle.blogspot.com.

Nasar-Abbas, S. y Halkman, K. (2004). *"Antimicrobial effect of water extract of sumac (Rhus coriaria L.) on the grown of some food borne bacteria including pathogens".* International Journals of Food Microbiology, 97, 63-69.

Navarro García, V., Gonzalez, A., Fuentes, M., Aviles, M., Rios, M., Zepeda, G. y Rojas, M. (2003). *"Antifungal activites of nine traditional Mexican medicinal plants".* Journal Ethnopharmacology, 87, 85-88.

Nguefack, J.; Leth, V.; AmvamZollo P. H.; Mathur, S. B. (2004). *"Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin production fungi". .Int. J. Food Microbiology*, 94, 329-334.

Orav, A., Stulova, I.,Kailas, T. y Muurisepp, M. (2004). *"Effect of storage on the essential oil composition of peper nigum L. fruits of different ripening states*". Journals Agricultura and Food Chemistry, 52, 2582-2586.

Orden, A. (2005). *"Hipótesis: una vía alternativa de regulación de procesos inflamtorios. De la hormesis y la inflamación".* Medicina, vol. 65, Nº 1 , 87-88.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Organización Mundial de la Salud(1962), Serie de Informes Técnicos: Evaluación de la toxicidad de diversos antimicrobianos y antioxidantes. Informe No. 228.

Ouattara, B., Simard, R., Holley, R., Piette, G. y Bégin, A. (1997). *"Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms".* International Journals Food Microbiology, 37, 155-162.

Padin, E., Pose, G. y Pollio, M.L. (2005) *"Oleorresinas como antimicrobianos de origen natural y su potencial empleo en productos cárnicos".* La Industria Cárnica Latinoamericana. Nº137, 46- 48.

Padin, E., Pose, G. y Pollio, M.L. (2007) *"Antibacterial activity of oleorresin fron Aguaribay (Schinus molle L.).*Journal of Food Technology, 5 (1), 5-8.

Padin, E. y Pollio M.L. (2009). *"Aceites esenciales y oleorresinas- Nueva generación de aditivos naturales".* Industria Alimentaria, 79, 54-56.

Pérez Davison, G., Restrepo Manrique, R. y Martínez Sánchez, G. (2009). *Hormesis: antecedentes e implicaciones en los sistemas biológicos".* Latín American Journal of Pharmacy, 28 (6), 954-960.

Piñero M., Ferrer M., Moreno L., Leidenz N., Parra K. y Araujo. (2005) *"Atributos sensoriales y químicos de un producto cárnico ligero formulado con fibra soluble de avena".* Revisata científica, FCV-LUZ. Vol. XV, Nº3, 279-285.

Pitt, J. I.; Hoching, A.D. Yeasts. (1997). "*Fungi and food spoilage"*. Second edition. Publisher: Blackie Academic and Professional, an imprint Chapman & hall, 2-6 Boundary Row, London. Vol. 1, 439-443.

Pollio, M.L., Kitic, D., Favetto, G. and Chirife,J. (1998). *"A note about the correct water activity value of saturated potassium nitrate at 25°C".* Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 21, 66-67.

Quintas, C., Lima-Costa, E. y Loureiro-Dias, M. (2000). *"The effect of ethanol on the plasma membrane permeability of spolage yeasts".* Food technology Biotechnology, 38 (1), 47-51.

Quiroga, E., Sampoetro., A. y Vattuone, M. (2001). *"Screening antifungal activities of selectedmedicinal plants".* Journal of Ethnopharmacology, 74, 89-96.

Restaino, L.; Bills, S.; Tscherneff, K.; Lenovich, L. M. (1983). "*Growth charaterirstics of Sacchromyces rouxii isolated from chocolate syrup".*Applied and Environmental Microbiology, 45, 1614-1621.

Ribeiro O., Alva A., Valles J. (2001) "Extracción y Caracterización del Aceite Esencial de Jengibre (*Zingiber officinale*). Revista Amazónica de Investigación Alimentaria. Vol. 1, nº1, p. 38-42.

Roig Fidel Antonio (2002) "Las plantas medicinales y aromáticas de la provincia de Mendoza (Argentina). Aborígenes, exóticas, espontáneas, naturalizadas y cultivadas". Flora medicinal mendocina. Pág. 52, 1º reimpresión. Unv. Nac. De Cuyo- EDIUNC.

Rodríguez, M.; García, D.; Pino, J.; Hernández. L. (1996) *"Actividad antimicrobiana de pimienta dioica. Alimentaria"*. Julio.-Agosto, 107-110.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Rodríguez Sauceda, E. (2011) "*Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortlizas".* Ra Ximhai vol. 7 Nº1 enero-abril.

Ross, S., El-Keltawi, N. y Megalla, S. (1980). *"Antimicrobial activity of some egyptian aromatic plants".*Fitoterapia, 51 (4), 201-205.

Rubeglio, E. y Tesone, S. (2007) *"Escherichia coli O157: H7 presencia en alimentos no cárnicos".* Arch. Argent. Pediatria. 105 (3), 193-194.

Sachetti, G., S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredi, M. Radice and R. Bruni, (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as funtional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. Food Chem., 91: 621-632.

Salamanca Garcia, M. y Sánchez Bermúdez M. (2009). *"Extracción y caracterización de la oleorresina de oregano (Origanum vulgare).* Trabajo final de grado. Universidad de Pereira.

Salo, S. y Wirtanen, G. (2005). *"Disinfectant efficacy on foodborne spoilage yeast strains".* Food and Bioproducts Processing, 83 (C4), 288-296.

Schneebeli, R. y Egli, T. (2013). *"A defined, glucose-limited mineral médium for the cultivation of Listeria spp.".* Applied and Environmental Microbiology, vol. 79, Nº8, 2503-2511.

Schuls, H., Baranska, M.,Quiltzsch, R., Schutze, W. y Losing, G. (2005) *"Characterization of Peppercorn, Pepper oil, and Ppper Oleorresin by Vibraational Spectroscopy Methods"*. Journals of Agricultural and Food Chemistry, 53, 3358-3363.

Singh, A. Dikshit, a. Sharma, M. y Dixit, S. (1980). *"Fungitoxic activity of some essential oils".* Economic Botany, 34 (2), 186-190.

Singh, G., P. Marimuthu, C. Catalan and M. P. del Lamposona, (2004). Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil or pepper and its acetone extrac. J. Sci. Food Agric. 84: 1878-1884.

Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. y Arsenakis, M. (1996). *"Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum Essential oils".* J. Agric. Food Chem, 44, 1202-1205.

Soliman, K. M.; Badeaa, R. I. (2002). *Effect of oil extracted some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi.* Food and Chemical Toxicology, 40, 1669-1675.

Tainter Donna R., Grenis Anthony T. (1993). "Especias y Aromatizantes Alimentarios". Acriba. Zaragoza Cap. 5, 149-151.

Tofolli de Matheos, M. (1982) *"Reseña se la farmacia y la medicina europeas y americanas en la época del descubrimiento de América".* Acta farmacéutica Bonaerense 1 (1): 53-9.

Tortora, G., Funke, B. y Case, Ch. (2007). *"Introducción a la microbiología".* 9a edición, Ed. Panamericana. Capítulo 6.

Ulu H. (2004) *"Effect of wheat flour, whey protein concentrate and soya protein isolateon oxidative processes and textural properties of cooked meatballs"*. Food Chemistry, 87, 523-529.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Vági, E., Simándi, B., Suhajda, A. y Héthelyi, E. (2005). *"Essetial oil composition and antimicrobial activity of Origanun majorana L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide".* Food Research International, 38, 51-57.

Vardar-Unlu, G., Candan, F., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, E., Donmez, E. y Tepe, B. (2003). *"Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and metanol extracts of thymus fish. et mey. var pectinatus (Lamiaceae)".* Jouranl of Agricultural and food Chemistry, 51, 63-67.

Vekiari, S., Protopapadakis, E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, Ch. y Vamvakias, M. (2002). *"Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a cretan lemon variety".* Journal Agricultural and Food Chemistry, 50, 147-153.

Zapata J. y Montenegro L. (2013) *"Comparación sensorial de tres formulaciones de hamburguesas elaboradas a base de Tilapia roja (Oreochromissp.)".*Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. Vol. 11 Nº2 121-129.

Páginas Webs

http://otramedicina.imujer.com/4067/beneficios-de-la-pimienta-negra-para-la-salud

https://sites.google.com/site/historiaalimentacion/el-intercambio-de-alimentos-entre-amrica-y-europa

http://www.fcapital.com.ar

http://www.guayubia.org.uy/monte/anacahuita

http://foro.fuentedepermacultura.org/index.php?topic=905.0

www.dipbot.unicit.it/sistematica_es/Anac_fam.html

www.herbotecnica.com.ar

www.herbotecnica.com.ar

www.ms.gba.gov.ar (Manual de Manipuladores de Alimentos, Ministerio de salud)

www.anmat.gov.ar.

ANEXO I

Características y preparación de los medios de cultivo

Medios de cultivo utilizados con hongos

1) MEA (Agar extracto de malta)

Es el medio más simple para la enumeración y el crecimiento de la mayoría de los hongos y levaduras deteriorantes de alimentos.

La riqueza de su estado nutricional hace que sea muy adecuado para estos microrganismos y su pH relativamente bajo (generalmente pH 5) reduce la posibilidad de la contaminación por bacterias.

Preparación:

20 g de extracto de malta, 1 g de peptona, 20 g de glucosa, 20 g de agar-agar en 1 litro de agua destilada.

Medios de cultivo utilizados con levaduras

2) MEBG (Agar extracto de malta suplementado con glucosa)

Este medio de cultivo es igual al anterior solo con la diferencia que no posee agar-agar.

Preparación:

20 g de extracto de malta, 1 g de peptona, 20 g de glucosa en 1 litro de agua destilada.

Bibliografía

Pitt, J. y Hocking, A. 1997.*"Fungi and food spoilage".* Blackie Academic & professional. London. Cap.4 p.34.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes