

ENSAYOS DE SENSIBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE BURRO Y DE CARVONA EN SALCHICHAS DE VIENA

M. A. Serra ^(*), Y. Tejero ^(*), A. del L. Quiberoni ^(°), A. E. Andreatta ^(#)

^(*) UTN, Fac. Reg. San Francisco. San Francisco, Córdoba, Argentina.

^(°) Instituto de Lactología Industrial (UNL – CONICET). Santa Fe, Argentina.

^(#) UTN, Fac. Reg. San Francisco. CONICET. San Francisco, Córdoba, Argentina.

Resumen Estudios previos, se basaron en examinar la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales de laurel (*Laurus nobilis*), eucalipto (*Eucalyptus cinerea*), burro (*Aloysia polystachya*), limón (*Citrus lemon L.*) y el compuesto puro de la carvona, frente a la cepa *Leuconostoc mesenteroides* MS1, alterante en salchichas tipo Viena, dado el potencial bactericida encontrado en los mismos. Se utilizó la técnica de macrodilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CMB) de los aceites esenciales mencionados y de la carvona. Las CIM y CBM de los diferentes aceites esenciales y de la carvona variaron entre 0,64 y 1,87 mg/ml y entre 0,76 y 2,41 mg/ml, respectivamente. A continuación, se procedió a realizar las pruebas de sensibilidad aceite esencial de burro y de la carvona en la matriz alimentaria. En este sentido, se procedió a utilizar como matriz la salchicha esterilizada a 121°C por 15 minutos; se inoculó la muestra con una concentración inicial de 10³ UFC/g de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y se adicionaron diferentes cantidades de aceite de burro y carvona (0,1 ml y 0,5 ml respectivamente). Se realizó el recuento en placa de la cantidad de células viables a tiempo inicial cero y a 2, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días. Por el momento se ha encontrado que 0,5 ml de carvona en una muestra de 2,5 g de salchicha estéril, es capaz de inhibir a *Leuconostoc mesenteroides* MS1, manteniendo el recuento inicial de células viables en el nivel de 10³ UFC/g.

Palabras claves: *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*, CARVONA, SALCHICHA

1. Introducción

En bibliografía se ha documentado la presencia de bacterias del género *Leuconostoc* en salchichas cocidas envasadas al vacío. En la materia prima (carne cruda) y en las superficies de la planta procesadora se encontró una baja concentración de dicho género, pero en las salchichas cocidas la concentración aumentó en casi un 98% (Hultman y col., 2015). Los microorganismos frecuentemente relacionados con el deterioro de las salchichas envasadas al vacío son las bacterias ácido-lácticas, principalmente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Farias y Villarruel, n.d.). Justamente, el aumento en la concentración de CO₂ que se encuentra en los paquetes durante el almacenamiento puede atribuirse a los subproductos metabólicos de lactobacilos heterofermentativos y *Leuconostoc* (Korkeala y Björkroth, 1997).

Padilla y col. (2015) identificaron las fuentes de *Leuconostoc* en una planta de procesamiento de salchichas tipo Viena evaluando, además, la diversidad genética de las cepas aisladas. Algunas cepas de *Leuconostoc* aisladas de superficies de equipos y de salchichas mostraron el mismo genotipo. Los equipos y las cintas transportadoras se identificaron como fuentes de contaminación de *Leuconostoc* (Padilla-Frausto y col., 2015).

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

Como se sabe, los extractos obtenidos de productos naturales son ampliamente utilizados por sus propiedades antimicrobianas (Hammer, Carson y Riley, 1999). En particular, los aceites esenciales

de plantas son sustancias aromáticas naturales hidrofóbicas obtenidas de diferentes partes de la planta por hidrodestilación, destilación por vapor o técnicas de extracción por solvente. (Burt, 2004)

El uso de extractos naturales para la inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* también está siendo estudiado. En este sentido, Radha Krishnan y col. (2014), han observado el poder inhibitorio de extractos acuosos de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), *Cinnamomum cassia*, *Origanum vulgare* (orégano) y *Brassica nigra* (mostaza negra) y han encontrado, que la concentración mínima inhibitoria fue de 15, 10, 20 y 25 mg/ml para cada uno de los extractos, respectivamente. Por su parte Kivanç y col., (1991) han observado un efecto inhibitorio utilizando orégano y sus aceites esenciales, mientras que demostraron un efecto estimulador con el uso de comino frente al crecimiento de *L. mesenteroides*. A su vez, se encontró que el ácido jasmónico, obtenido en plantas por lipoxigenación del ácido linoléico, posee un efecto inhibitorio sobre estas cepas (Michelena y col., 2005). Por su parte, en el trabajo de Fernández-López y col., (2005) se reportó que el extracto de ajo (Aquaresin® garlic), extracto de limón y el de naranja no presentan inhibición frente a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 824 y *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 882. Por el contrario, extracto acuoso y aceite de romero (Herbalox® Type W), extracto acuoso de romero (Duralox®) y aceite de romero (Herbalox® Type HTO) produjeron inhibición frente a estas dos cepas, siendo mayor el efecto con el aceite de romero.

Los métodos de dilución son los más adecuados para la determinación de los valores CIM, ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano analizando el efecto, tanto en el agar (dilución en agar) como en el medio líquido (macrodilución o microdilución). Al día de hoy, existen diversas pautas aprobadas para la implementación de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Entre ellas, los estándares más reconocidos son proporcionados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y el Comité Europeo sobre Ensayos de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) (Balouiri, Sadiki & Ibsouda, 2016)

En este trabajo se propone determinar la efectividad, en la matriz alimentaria, del aceite esencial de burro y del compuesto puro de carvona, frente a la cepa *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Cabe mencionar que la carvona está en una proporción de 90,2% en el aceite de burro.

2. Materiales y métodos

2.1. Aceites esenciales

El aceite esencial de burro (*Aloysia polystachya*) se obtuvo por la técnica de arrastre con vapor a partir de hojas secadas a temperatura ambiente, utilizando un extractor de aceites esenciales a escala laboratorio marca Figmay con un volumen de la cámara de extracción de 5,6 l, por 120 minutos. Los aceites esenciales se conservan en viales de color ámbar, con tapa a rosca en heladera a 8°C hasta su posterior utilización. R (-) Carvona (Sigma-Aldrich, 98 %) es el compuesto puro que, además del aceite esencial de burro, fue evaluado en este trabajo y se corresponde al compuesto mayoritario de dicho aceite.

2.2. Actividad antibacteriana de los extractos

Preparación de inóculo. La cepa fue aislada de salchichas tipo Viena que presentaron hinchazón del envase, conservadas a temperatura de refrigeración. Se procedió a su tipificación bioquímica y molecular, esta última mediante la identificación de microorganismos por secuenciación de un fragmento del gen que codifica el 16S rRNA. Se utiliza como medio de cultivo para su desarrollo y conservación MRS (de Man, Rogosa and Sharpe). La cepa en estudio se conserva en MRS con glicerol al 10% y lactosa al 1%, a una temperatura de - 18 °C. Se realiza la siembra en medio de cultivo líquido y se incuba en estufa a 30°C por 48 h. Transcurrido ese tiempo se siembra, por estriado, en placa con medio de cultivo agarizado y se incuba nuevamente a 30°C por 48 h. Las colonias aisladas que presentan mayor desarrollo son utilizadas para preparar el inóculo estandarizado. Este último se prepara siguiendo el método de suspensión directa de colonias en solución salina (NaCl al 8,5 %) para obtener una densidad de 0,5 en la escala de Mc Farland, que, se corresponde, aproximadamente, con una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

Determinación de CIM y CMB. En estudios previos se determinó la sensibilidad del *Leuconostoc mesenteroides* MS1 frente a diferentes extractos (Serra, Garnero, Nicolau, & Andreatta, 2018).

Aceites esenciales de laurel, limón, burro y *Eucalyptus cinerea*, concentraciones de eugenol/aceite vegetal mayores al 18,5 % (m/m), hidroquinona 0,75 % (m/v) y aceites esenciales comerciales de lavanda, menta y geranio, han mostrado efecto bactericida frente al *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Posteriormente, se procedió a determinar las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de los aceites de laurel, limón, burro, *Eucalyptus cinerea* y carvona (Serra, y col., 2018) Para este procedimiento, se utilizó la técnica de macrodilución en caldo reportada por Araujo y col. (2018) con algunas modificaciones. En este sentido, se procede a la preparación de una serie de tubos con caldo MRS a los cuales se les agrega el antimicrobiano en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar a 30° C en estufa de cultivo por 48 h y se determina la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado.

2.3. Preparación de la muestra

A continuación, se procede a realizar las pruebas de sensibilidad del aceite esencial de burro y de la carvona en la matriz alimentaria. En ese sentido, se procede a cortar las salchichas, de un paquete de salchicha comercial, en rodajas de aproximadamente 2,5 g cada una. Se colocan en un Erlenmeyer, se tapa con algodón y papel aluminio y se esteriliza por 15 minutos a 121°C. Transcurrido ese tiempo se colocan cada una de las muestras, en condiciones asépticas y trabajando bajo campana de flujo laminar, en bolsas estériles. Se inoculan cada una con 0,2 ml de una dilución del cultivo *overnight* (obteniendo una concentración inicial de 10^3 UFC/g) y se adiciona 0.1 ml ó 0.5 ml de aceite esencial de burro o carvona según corresponda. Como controles de estos ensayos, se establecen los siguientes: (i) la muestra de salchicha estéril, (ii) la muestra de salchicha estéril con agregado de antimicrobiano y sin inocular y (iii) la muestra de salchicha estéril inoculada sin agregado de antimicrobiano. Todas las bolsas plásticas que contienen las muestras se conservan en refrigeración a 4°C hasta que se realice el análisis microbiológico a los diferentes tiempos: inicial a tiempo cero, a 2, 14, 21, 28, 35 y 42 días (Pesavento y col., 2015).

2.4. Análisis microbiológico

Los análisis microbiológicos, a cada una de las muestras se realizan, por duplicado. Cada muestra se homogeniza manualmente por 1 minuto con 25 ml de agua de peptona y luego se prepara una serie de diluciones decimales. Las siembras se realizan en superficie en placas de Petri con MRS agarizado (Šojić y col., 2015), incubando 48 h a 30°C. Como se describió antes, se realiza este recuento al tiempo inicial y a los días mencionados en el párrafo anterior.

3. Resultados

3.1. Actividad antibacteriana de los extractos

La CIM del aceite esencial de burro y del compuesto puro de la carvona se encontró entre los valores 0,63 y 0,67 mg/ml mientras que la CBM de los mismos se encontró entre los valores 0,74 y 0,79 mg/ml. A partir de los valores obtenidos podemos decir que ambos agentes antimicrobianos presentaron valores bajos de CIM y CBM, lo que significa que son buenos inhibidores/bactericidas frente a la cepa *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Es esperable que el aceite esencial de *Aloysia polystachya* y la carvona presenten similares comportamientos, dado que este último es el compuesto mayoritario, del aceite esencial de burro.

3.2. Análisis microbiológico

Como se dijo anteriormente, la concentración inicial del inóculo es del orden de 10^3 UFC/g. Respecto de los controles: (i) en la salchicha estéril y (ii) en la salchicha estéril con agregado de antimicrobiano y sin inocular, no se observó desarrollo durante los experimentos, mientras que en el control (iii) la muestra de salchicha estéril inoculada sin agregado de antimicrobiano, se observó un incremento en los recuentos hasta un orden de 10^8 UFC/g, que se mantiene hasta el recuento en el día 42 (Figura 1). Las muestras que fueron adicionadas con 0,1 ml de aceite esencial de burro y 0,1 ml de carvona presentan un desarrollo similar a la muestra inoculada que se tiene como control;

es decir, que el desarrollo llega a un valor de 10^7 UFC/g (Figura 1) Por su parte, en las muestras con 0,5 ml de aceite esencial de burro, el recuento de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 se incrementó solamente hasta 10^4 UFC/g, disminuyendo nuevamente a 10^3 UFC/g en el día 42. En las muestras conteniendo 0,5 ml de carvona, se evidenció un mantenimiento de la concentración inicial inoculada en el orden de 10^3 UFC/g (Figura 1).

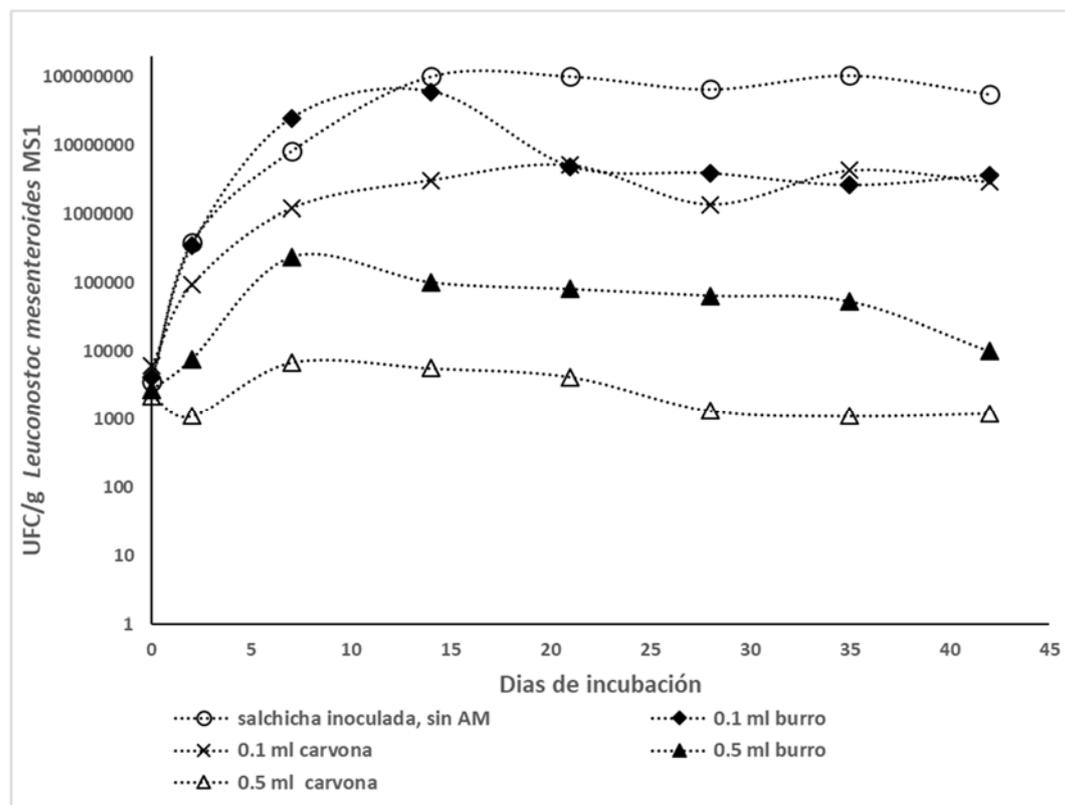


Fig. 1. Comparación entre los recuentos de las muestras inoculadas con el agregado de 0,1-0,5 ml de aceite esencial de burro y 0,1-0,5 ml de carvona con el control de la salchicha estéril inoculada sin agregado de antimicrobiano (AM)

4. Conclusiones

Con esta investigación, se verifica que el aceite esencial de burro y el compuesto puro de la carvona, utilizados como antimicrobianos naturales, representan una alternativa a los conservantes alimentarios comunes de síntesis química para inhibir *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

Reconocimientos

Los autores de este trabajo agradecen a la UTN (PID UTI4771TC), CONICET (PIP 0941-CONICET), FONCyT (PICT2016-3041) y Mincyt de la Provincia de Córdoba (PID 2018) de Argentina por ayuda económica recibida.

Referencias

- Araújo, M. K., Gumiela, A. M., Bordin, K., Luciano, F. B., & Macedo, R. E. F. de. (2018). Combination of garlic essential oil, allyl isothiocyanate, and nisin Z as bio-preservatives in fresh sausage. *Meat Science*, 143(January), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.05.002>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Food Microbiology*, 22(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Diez, A. M., Jaime, I., & Rovira, J. (2009). The influence of different preservation methods on spoilage bacteria

- populations inoculated in morcilla de Burgos during anaerobic cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2–3), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.019>
- Farias, C., & Villarruel, N. (n.d.). Parámetros biocinéticos de BAL tras la reproducción del deterioro de salchichas empacadas al vacío, 1–4.
- Fernández-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pérez-Alvarez, J. A., & Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: Application in beef meatballs. *Meat Science*, 69(3), 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.004>
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985–990. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>
- Hultman, J., Rahkila, R., Ali, J., Rousu, J., & Björkroth, K. J. (2015). Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged cooked sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7088–7097. <https://doi.org/10.1128/AEM.02228-15>
- Kivanç, M., Akgül, A., & Doğan, A. (1991). Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Food Microbiology*, 13(1), 81–85. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90140-K](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90140-K)
- Korkeala, H. J., & Björkroth, K. J. (1997). Microbiological Spoilage and Contamination of Vacuum-Packaged Cooked Sausages. *Journal of Food Protection*, 60(6), 724–731.
- Michelena, G., Almeida, G., Altuna, B., Eng, F., Legrá, S., & Oliveros, M. (2005). Efecto inhibitor del ácido jasmónico sobre el crecimiento de bacterias y hongos. *Redalyc*, 6.
- Padilla-Frausto, J. J., Cepeda-Marquez, L. G., Salgado, L. M., Iturriaga, M. H., & Arvizu-Medrano, S. M. (2015). Detection and Genotyping of *Leuconostoc* spp. in a Sausage Processing Plant. *Journal of Food Protection*, 78(12), 2170–2176. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-192>
- Pesavento, G., Calónico, C., Bilia, A. R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., ... Lo Nostro, A. (2015). Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54, 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.045>
- Radha Krishnan, K., Babuskin, S., Azhagu Saravana Babu, P., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G., ... Sukumar, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.011>
- Serra, M., Garneró, J., Nicolau, V., & Andreatta, A. E. (2018). Assessment of natural vegetal extracts in the inhibition of *Leuconostoc mesenteroides* MS1, 35, 51–62.
- Serra, M., Pairone, M., Testa, A., & Pisani, F. (n.d.). Actividad antibacteriana de aceites esenciales y R (-) carvona frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1, (2018).
- Šojić, B., Tomović, V., Kocić-Tanackov, S., Škaljac, S., Ikončić, P., Džinić, N., Kravić, S. (2015). Effect of nutmeg (*Myristica fragrans*) essential oil on the oxidative and microbial stability of cooked sausage during refrigerated storage. *Food Control*, 54, 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.007>