

Efectos antimicrobianos de aceites esenciales de *Laurus nobilis* y *Eucalyptus cinerea* aplicados en salchichas tipo Viena, inoculadas con *Leuconostoc mesenteroides* MS1

Antimicrobial effects of essential oils of *Laurus nobilis* y *Eucalyptus cinerea* applied in Vienna sausages inoculated with *Leuconostoc mesenteroides* MS1

Mónica A. Serra

Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional San Francisco, Córdoba, Argentina
monicaserra@hotmail.com

Andrea del L. Quiberoni

Instituto de Lactología Industrial (UNL – CONICET).1 de mayo 3250. Santa Fe, Argentina
aquibe@fiq.unl.edu.ar

Alfonsina E. Andreatta

Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional San Francisco - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Córdoba - Argentina
alfonsinaandreatta@hotmail.com

Resumen

En este trabajo, se procedió a realizar pruebas de sensibilidad de los aceites esenciales de *Laurus nobilis* (laurel) y *Eucalyptus cinerea* (eucalipto medicinal) en la matriz alimentaria. En este sentido, se procedió a utilizar como matriz la salchicha tipo Viena esterilizada a 121°C por 15 minutos; se inoculó la muestra con una concentración inicial de 10^3 UFC/g de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y se adicionaron 0.5 mL de aceite de laurel o eucalipto. Se realizó el recuento en placa de la cantidad de células viables a tiempos 0, 2, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días. Se ha encontrado que 0,5 ml tanto de uno como de otro aceite en una muestra de 2,5 g de salchicha estéril, es capaz de inhibir a *Leuconostoc mesenteroides* MS1, manteniendo el recuento inicial de células viables en el nivel de 10^3 UFC/g. Comparando con estudios previos realizados, ambos aceites podrían ser utilizados como antimicrobianos en salchichas tipo Viena.

Palabras clave: *Laurus nobilis*, *Eucalyptus cinerea*, *Leuconostoc mesenteroides*, salchichas tipo Viena

Abstract

In this work, sensitivity tests of the essential oils of *Laurus nobilis* (laurel) and *Eucalyptus cinerea* (medicinal eucalyptus) were carried out in the food matrix. In this sense, the Vienna sausage sterilized at 121 ° C for 15 minutes was used as a matrix; the sample was inoculated with an initial concentration of 10³ CFU/g of *Leuconostoc mesenteroides* MS1 and 0,5 mL of laurel or eucalyptus oil were added. The number of viable cells was plaque counted at times 0, 2, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days. It has been found that 0.5 ml of both oil in a sample of 2,5 g of sterile sausage is capable of inhibiting *Leuconostoc mesenteroides* MS1, maintaining the initial viable cell count at the level of 10³ CFU/g. Comparing with previous studies carried out, both oils could be used as antimicrobials in Vienna sausages.

Keywords: *Laurus nobilis*, *Eucalyptus cinerea*, *Leuconostoc mesenteroides*, salchichas tipo Viena

Introducción

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

Tradicionalmente, el control de microorganismos en los alimentos se ha demostrado mediante pruebas microbiológicas de muestras en varias etapas de producción, incluido el producto final. El potencial de crecimiento y / o producción de toxinas de la población microbiana residual en productos terminados depende del tipo de organismos presentes y su capacidad de crecer hasta un nivel de preocupación, bajo las condiciones de almacenamiento aplicadas durante la vida útil del producto (Aiyegoro, 2014).

En la bibliografía se ha documentado la presencia de bacterias del género *Leuconostoc* en salchichas cocidas envasadas al vacío. En la materia prima (carne cruda) y en las superficies de la planta procesadora se encontró una baja concentración de dicho género, pero en las salchichas cocidas la concentración aumentó en casi un 98% (Hultman y coll., 2015).

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

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

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

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

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*) y el compuesto puro L-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 L-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. En este trabajo se propone determinar la efectividad, en la matriz alimentaria, del aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) y de *Eucalyptus cinerea* (eucalipto medicinal), frente a la cepa *Leuconostoc mesenteroides* MS1.

Desarrollo

Aceites esenciales

Los aceites esenciales de *Laurus nobilis* y *Eucalyptus cinerea* han sido obtenidos por la técnica de arrastre con vapor de agua a partir de hojas secadas a temperatura ambiente, utilizando un extractor de aceites esenciales, a escala laboratorio, marca Figmay, a 100°C y presión atmosférica por un lapso de tiempo de 120 minutos. El material vegetal, utilizado como materia prima, se recolectó de plantas de la ciudad de San Francisco, departamento San Justo, provincia de Córdoba. Los aceites esenciales se conservaron en viales de color ámbar, con tapa a rosca en heladera a 6°C hasta su posterior utilización.

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 utilizó como medio de cultivo para su desarrollo y conservación MRS (de Man, Rogosa and Sharpe). La cepa en estudio se conservó en MRS con glicerol al 10% y lactosa al 1%, a una temperatura de - 18 °C.

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

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

Trascurrido el tiempo de incubación, se toma la dilución cuyo recuento sea de aproximadamente de 10² UFC/mL. Se toman 0,2 mL de ésta y se procede a la inoculación de las muestras de salchichas esterilizadas previamente. Se obtiene una concentración final de 10³ UFC/g, como se puede apreciar en el cálculo siguiente. Esta parte del trabajo se basó en (Dussault et al., 2014) pero con adaptaciones al producto en estudio.

Preparación de la muestra. A continuación, se procedió a realizar las pruebas de sensibilidad del aceite esencial de laurel y de eucalipto medicinal en la matriz alimentaria. En ese sentido, se procedió a cortar las salchichas, de un paquete de salchicha comercial, en rodajas de aproximadamente 2,5 g cada una. Se colocaron en un Erlenmeyer, se

tapó con algodón y papel aluminio y se esterilizó por 15 minutos a 121°C. Transcurrido ese tiempo se colocaron cada una de las muestras, en condiciones asépticas y bajo campana de flujo laminar, en bolsas estériles. Luego, se inocularon cada una con 0,2 ml de una dilución del cultivo *overnight* de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y se adicionó 0,5 mL de aceite esencial de laurel o de eucalipto medicinal según corresponda. Se conservaron en heladera, hasta los 42 días que dura el experimento. Cabe mencionar que la cantidad adicionada de aceites esenciales, surge como resultado de ensayos previos. En estos últimos, hemos adicionado 0,1 mL y 0,5 mL de aceite esencial de *Aloysia polystachya* y el compuesto puro L-carvona, y en el primero de los casos el desarrollo del microorganismo en estudio fue del mismo orden que la muestra control. En cambio, al adicionar 0,5 mL los recuentos se mantuvieron en el mismo orden que la inoculación inicial.

Análisis microbiológico. Se realizó el recuento en placa a los 0, 2, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 1. Como controles de estos ensayos, se establecen los siguientes: i) la muestra de salchicha estéril, ii) la muestra de salchicha estéril con aceite esencial sin inóculo, iii) la muestra de salchicha estéril sin aceite esencial con inóculo. Cabe aclarar que el primer control es para verificar el proceso de esterilización, el segundo control es para verificar la carga bacteriana inicial del aceite esencial y el tercer control es para verificar el crecimiento del inóculo.

| días | Salchicha inoculada, sin AM | 0,5 mL de laurel | 0,5 mL de eucalipto medicinal |
|------|-----------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 0 | $3,63 \times 10^3$ | $1,10 \times 10^3$ | $2,20 \times 10^3$ |
| 2 | $3,85 \times 10^5$ | $3,96 \times 10^3$ | $3,52 \times 10^3$ |
| 7 | $8,14 \times 10^6$ | $1,79 \times 10^3$ | $3,85 \times 10^3$ |
| 14 | $1,00 \times 10^8$ | $1,23 \times 10^3$ | $2,75 \times 10^3$ |
| 21 | $1,00 \times 10^8$ | $9,90 \times 10^2$ | $2,08 \times 10^3$ |
| 28 | $6,49 \times 10^7$ | $1,01 \times 10^3$ | $1,34 \times 10^3$ |
| 35 | $1,03 \times 10^8$ | $1,05 \times 10^3$ | $1,29 \times 10^3$ |
| 42 | $5,50 \times 10^7$ | $9,68 \times 10^2$ | $1,14 \times 10^3$ |

Tabla 1. Recuentos de UFC/g de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 en salchicha inoculada sin adición de antimicrobiano y en muestras de salchicha inoculada y con adición de 0,5 mL de aceite esencial de *L. nobilis* o de 0,5 mL de aceite esencial de *E. cinerea*

Como se puede apreciar en la Fig. 1, la adición de 0,5 ml de aceite esencial de *L. nobilis* o la adición de *E. cinerea*, lograron que la concentración de UFC/g de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 se mantenga en el orden de 10^3 .

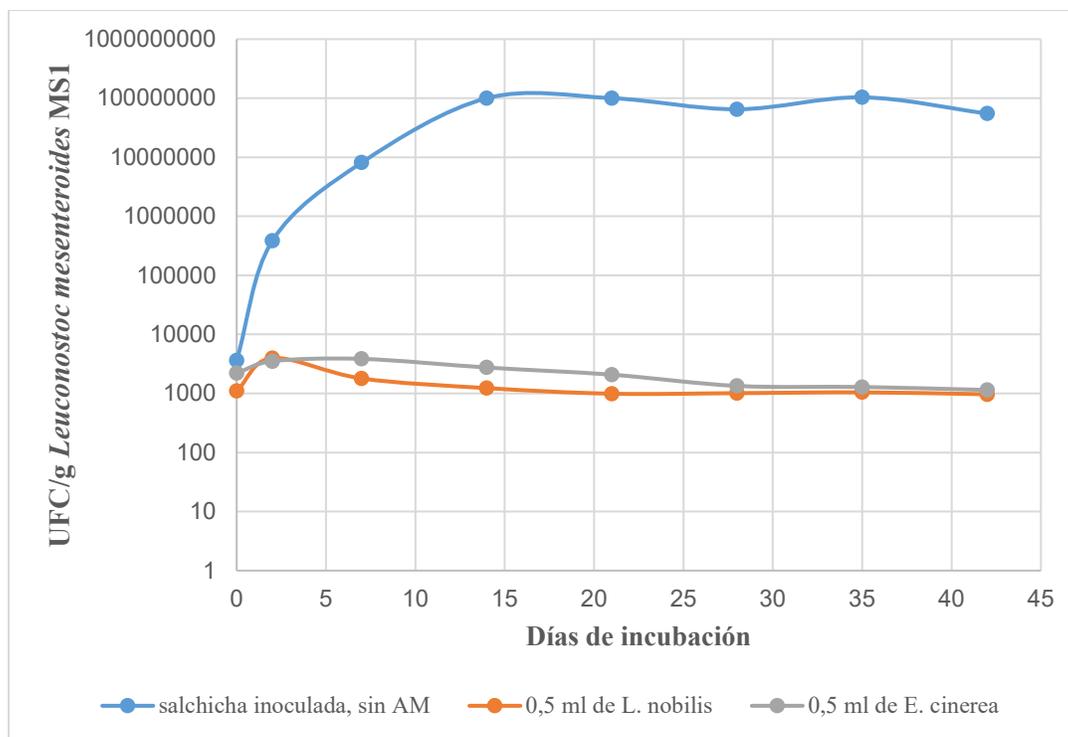


Figura 1. Comparación entre el recuento en placa de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 en salchichas inoculadas y sin agregado de aceite esencial, respecto de las salchichas inoculadas y con agregado de 0,5 mL de aceite esencial de *L. nobilis* o *E. cinerea*

Conclusiones

De acuerdo a los resultados de los recuentos de células viables, podemos ver que tanto con el agregado de 0,5 mL de aceite esencial de *L. nobilis*, como con el agregado de 0,5 mL de aceite esencial de *E. cinerea*, los recuentos se mantienen en el orden de 10^3 UFC/g de *Leuconostoc mesenteroides* MS1. Respecto a los controles, cabe mencionar que la muestra de salchicha estéril y la muestra de salchicha estéril con aceite esencial, no presentaron desarrollo durante todo el experimento. Por su parte la muestra de salchicha estéril sin aceite esencial inoculada con *Leuconostoc mesenteroides* MS1 tuvo su desarrollo hasta un valor máximo de 10^8 UFC/g desde el día 14 hasta el día 42.

Se puede concluir con este trabajo, que los aceites esenciales de *L. nobilis* y *E. cinerea* podrían ser utilizados como potenciales antimicrobianos de la cepa en estudio. Se continúa trabajando para poder incorporar los aceites esenciales estudiados, por aspersión, previo al envasado en salchichas tipo Viena, para evitar su deterioro previo a la fecha de caducidad. Como complemento a esta etapa, se debe realizar el análisis sensorial, con un panel entrenado, del producto en estudio con el agregado de diferentes cantidades de los aceites esenciales de *Laurus nobilis* y *Eucalyptus cinerea*.

Posteriormente, se deben realizar ensayos de toxicidad, para comprobar si los aditivos estudiados en las concentraciones usadas, son aptos para consumo humano. En el Código Alimentario Argentino están aprobados, para utilizar como aditivos en alimentos, los aceites de laurel y de eucalipto.

Referencias

- Aiyegoro, O. A. (2014). Microbial Contamination of Processed Meat. In *Encyclopedia of Meat Sciences* (Vol. 2). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00249-X>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review.

International Journal of Food Microbiology, 94(3), 223–253.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

Davidson, P. M., Cekmer, H. B., Monu, E. A., and Techathuvanan, C. (2014). The use of natural antimicrobials in food: An overview. In *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (Issue 3). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034-7.00001-3>

Dussault, D., Vu, K. D., and Lacroix, M. (2014). In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Science*, 96(1), 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.015>

Hammer, K. A., Carson, C. F., and 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., and 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>

Lulietto, M. F., Sechi, P., Borgogni, E., and Cenci-goga, B. T. (2015). Meat Spoilage : A Critical Review of a Neglected Alteration Due to Ropy Slime Producing Bacteria. *Italian Journal of Animal Science*, 14.
<https://doi.org/10.4081/ijas.2015.4011>

Militello, M., Settanni, L., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G., Giammanco, G. M., Blàzquez, M. A., Carrubba, A., Bla, M. A., Blàzquez, M. A., and Carrubba, A. (2011). *Chemical Composition and Antibacterial Potential of Artemisia arborescens L . Essential Oil*. 62(4), 1274–1281. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9855-3>

Settanni, L., Palazzolo, E., Guarrasi, V., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G., and Germanà, M. A. (2012). *Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily*. Food Control. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.050>

Settanni, L., Randazzo, W., Palazzolo, E., Moschetti, M., Aleo, A., Guarrasi, V., Mammina, C., San Biagio, P. L., Marra, F. P., Moschetti, G., and Germanà, M. A. (2014). *Seasonal variations of antimicrobial activity and chemical composition of essential oils extracted from three Citrus limon L. Burm. cultivars*. 28(6), 383–391. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.871544>