



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y APLICACIÓN
COMO INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO MICROBIANO
EN PRODUCTOS CÁRNICOS**

**TRABAJO DE GRADUACION PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS**

AUTOR:

ALONDRA MARIELA IDROVO ENCALADA

DIRECTORA:

DRA. MARIA ELENA CAZAR RAMÍREZ

CUENCA, ECUADOR

2008

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis queridos Padres, quienes durante todos estos años me apoyaron, confiaron en mí y fueron el pilar fundamental en mi vida estudiantil.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. María Elena Cazar por ser quien me ha brindado sus conocimientos de una manera desinteresada.

De igual manera quiero expresar mi agradecimiento al Dr Piercosimo Tripaldi por su ayuda en la realización del diseño experimental.

También agradezco a la Ing. María Fernanda Rosales, Ing. Mónica Tinoco, Ing. Ximena Orellana, Tec. Diego Vidal, quienes conforman el personal de los Laboratorios de la Universidad del Azuay, que gracias a ellos he podido culminar mi trabajo de graduación.

Resumen

El propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto de mezclas de aceites esenciales como inhibidores del crecimiento de microorganismos en productos cárnicos. Se seleccionaron tres especies vegetales con potencial antimicrobiano: *Rosmarinus officinalis* (romero), *Ocimum basilicum* (albahaca), y *Cuminum cyminum* (comino), de las cuales se obtuvieron aceites esenciales, mediante un diseño de mezclas se desarrollaron 7 preparaciones, que fueron evaluadas como preservantes en preparados cárnicos (hamburguesas). Se realizaron ensayos de evaluación de crecimiento de bacterias totales, coliformes, enterobacterias y bacterias anaerobias. Con los datos obtenidos se determinaron las mezclas que inhibieron el crecimiento de microorganismos. Las mezclas con mejor bioactividad fueron evaluadas mediante análisis sensorial

Abstract

The aim of the present work was to evaluate the effect of essential oils mixtures as microorganism's growth inhibitors in meat products. Essential oils from *Rosmarinus officinalis* (rosemary), *Ocimum basilicum* (basil), and *Cuminum cyminum* (cummin) were tested as antimicrobial agents using mixture design techniques. Total bacteria, coliforms, enterobacteria and anaerobic bacteria were evaluated in hamburgers prepared with seven different essential oils mixtures applied as preservers. The evaluation of the antimicrobial effect allowed us to identify the mixtures which inhibited the microorganism's growth. Moreover, a sensorial analysis was performed with the bioactive mixtures.

INDICE DE CONTENIDOS

Contenidos	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Índice de contenidos.....	vi
Índice de cuadros y figuras.....	vii
Índice de anexos.....	viii
Introducción.....	1
CAPITULO 1. ACEITES ESENCIALES	
1.1 Concepto y generalidades.....	3
1.2 Clasificación de los aceites esenciales.....	6
1.3 Propiedades de los aceites esenciales.....	6
1.4 Métodos de extracción.....	7
1.4.1 Destilación con agua o hidrodestilación.....	8
1.4.2 Destilación por arrastre con vapor.....	9
1.4.3 Destilación con agua-vapor.....	10
1.4.4 Destilación previa maceración.....	10
1.4.5 Destilación sometida a una degradación térmica.....	10
1.4.6 Expresión.....	11
1.5 Usos y aplicaciones de los aceites esenciales en la industria.....	11
1.6 Actividad antiséptica y bactericida de los aceites esenciales.....	12
1.7 Ventajas del uso de aceites esenciales en productos cárnicos.....	12

CAPITULO II. ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS

2.1 Romero.....	13
2.1.1 Descripción Botánica.....	13
2.1.2 Composición.....	14
2.1.3 Propiedades.....	14
2.2. Comino.....	15
2.2.1. Descripción Botánica.....	15
2.2.2 Composición.....	15
2.2.3 Propiedades.....	16
2.3. Albahaca.....	16
2.3.1. Descripción Botánica.....	16
2.3.2. Composición.....	17
2.3.3 Propiedades.....	17

CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Esquema de actividades.....	19
3.2 Preparación del material vegetal.....	20
3.3 Obtención de aceites esenciales por el método de arrastre de vapor.....	21
3.3.1 Materiales.....	21
3.3.2 Procedimiento.....	21
3.3.3 Obtención del aceite de comino.....	22
3.4 Diseño de mezclas.....	22
3.4.1 Generalidades del diseño experimental.....	22
3.4.2 Diseño de mezclas.....	23
3.4.3 Evaluación del diseño.....	25
3.5. Elaboración de hamburguesas.....	26
3.5.1 Formulación.....	26
3.5.2 Diagrama de bloques del proceso.....	26
3.5.3 Descripción del proceso.....	27
3.6 Análisis microbiológico de las muestras.....	27

3.7 Análisis sensorial de las muestras.....	29
3.7.1 Generalidades del análisis sensorial.....	29
3.7.2 Pruebas afectivas.....	30

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación microbiológica del producto terminado.....	32
4.2 Selección del modelo que optimiza las mezclas de aceites esenciales como preservantes de productos cárnicos.....	33
4.3 Validación de los modelos obtenidos.....	34
4.3.1 Comparación entre modelos: optimización.....	35
4.4. Superficies de respuesta para los modelos obtenidos.....	37
4.5 Resultados del análisis sensorial.....	43

CONCLUSIONES.....	45
--------------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA.....	47
--------------------------	-----------

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Fracciones para los diseños simplex cuadráticos de tres componentes.....	23
Cuadro 2: Resultados de cuantificación de microorganismos para hamburguesas preparadas según esquema de diseño de mezclas.....	32
Cuadro 3: Resultados de la comparación entre modelos de 1ero, 2do y 3er orden mediante la prueba F.....	36
Figura 1: Variedad de los componentes de aceites esenciales.....	5
Figura 2: Diseño de mezclas: a) modelo lineal, b) modelo cuadrático.....	23
Figura 3: Resultados de la evaluación sensorial del producto terminado.....	43

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medios de cultivo.....	50
Anexo 2 Ficha para la evaluación sensorial.....	51

Idrovo Encalada Alondra Mariela

Trabajo de graduación

María Elena Cazar Ramírez

mayo, 2008

EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y APLICACIÓN COMO INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN PRODUCTOS CÁRNICOS

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son productos químicos obtenidos de plantas y vegetales por una destilación denominada arrastre de vapor. Los aceites esenciales son líquidos volátiles en su mayoría solubles en alcohol y éter, aceites vegetales y minerales, por lo general no oleosos al tacto. Los aceites esenciales son usados como condimentos o para la producción industrial de cosméticos, perfumes, alimentos o con propósitos medicinales.

La causa fundamental de alteración de los alimentos, y el factor que limita la vida útil de muchos de ellos, son los microorganismos (bacterias, levaduras, hongos).

El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para fabricantes como para distribuidores y consumidores. Por otra parte los alimentos alterados pueden resultar muy perjudiciales para la salud humana. Es por esto que existen razones poderosas para evitar la alteración de los alimentos, de ahí deriva la importancia de la utilización de conservantes.

El metabolismo secundario vegetal genera una serie de moléculas con actividades biológicas diversas. Para defenderse del ataque de patógenos, las plantas generan compuestos antimicrobianos los cuales presentan ciertos mecanismos para interferir con el crecimiento y multiplicación de bacterias y hongos. Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales, conocidos como terpenoides, actúan en el metabolismo vegetal como antibióticos, y se producen en respuesta al ataque de microorganismos (Buchanan, 2000).

Estos compuestos no generan los efectos indeseables de los productos químicos utilizados como inhibidores del crecimiento de microorganismos.

Entre estas sustancias podemos señalar a los aceites esenciales. No hay evidencia sobre algún efecto dañino de las plantas sobre la salud humana, en las cantidades que son consumidos mas bien tienen efectos beneficiosos.

Las plantas tienen valor económico accesible y un gran impacto social en el bienestar de la humanidad. La aplicación de productos naturales como preservantes de alimentos es un campo promisorio, pues estas sustancias aplicadas en dosis correctas son inocuas y efectivas.

El presente trabajo de investigación se formula en base a la siguiente hipótesis:

“Los aceites esenciales de plantas aromáticas tienen propiedades antimicrobianas. La mezcla de estas sustancias puede ejercer un efecto preservante en productos cárnicos”

Para probar la presente hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de mezclas de aceites esenciales como inhibidores del crecimiento de microorganismos en productos cárnicos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Seleccionar tres aceites esenciales con potencial antimicrobiano.
- Extraer los aceites esenciales por el método de arrastre con vapor.
- Desarrollar mezclas de aceites esenciales mediante un diseño de mezclas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las mezclas en productos cárnicos (hamburguesas)
- Probar la eficiencia y aceptación de los productos cárnicos elaborados mediante análisis microbiológicos y sensoriales.

CAPITULO I

ACEITES ESENCIALES

1.1. Concepto y generalidades.

Un aceite esencial o esencia se define como una parte del metabolismo vegetal, compuesto generalmente por terpenos, que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos volátiles, y generan en conjunto el olor de dicho vegetal. (Bandoni, 2000)

Los aceites esenciales, las sustancias odoríferas presentes prácticamente en todos los vegetales, son muy numerosas y ampliamente distribuidas en muchas partes distintas del mismo vegetal: raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Braverman, 1990)

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas. En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los componentes que forman parte de la fracción aromática del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

Los aceites pueden estar asociados formando mezclas con otros productos naturales como es el caso de las resinas y productos relacionados.

Los aceites esenciales también se denominan esencias; son producidos por las plantas que comunican a los órganos que las contienen olor agradable. Químicamente son mezclas complejas de sustancias volátiles, generalmente líquidas, que pueden extraerse por destilación, por arrastre o por vapor de agua. Su interés se encuentra: perfumería, cosmética, alimentación, aromoterapia. Su normalización corre a cargo de organismos: ISO, AFNOR, se normaliza tanto el contenido en aceites esenciales como los métodos de obtención.

Los aceites esenciales están ampliamente distribuidos: coníferas (pino, abeto), mirtáceas (eucalipto), rutáceas (citrus spp), umbelíferas (anís, hinojo), labiadas (menta), compuestas (manzanilla). Pueden estar en diferentes órganos: raíz, rizoma (jengibre), leño (alcanfor), hoja (eucalipto), fruto (anís), sumidades floridas (lavanda, tomillo, espliego). Diversas investigaciones han permitido establecer su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida. (Alzamora, *et al.*, 2001)

La composición de los aceites esenciales varía con el lugar de origen. También varía con el hábitat en que se desarrolle, por lo general climas cálidos tienen mayor contenido de aceites esenciales; momento de la recolección, método de extracción

Los componentes volátiles provenientes de plantas han atraído la atención del hombre desde la antigüedad como principios aromáticos o especies de gran complejidad en su composición. El estudio de los aceites esenciales como materias primas básicas para la industria de fragancias y sabores, se ha transformado en una de las áreas de investigación y desarrollo más importantes para muchos países. Inicialmente considerados como material de deshecho del metabolismo de las plantas, la importancia biológica de los aceites esenciales ha sido reconocida sólo recientemente.

La función fisiológica de los aceites esenciales en el metabolismo de los vegetales aun no es totalmente clara. Se puede suponer que el olor en las hojas o flores es de utilidad para la atracción de los insectos al polen, además el aceite puede actuar como una protección frente al ataque de los insectos.

La mayor parte de casi todos los aceites esenciales consiste en terpenoides y sus derivados. Los terpenoides son hidrocarburos isoprenoides naturales (terpenos) y sus derivados oxigenados.

Los terpenos pueden clasificarse de acuerdo al número de unidades isoprenicas en su molécula por ejemplo los monoterpenos tienen dos isoprenos (C10), los sesquiterpenos tienen tres isoprenos (C15), etc. (Braverman, 1990)

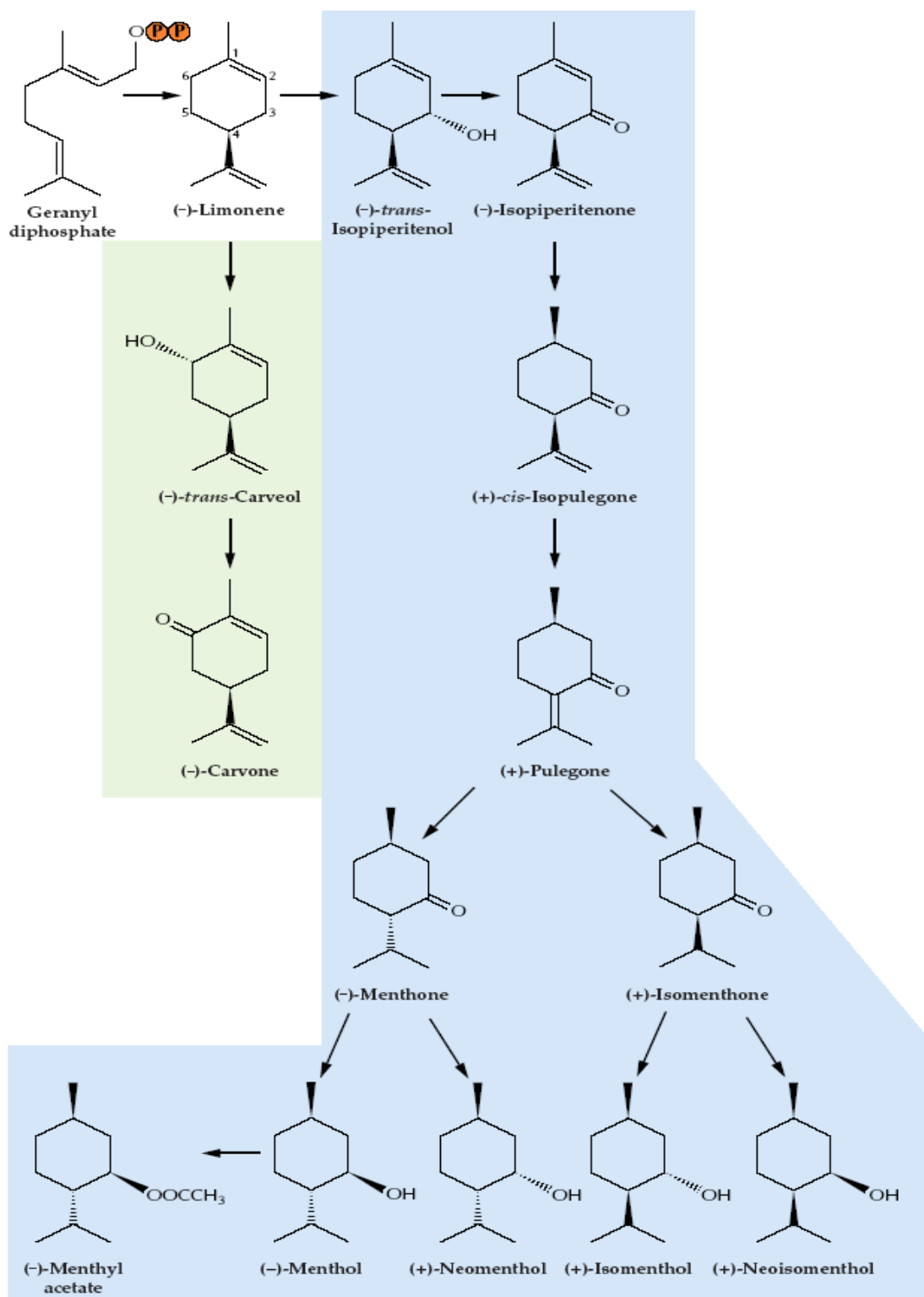


Figura 1. Variedad estructural de los componentes de los aceites esenciales (fuente: Buchanan, 2000).

1.2. Clasificación de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticas. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes.

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos (hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpénicos (copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (clavo, canela, anís, etc.).(Bolilla, 2007)

1.3. Propiedades.

Entre las propiedades más importantes se puede mencionar la volatilidad, inestabilidad ante la luz y el oxígeno, ante la presencia de oxidantes, reductores, medios con pH extremos, o trazas de metales que pueden catalizar reacciones de descomposición, etc. Esta inestabilidad, que resulta en un problema para la conservación o formulación de las

esencias, puede ser un factor interesante cuando se trata de utilizarlas para la semi-síntesis química, pues una molécula inestable es una molécula reactiva, y solamente es necesario fijar las condiciones para poder aprovechar esta reactividad química de los productos aromáticos y orientar su transformación hacia productos deseables.

Otra propiedad destacable de los constituyentes de una esencia es sus variabilidades estructurales, lo que permite generar por semi-síntesis estructuras novedosas. En cuanto a sus solubilidades, tienen la particularidad de que, si bien son solubles en medio no polar (son más liposolubles cuanto mayor contenido de monoterpenos tengan), también suelen tener una alta solubilidad en etanol, lo que es altamente explotado en la elaboración de fragancias y extractos hidroalcohólicos para las industrias farmacéutica y cosmética. Para estos fines también suelen aprovecharse sus solubilidades en agua: agua de rosas, azahar.

Los aceites esenciales refractan la luz polarizada, propiedad que es usada para su control de pureza, pues tienen por ello un índice de refracción característico. También presentan un poder rotatorio característico, en razón de que poseen en su composición compuestos ópticamente activos.

Poseen una densidad normalmente menor que la del agua, excepto algunas esencias como la de clavo, en general son líquidos traslúcidos amarillentos o pardo amarillento. (Bandoni, 2000)

1.4. Métodos de extracción.

Los principales métodos utilizados para obtener aceites esenciales a partir de plantas aromáticas son los siguientes:

- Destilación con agua o hidrodestilación.
- Destilación por arrastre con vapor.
- Destilación con agua y con vapor. Cohobación.
- Destilación previa maceración.
- Destilación sometida a una degradación térmica.
- Expresión.

1.4.1. Destilación con agua o hidrodestilación.

El principio de la destilación con agua es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmiscible en agua es posteriormente separado.

En la destilación con agua el material vegetal siempre debe encontrarse en contacto con el agua. Un factor de especial importancia a considerar es el de que, si el calentamiento del alambique es con fuego directo, el agua presente en el alambique debe ser suficiente y permanente para llevar a cabo toda la destilación a fin de evitar el sobrecalentamiento y carbonización del material vegetal, dado que este hecho provoca la formación de olores desagradables en el producto final.

El material vegetal en el alambique debe ser mantenido en constante agitación a fin de evitar aglomeraciones o sedimentación del mismo en el fondo del recipiente, lo cual puede provocar su degradación térmica.

Algunas especies vegetales tienden a formar suspensiones mucilaginosas al someterse al calentamiento en medios acuosos, lo cual dificulta severamente la extracción del aceite esencial y la consecución del proceso. Es por ello que es importante realizar pruebas preliminares a nivel de laboratorio antes de efectuar destilaciones a gran escala.

El equipo recomendado para realizar estas pruebas preliminares es el sistema Clevenger. El tiempo total de destilación es función de los componentes presentes en el aceite esencial. Si el aceite contiene compuestos de alto punto de ebullición, el tiempo de destilación deberá ser mayor. Dado que no es posible colocar suficiente agua para sostener todo el ciclo de destilación, se han diseñado equipos que presentan un tubo de cohobación lateral que permite el retorno de agua hacia la olla.

Los aceites esenciales obtenidos mediante destilación con agua presentan notas más fuertes y un color más oscuro con respecto a los producidos por otros métodos. Sin embargo este método es útil cuando el material vegetal tiende a aglomerarse mientras el vapor pasa a través de él.

Una ventaja adicional es que el costo para la fabricación del equipo es bajo a comparación con los métodos enunciados, además que su operación no requiere de servicios de energía eléctrica, vapor, aire u otros. La duración de la destilación es larga a causa de la concepción del sistema de calentamiento y enfriamiento, que limitan los rendimientos en esencia.

El tiempo de destilación es muy variable, y debe definirse en función de la calidad del producto que se quiere obtener. En algunos casos se pueden lograr esencias como en la esencia de eucalipto, se pueden lograr productos muy distintos según se destile poco tiempo o mucho.

1.4.2. Destilación por arrastre con vapor.

Este método puede considerarse el más antiguo. Técnicamente el proceso está ligado a la producción de alcohol, y está basado en que la mayor parte de las partes olorosas que se encuentran en una materia vegetal pueden ser arrastrados con el vapor de agua.

La destilación por arrastres con vapor que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición por adicionar la tensión de vapor, del vapor que se inyectan a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales.

Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite esencial y finalmente se separan en un decantador. La destilación por arrastre con vapor de agua, no ha podido ser sustituida por la extracción con solventes orgánicos o con calentamiento directo por la gran cantidad de ventajas que tiene en relación a estos dos últimos sistemas y que pueden resumirse en:

- El vapor de agua es muy económico en comparación al costo de los solventes orgánicos.
- Asegura que no se recaliente el aceite esencial
- No requiere el uso de equipos sofisticados.

1.4.3. Destilación con agua-vapor.

En este caso el vapor puede ser generado mediante una fuente externa o dentro del propio cuerpo del alambique, aunque separado del material vegetal. La diferencia radical existente entre estos sistemas y el anteriormente mencionado es que el material vegetal se encuentra suspendido en un tramado (falso fondo) que impide el contacto del material vegetal con el medio líquido en ebullición. Este sistema reduce la capacidad neta de la carga de materia prima dentro del alambique pero mejora la calidad del aceite obtenido.

Si la cantidad de agua contenida en el alambique no es suficiente para sostener el proceso de destilación, es conveniente utilizar un sistema de cohobación a través del cual, el agua ya condensada es retornada al cuerpo del alambique para volver a ser calentada.

1.4.4. Destilación previa maceración.

En algunos casos las plantas aromáticas requieren ser sometidas a un proceso de maceración en agua caliente para favorecer la separación de su aceite esencial ya que sus componentes volátiles están ligados a componentes glicosidados. El método se aplica para extraer el aceite de semilla de almendras amargas, bulbos de cebolla, semillas de mostaza, hojas de gaulteria y hojas de abedul.

1.4.5. Destilación sometida a una degradación térmica.

Es utilizado para producir la brea del abedul y para obtener el aceite de enebro, en un proceso en el cual sucede una degradación térmica. Según Guenther, para el caso de la producción del aceite de enebro, la madera del tronco, las ramas y las raíces de la especie *Juniperus oxycedrus* son fragmentadas en pedazos que se amontonan sobre una planta cóncava que posee en el centro un tubo conductor con orientación hacia abajo del colecto. En otro recipiente de hierro se coloca carbón, el cual se quema hasta alcanzar un color rojo intenso, el resultado del calor extremo que genera esta combustión se transmite hacia los fragmentos de madera, ésta sufre una descomposición térmica que permite la liberación del aceite esencial. Una vez extraída, esta esencia se mezcla con las sustancias piroleñosas de la madera carbonizada dando como producto un líquido viscoso homogéneo de color marrón oscuro con un fuerte olor a humo.

En forma reciente Chalchat y Col. (1990) demostraron que muchos hidrocarburos sesquiterpénicos soportan estas condiciones drásticas de destilación, como resultado, la cantidad de aceite que se descompone no es tan grande.

1.4.6. Expresión.

Estos procesos son generalmente aplicados a los frutos agrios. Rodano clasificó en varias etapas los fenómenos que ocurren durante la extracción del aceite siendo estas las siguientes:

- a) laceración de la epidermis y de las celdas que contienen las esencias.
- b) Creación en la cáscara de áreas con presión mayor que sus circundantes a través de las cuales el aceite fluye al exterior.
- c) Abrasión de la cáscara, con la formación de pequeñas partículas de la raspadura.

La extracción del aceite se realiza sobre la fruta entera o sobre la cáscara, y en ambos procesos se puede realizar con un proceso manual o mecánico.

Los métodos mencionados se basan en la ruptura de las glándulas secretoras de aceite y en recolectar en forma inmediata la esencia, para evitar ser absorbida por la corteza esponjosa que resulta después de este tipo de procesos. Por esta razón todas las máquinas que procesan cítricos cuentan con un sistema de aspersión de agua que moja constantemente la superficie del fruto.

Es un método de obtener aceites esenciales de plantas o partes de plantas aplicando presión. Los antiguos egipcios guardaban flores en bolsas de tela y las estrujaban hasta que salía el aceite. En la perfumería moderna, se utiliza la expresión para obtener los aceites esenciales contenidos en la piel de naranjas (esencia de naranja), limones (esencia de limón), piel de naranjo amargo (esencia de bergamota) y otros frutos cítricos tales como lima, mandarina, pomelo, etc. (Bandoni, 2000)

1.5. Usos y aplicaciones en la industria

Los aceites esenciales son utilizados en la industria farmacéutica debido a su acción antiséptica y bactericida, antihelmíntica o antiparasitaria, posee efectos sobre el sistema nervioso central, aparato respiratorio, vías urinarias, efecto rubefaciente,

antiinflamatorio, antiartrítico. Son utilizados en aromaterapia y aromacología, como semioquímicos y disolventes. (Bandoni, 2000)

1.6. Actividad antiséptica y bactericida

La actividad antiséptica y bactericida de los aceites esenciales es posiblemente la acción más conocida y usada.. Casi no hay esencias que tengan alguna actividad antimicrobiana, aunque son muy pocas las que tienen un efecto antifúngico. La potencia antiséptica depende mucho de los compuestos activos presentes, pero en principio, los más activos son los aceites esenciales ricos en fenoles: tomillo (contiene altos porcentajes de timol y carvacrol), clavo (contiene eugenol e isoeugenol), salvia; y las esencias con alcoholes y cetonas: mentas (mentol y mentona), orégano (carvacrol y terpinenol-4), pino y trementina (α y β pineno), etc. En algunos casos se ha demostrado una relación directa entre la solubilidad en agua de los terpenos presentes en las esencias y su poder antiséptico: cuanto más hidrosolubles son, más poder antiséptico presentan. Gracias a esta actividad, las esencias son usadas para problemas en las vías respiratorias, dentífricos, infecciones de la epidermis, en cosmética, en alimentos y agroquímicos. (Bandoni, 2000)

1.7. Ventajas del uso de aceites esenciales en productos cárnicos

Las ventajas más importantes que justificarían el uso de aceites esenciales en productos cárnicos son las siguientes:

- Evita las pérdidas de color, olor y sabor de las especias y plantas originales, por almacenamiento no adecuado.
- Permite una mejor dosificación de las sustancias activas.
- Favorece la solubilidad de las grasas en los componentes activos.
- Genera una esterilidad bacteriológica casi absoluta.
- Evita la presencia de taninos y otros compuestos no agradables. (Amo Visier, 1994)

CAPITULO II

ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS

Romero



Nombre científico: *Rosmarinus officinalis*

Familia: Labiadas

2.1.1 Descripción Botánica.

El romero es un arbusto leñoso de hojas perennes muy ramificado, y puede llegar a medir 2 metros de altura. Lo encontramos de color verde todo el año, con tallos jóvenes borrosos (aunque la borra se pierde al crecer) y tallos añosos de color rojizo y con la corteza resquebrajada.

Las hojas son pequeñas y muy abundantes, presentan forma linear. Son opuestas, sésiles, enteras, con los bordes hacia abajo y de un color verde oscuro, mientras que por el envés presentan un color blanquecino y están cubiertas de pelo. En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos.

Las flores son de unos 5 mm de largo. Tienen la corola bilabiada de una sola pieza. El color es azul violeta pálido, rosa o blanco, con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado. Son flores axilares, muy aromáticas y melíferas (contienen

miel), se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres encorvados que están soldados a la corola y tienen un pequeño diente.

El fruto, encerrado en el fondo del cáliz, está formado por cuatro pequeñas nuececitas trasovadas, en tetraquenio, de color parduzco. (P. Font Quer, 1980)

2.1.2 Composición.

Las hojas y sumidades de romero contienen taninos, un principio amargo, 0.15% de saponina ácida y pequeñas cantidades de un glucósido. Pero el más importante de sus componentes aparte de una pequeña cantidad de resina, es la esencia de romero, que se obtiene de las hojas y sumidades floridas en cantidades variables, según las localidades en que se cría y la época en que se recolecta.

En general, las hojas la contienen en la proporción de 1,2 a 2%, es un líquido incoloro con un ligero tinte entre amarillo y verdoso, de olor alcanforado y sabor amargo, a especias. Esta esencia está formada principalmente por α -pineno, cafeno, cineol, alcanfor de romero y borneol. Según la época del año en que se obtiene varía también la composición de la esencia.

Gildemeister y Hoffmaun afirman que “la esencia destilada en primavera tiene sobre todo pineno levógiro, y la que se obtiene en otoño da el pineno dextrógiro”

Además el romero posee los siguientes compuestos:

Ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, rosmarínico), Flavonoides (derivados del luteol y del epigenol), Diterpenos (carnosol, rosmanol, rosmadial), Ácidos triterpénicos (ácido ursólico) 2 a 4%, Alcoholes triterpénicos (alfa y beta-amirina, betulosido) . (P. Font Quer, 1980)

2.1.3. Propiedades.

Del romero se utilizan sobre todo las hojas, y a veces, las flores. Es una planta rica en principios activos. Con el aceite esencial que se extrae directamente de las hojas, se prepara alcohol de romero, que se utiliza para prevenir las úlceras. También se emplea para tratar dolores reumáticos y lumbalgias. Se utiliza en fricciones como estimulante del cuero cabelludo (alopecia). La infusión de hojas de romero alivia la tos y es buena para el hígado y para atajar los espasmos intestinales. El humo de romero sirve como tratamiento para el asma. El alcanfor de romero tiene efecto hipertensor (sube la

tensión) y tonifica la circulación sanguínea. Por sus propiedades antisépticas, se puede aplicar por decocción sobre llagas y heridas como cicatrizante.

2.2. Comino.



Nombre científico: *Cuminum cyminum*

Familia: Apiaceae

2.2.1. Descripción Botánica.

Es una planta herbácea anual que alcanza una altura de 30 cm, tiene hojas lanceoladas, las flores son pequeñas, blancas o rosas. Las llamadas semillas son los frutos que constituyen la especia. De forma ovoidea o fusiforme alargada. Típica disposición de sus flores en forma de umbela, esto es, como si se tratara de un paraguas invertido, en el que todos los pedúnculos florales se unen al tallo por el mismo punto. Las flores del comino pueden ser blancas o rosadas, a final de primavera. El fruto es alargado, más o menos achatado en sus extremos, semejante a un balón de rugby de 5 a 7 milímetros de largo por 1,5 de espesor. Es en su fruto donde se encuentran los principios activos.

El comino tiene un característico sabor amargo y un olor fuerte y dulzón gracias a su alto contenido en aceites. Se asocia a la cocina hindú, por estar presente en el curry y con otras cocinas exóticas (norteafricana, mexicana) aunque su uso está muy extendido en España, especialmente en la cocina del sudeste español.

2.2.2 Composición.

El principio activo presente en el aceite esencial de comino es el aldehído cumínico o cuminal.

2.2.3 Propiedades.

El comino es considerado un tónico estomacal, aperitivo y estimulante del peristaltismo intestinal, por lo que abre el apetito, estimula la digestión .Algunas de las flores de comino comparten propiedades terapéuticas como es el caso de la alcaravea, el cilantro, el anís y el comino. Éste último se diferencia del resto por tener un sabor bastante más intenso, con un toque ligeramente amargo. Es carminativo y sedante con efectos parecidos a los del hinojo, anís o alcaravea. Su aceite esencial provoca relajación muscular. Comúnmente se han utilizado las semillas de comino para salpicar panes y panecillos con este fruto. La semilla de comino se añade a las carnes de caza y los pescados. En España el comino es un elemento fundamental para los embutidos (Plantas Medicinales, Vademécum)

2.3. Albahaca.



Nombre científico: *Ocimum basilicum*

Familia: Labiadas

2.3.1 Descripción Botánica.

Se trata de una planta herbácea, tiene un tronco erecto, alcanza una altura de 30-60 cm. Con hojas opuestas, de color verde intenso en el lado superior y verde-gris en el inferior. Las flores son pequeñas, de color blanco se disponen en largos ramilletes terminales. Es una planta anual, las hojas nuevas son las más perfumadas y sus hojas deberían ser usadas cuando la planta tiene una altura de 20 cm. La albahaca crece bien en terrenos simples, bien soleados y bien regados.

Florece en verano, aunque puede variar en función de cómo y dónde se haya cultivado. La sabiduría popular recomienda llenar la maceta de conchas de caracoles para criar estupendas albahacas. Asimismo, se advierte que no le dé mucho el sol y que no reciba más agua de la necesaria. Con todos estos pequeños trucos, se puede lograr un cultivo de albahaca muy fructífero y aromático. En cuanto a la recolección, lo que interesa principalmente son las hojas y sumidades floridas. Las hojas se utilizan tanto frescas como desecadas, pues no pierden el aroma tras el proceso de secado. Lo principal de esta aromática hierba es la esencia, cuya cantidad y calidad varía dependiendo de su procedencia. Por regla general se encuentra en mayor cantidad en las sumidades floridas, aunque siempre hay excepciones.

2.3.2. Composición.

Esta esencia es rica en metilcavicol, linalol, cineol y eugenol; además de estos compuestos, también encontramos saponinas en su composición. El componente mayoritario del *O. basilicum* es el linalol, cinamato demetilo, el timol y, el *O.tenuiflorum* L, el 4-alil anisol. (Acosta, et. al, 2003)

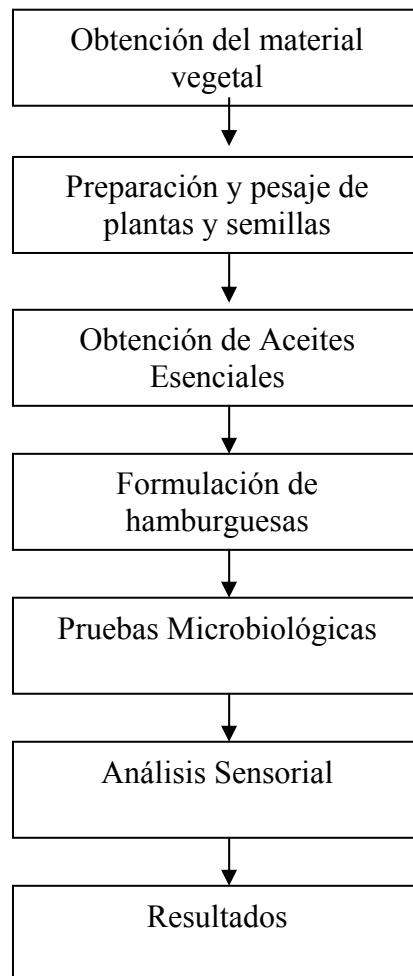
2.3.3. Propiedades.

Esta esencia confiere a la planta propiedades aperitivas, digestivas, espasmolíticas, carminativas, ligeramente sedantes y, en uso externo, analgésicas, vulnerarias y antisépticas. Por todo ello, está especialmente indicada en desnutrición, digestiones lentas y pesadas, espasmos del aparato digestivo, jaquecas y tos convulsiva. Externamente se puede utilizar con buenos resultados en heridas, eczemas y mialgias (dolores musculares). Pero recordemos que las esencias pueden producir cuando menos irritación de las mucosas y, en el caso particular de esta esencia, usada en dosis más

altas de lo habitual, puede producir efectos narcóticos. En muchos sitios de veraneo existe la tradición de comprar una macetita de albahaca para combatir las plagas de insectos y mosquitos que normalmente turban el merecido descanso estival. En realidad no está comprobado que ahuyente a los alborotadores bichos; pero sin duda alguna la albahaca daña mucho menos la capa de ozono que cualquier insecticida de los que se usan hoy día. (Plantas medicinales, vademécum)

CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Esquema de Actividades



Experimentación.

3.2. Preparación del material vegetal.

Para la recolección del material vegetal usado como materia prima para la experimentación se procedió a la recolección de las hojas jóvenes del árbol de romero, la materia prima fue tomada en abundancia debido a la gran cantidad que se necesita para la obtención del aceite esencial. Luego se procedió a trocear las hojas en pedazos pequeños para facilitar la obtención del aceite esencial, obteniéndose el destilado que corresponde a la capa inferior y el aceite esencial en la capa superior pudiéndose separar fácilmente, se colocó en una botella ámbar previamente lavada y esterilizada, la cantidad de aceite que se obtuvo fue de 10ml a partir de 2750g de materia prima.

El rendimiento que se obtuvo fue del 0.36% (p/p)

Para la albahaca de igual manera se tomó una gran cantidad de material debido al bajo rendimiento que se tiene para la obtención del aceite esencial, se cortó las ramas en pedazos pequeños y se colocó en el equipo extractor de aceites esenciales. El aceite obtenido se colocó en una botella ámbar previamente lavada y esterilizada. La cantidad de materia prima que se utilizó fue 2170g y se obtuvo una cantidad de 2ml, de aceite. El rendimiento que se obtuvo fue del 0.1%. (p/p)

Este proceso se repitió tres veces. Para obtener un mejor rendimiento se utilizó un método de separación con solventes (diclorometano).

El agua de destilación restante fue sometida a un proceso de extracción líquido – líquido del aceite esencial. Para este efecto, se adicionó una punta de espátula de NaCl a la mezcla agua – aceite esencial para favorecer la extracción del aceite (efecto salting-out). Posteriormente se realizó una extracción con diclorometano utilizando un embudo de separación (2 x doble del volumen a extraer). La fase orgánica se colectó en un balón y previa la desecación con una porción de Na_2CO_3 , se concentró en rotavapor, hasta obtener el aceite esencial (Pavía, et al., 1998).

Las semillas de comino fueron adquiridas en mercados de la localidad, para la obtención de este aceite se tuvo que ensamblar un extractor a escala de laboratorio. Se utilizó una cantidad de 300g de semillas y se obtuvo una cantidad de 2ml. El rendimiento obtenido fue del 0.6%

3.3. Obtención de aceites esenciales por el método de arrastre de vapor.

3.3.1 Materiales.

Para la obtención del aceite de romero y albahaca:

- Equipo extractor de aceites esenciales marca Albrigi Luigi (Italia).
- Fuente de calor
- Refrigerante
- Mangueras de caucho
- Erlenmeyer

Para la obtención del aceite de comino:

- Soportes universales
- Balón fondo redondo
- Codos
- Uniones
- Nudos doble nuez
- Pinzas
- Fuente de calor
- Sujetador plástico
- Mangueras de caucho
- Tapón de caucho
- Erlenmeyer

3.3.2. Procedimiento:

Para la obtención del aceite de romero y albahaca se procede de la siguiente manera: se coloca 1kg del material vegetal en el equipo extractor de aceites esenciales que consta de un recipiente de acero inoxidable, en el que se tiene que colocar una cantidad de agua

suficiente para que cubra una tapa que posee unos agujeros, por los que va a salir el vapor, en la tapa del recipiente se encuentra un termómetro y una válvula de seguridad.

El recipiente ya tapado se lo conecta a un refrigerante el que tiene una entrada y salida de agua y otra salida para el destilado. Se coloca sobre una fuente de calor hasta que la temperatura de ebullición sea 92°C , se controla que esta temperatura se mantenga constante durante 30 minutos que es el tiempo en el que se obtiene el aceite.

3.3.3. Obtención del aceite de comino.

Una vez obtenida la semilla de comino, se procedió a la obtención del aceite esencial, se ensambló un equipo extractor a escala de laboratorio el que se armó utilizando soportes universales, un balón de fondo redondo en el que se colocó las semillas y agua destilada para generar el vapor, luego se colocó uniones y un codo hasta conectar con el refrigerante, se aseguró cada unión con un sujetador plástico para evitar que se proyecte el vapor hacia el exterior.

El refrigerante tiene que estar conectado a entradas y salidas de agua para la condensación del aceite esencial. El balón de fondo redondo va a ser colocado sobre una fuente de calor intensa para producir la ebullición del agua de tal manera que se produzca la suficiente cantidad de vapor para que pueda arrastrar todo el aceite esencial generado. Una vez obtenido el aceite esencial se coloca en un frasco ámbar estéril.

3.4 Diseño de Mezclas.

3.4.1. Generalidades del Diseño experimental.

El diseño experimental y optimización son herramientas que se utilizan para resolver diferentes tipos de problemas que surgen en la investigación, desarrollo y producción. Es obvio que si los experimentos se desarrollan al azar, el resultado obtenido también será al azar.

Por consiguiente, la planificación de experimentos es necesaria para obtener información de calidad a partir de la experimentación (Lundstet *et al.*, 1998).

El objetivo del diseño experimental es planear y conducir el trabajo experimental para extraer la máxima cantidad de información en un mínimo número de experimentos. La idea básica es cambiar todos los factores relevantes simultáneamente sobre un grupo de experimentos planeados y conectar e interpretar los resultados usando modelos matemáticos.

3.4.2. Diseño de Mezclas.

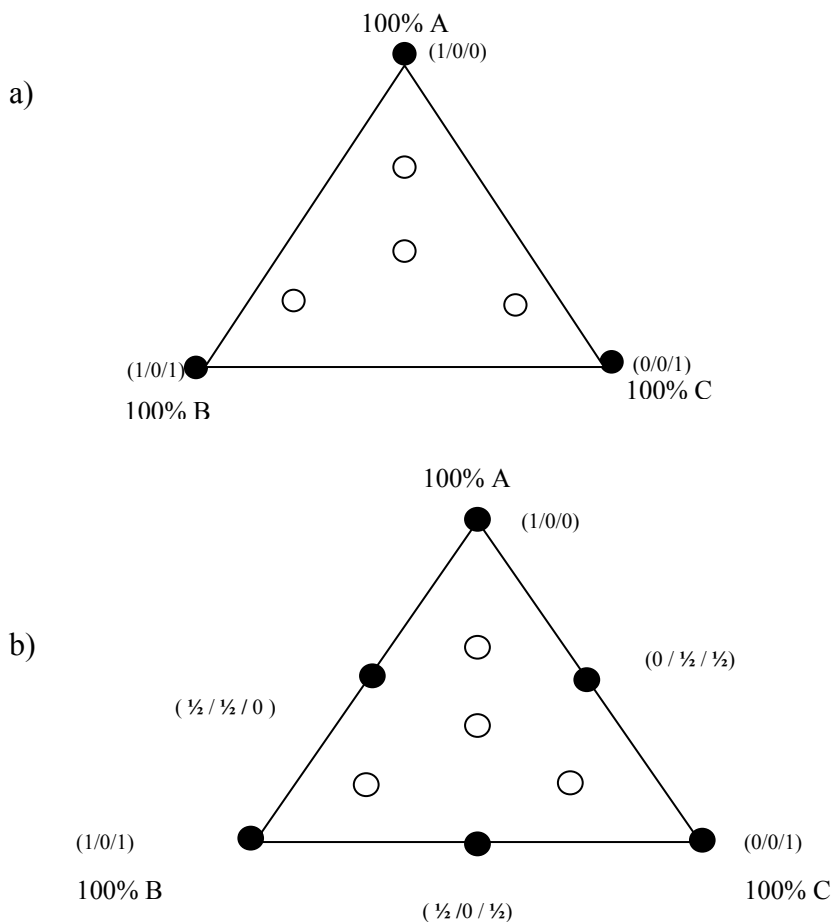


Figura 2. El diseño de mezclas (a) pertenece a la familia axial y obedece a un modelo lineal. El diseño (b) pertenece a la familia simplex centroide y soporta un modelo cuadrático. Los círculos negros representan los experimentos obligatorios y los círculos blancos los experimentos opcionales. Los diseños presentados son para mezclas de tres componentes y las fracciones de cada componente están dadas para cada experimento.

En un diseño de mezclas la suma de todos los componentes es el 100%. Los factores de mezcla son expresados como fracciones de la cantidad total. Los rangos experimentales se hallan entre cero y uno esto significa que no puede ser cambiado total e

independientemente uno de otro. El relleno es un componente de la mezcla en el caso de la preparación de formas farmacéuticas. En dependencia del tipo de preparación es posible considerarlo como un componente.

Los tipos más comunes de diseños de mezclas son: simplex lattice, simplex-centroide y el diseño simplex aumentado. El diseño simplex-lattice consiste en un grupo de ensayos experimentales espaciados uniformemente en un triángulo. Este grupo de experimentos se obtiene de la combinación de $m + 1$ fracciones de componentes (donde m es el número de niveles); esto es, $x_i = 0, 1/m, 2/m, \dots, 1$; donde $i=1,2,3, \dots$. Para $m = 1$ tenemos el simplex lattice para modelos lineales que consiste en una observación de las características de los componentes puros que corresponden a los vértices de un triángulo. Si se consideran tres parámetros del modelo, este diseño no es capaz de estimar el error experimental o probar la validez del ajuste. Estas limitaciones pueden ser resueltas usando un modelo simplex-centroide que adiciona un punto central de coordenadas $(1/3, 1/3, 1/3)$ para determinar si el modelo es apropiado.

El diseño simplex lattice para modelos cuadráticos ($m = 2$) incluye mezclas binarias cuyas coordenadas corresponden a los puntos medios en las líneas que conectan los vértices para estimar efectos no lineales. Un estudio más completo puede realizarse aumentando el modelo simplex-centroide con puntos adicionales conocidos como axiales. Estos puntos incluyen los tres componentes y están localizadas a una distancia $d = 2/3$ desde el centroide en el radio que lo conecta con estos vértices (Gozálvez & García-Díaz, 2006)

Las fracciones para los diseños cuadráticos de tres componentes se reportan en el Cuadro 1.

xp	Simplex-Lattice			Simplex-Centroide			Simplex Aumentado		
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
2	0	1	0	0	1	0	0	1	0
3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
4	1/2	1/2	0	1/2	1/2	0	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2	1/2	0	1/2	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2	0	1/2	1/2	0	1/2	1/2
7	-	-	-	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3
8	-	-	-	-	-	-	1/6	1/6	2/3
9	-	-	-	-	-	-	1/6	2/3	1/6
10	-	-	-	-	-	-	2/3	1/6	1/6

Cuadro 1: Fracciones para los diseños simplex cuadráticos de tres componentes.

El modelo que se empleó para el presente trabajo es el simplex aumentado.

3.4.3. Evaluación del Diseño

El análisis de los datos del diseño y los experimentos realizados usualmente consiste en 3 etapas. La primera etapa es para evaluar datos sin clasificar. El objetivo es evaluar si los datos están normalmente distribuidos y para verificar si el error no es mayor a la variación total en los puntos del diseño.

La segunda etapa es el cálculo del modelo que relaciona el diseño usado con las respuestas registradas, y la interpretación de este modelo.

El ajuste a un modelo de regresión para el diseño experimental y las respuestas registradas se desarrolla usando el método de mínimos cuadrados. Por tanto un modelo de regresión está compuesto de coeficientes que representan la influencia de los factores evaluados. (Gabrielsson *et. al.*, 2001)

Los modelos polinomiales usados son desarrollados a partir de la ecuación de Scheffé, la cual modifica algunos términos de la expresión polinomial completa para eliminar los efectos originados por variables correlacionadas. La forma canónica del modelo cuadrático se presenta a continuación:

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

El parámetro β_i representa la respuesta esperada para los componentes puros $x_i = 1$, $x_j = 0; j \neq i$. El término dado por $y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i$ representa la respuesta cuando

las mezclas son estrictamente aditivas y no hay interacciones entre los componentes de la mezcla. El término cuadrático $\beta_{ij} x_i x_j$ representa la respuesta sobre el modelo lineal debido a las interacciones entre los componentes, este efecto es a menudo llamado sinergismo (o antagonismo). Los modelos experimentales generados se analizan mediante la obtención de una superficie que depende de la composición de las mezclas, para cada respuesta. Los contornos del diagrama corresponden a las

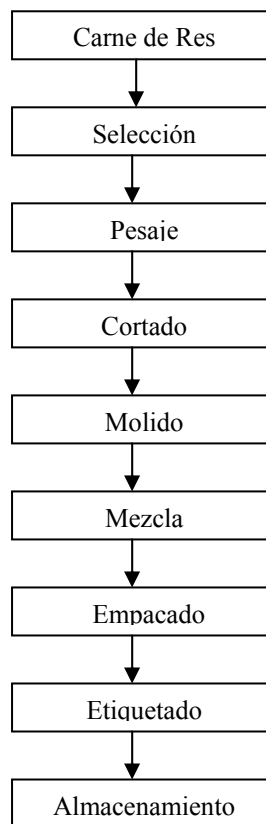
superficies de respuesta obtenidas para cada punto del experimento diseñado, en relación con la respuesta obtenida. (Didier *et al.*, 2007).

3.5. Elaboración de Hamburguesas.

3.5.1 Formulación.

- Carne de res
- Soya 5g/Kg.
- Ajo 1g/Kg.
- Glutamato mono sódico 1g/Kg.
- Tari K7 1g/kg
- Sal 20g/kg
- Pimienta 0.5g/kg
- Mezcla de aceites esenciales 0.005%

3.5.2. Diagrama de bloques del proceso.



3.5.3 Descripción del proceso.- Para la elaboración de este producto se seleccionó la carne de res, se cortó y pesó, luego se colocó en el molino de carne. Una vez que la carne está molida, se procedió a mezclar con los ingredientes según la formulación y se colocó las dosis respectivas de los aceites esenciales y sus mezclas. Se realizó el pesaje del producto para ser envasado al vacío. Se colocaron las etiquetas respectivas y se almacenó en una cámara de refrigeración a 4°C.

3.6. Análisis microbiológico de las muestras

Los microorganismos que contaminan la carne tienen diversos orígenes, pueden estar presentes en el propio músculo por haber ingresado durante la muerte del animal o aportados por manipulaciones que sufren los productos cárnicos durante la producción y distribución. Los gérmenes se multiplican rápidamente, provocando a veces alteraciones o haciendo la carne peligrosa para el consumidor. La carne se contamina inevitablemente a la salida de los mataderos y las salas de despique, sobre todo en la superficie.

El músculo contiene todos los nutrientes necesarios para los microorganismos, estos nutrientes no son directamente accesibles por las barreras que es necesario atravesar previamente (paredes celulares, tejido conjuntivo, aponeurosis, grasa de la cobertura, etc). La penetración de los microorganismos en la carne, canales o piezas gruesas es por lo tanto lenta, por el contrario en las carnes despiezadas o picadas es bastante fácil.

Los factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos en las carnes son la actividad acuosa, el potencial de óxido-reducción, el pH, eventualmente los aditivos y la temperatura. (Rosset, 1994)

Si los procesos de preparación de la carne se llevan a cabo higiénicamente, el número de microorganismos patógenos es pequeño. Si la carne se expone a temperaturas superiores a 20°C, se desarrollan bacterias patógenas mesófilas, tanto aerobias como anaerobias que pueden provocar intoxicaciones alimentarias que proceden de una contaminación entérica. (Larrañaga *et. al.*, 2001)

Las carnes y productos cárnicos pueden ser transmisores de gérmenes patógenos existentes previamente en los animales, sin embargo el número de microorganismos transmitidos es limitado, si las condiciones para la multiplicación de gérmenes son favorables. Se pueden distinguir tres tipos de transmisión:

- a) Por ingestión de gérmenes patógenos
- b) Por manipulación de productos contaminados (carne, canales, despojos).
- c) Intoxicaciones alimentarias. Todos los tipos de intoxicaciones alimentarias son susceptibles de ser provocadas por las carnes. Sin embargo los únicos agentes que se encuentran en la práctica son: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Escherichia coli enteropatógeno*, aminas tóxicas.

Clostridium botulinum.- los alimentos cárnicos responsables del botulismo son las conservas, jamones crudos desecados, productos alimenticios de fabricación familiar.

Staphylococcus aureus.- Ocasionalmente se encuentran en las carnes frescas contaminadas por manipuladores humanos (heridas, amigdalitis), este germen se desarrolla fácilmente en condiciones normales de almacenamiento y la formación de enterotoxina que es la que produce la intoxicación es inhibida por la flora superficial de las carnes. Los productos salados, carnes picadas, manipuladas, cocidas, constituyen un cierto peligro, ya que en las condiciones de preparación y conservación los estafilococos pueden multiplicarse y producir la enterotoxina.

Clostridium perfringens.- las intoxicaciones producidas por este germen están provocadas por el consumo de carnes cocidas. Las esporas para germinar necesitan una temperatura templada durante un tiempo corto. Esta intoxicación se debe a técnicas inadecuadas de preparación de la carne. Se puede evitar manteniendo las carnes por encima de los 65°C.

Salmonella sp.- este grupo de gérmenes son huéspedes frecuentes del intestino de diversas especies de animales. La salida accidental del contenido intestinal de los animales aparentemente sanos puede contaminar el aire de las salas de matadero y las propias canales y ser el origen de contaminaciones directas o cruzadas. En los

diferentes tratamientos la carne puede también contaminarse por manipuladores portadores de salmonelas. La manipulación de estos gérmenes (mala refrigeración, inadecuado tratamiento térmico) es necesaria para que se de la intoxicación.

Las intoxicaciones por salmonelas debidas al consumo de carnes son muy serias, tanto por el número de enfermos como por la gravedad de los síntomas.

Aminas tóxicas.- la ingestión de carnes en vías de descomposición puede ser el origen de una intoxicación alimentaria a causa de la presencia de aminas producidas por la descarboxilación de los aminoácidos por la acción de ciertas bacterias aerobias proteolíticas (Proteus), y sobre todo anaerobias (clostridios). Estas aminas son termoestables, la cocción no las afecta y por lo tanto el peligro persiste en carnes en vías de alteración cocinadas correctamente. (Rosset, 1994)

3.7. Análisis sensorial de las muestras

3.7.1. Generalidades del análisis sensorial.

La evaluación sensorial es el análisis de alimentos u otros materiales por medio de los sentidos. La evaluación sensorial es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos físicos, químicos, microbiológicos, etc., este tipo de análisis tiene la ventaja de que la persona que efectúa las mediciones lleva consigo sus propios instrumentos de análisis, o sea sus cinco sentidos.

Las pruebas sensoriales son utilizadas en diversos tipos de industrias, tales como la alimentaria, perfumería, farmacéutica, la industria de pinturas y tintes, etc.

Para la evaluación sensorial es necesario determinar el número de jueces que deben participar, los jueces son las personas que tomarán parte en las pruebas y de ellos depende en gran parte el éxito y la validez de las pruebas. A los jueces se les debe explicar en forma adecuada cómo han de realizar sus evaluaciones y darles el entrenamiento necesario.

Existen cuatro tipos de jueces: el juez experto, el juez semi-entrenado o de laboratorio, y el juez consumidor.

El análisis sensorial de los alimentos se lleva a cabo de acuerdo con diferentes pruebas, según sea la finalidad para que se efectúe. Existen tres tipos principales de pruebas: las pruebas afectivas, las discriminativas y las descriptivas.

3.7.2. Pruebas afectivas. Son aquellas en las cuales el juez expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza, o si lo prefiere a otro.

Estas pruebas son las que presentan mayor variabilidad de los resultados y estos son más difíciles de interpretar ya que se trata de apreciaciones completamente personales. Es necesario determinar si uno desea evaluar simplemente el grado de preferencia o satisfacción (gusto o disgusto), o si también uno quiere saber cual es la aceptación que tiene el producto entre los consumidores.

Para las pruebas afectivas es necesario contar con un mínimo de 30 jueces no entrenados. Las pruebas afectivas pueden clasificarse en tres tipos: pruebas de preferencia, pruebas de grado de satisfacción y pruebas de aceptación.

a) Prueba de preferencia. Aquí simplemente se desea conocer si los jueces prefieren una cierta muestra sobre otra. Esta prueba es muy sencilla y consiste en pedir al juez que diga cual de las dos muestras prefiere.

b) Prueba de medición del grado de satisfacción. Cuando se deben evaluar más de dos muestras a la vez, o cuando se desea obtener mayor información acerca de un producto, puede recurrirse a la prueba de medición del grado de satisfacción. Estas son intentos para manejar más objetivamente datos tan subjetivos como son las respuestas de los jueces acerca de cuánto les gusta o les disgusta un alimento.

Para llevar a cabo estas pruebas se utilizan escalas hedónicas que son instrumentos de medición de las sensaciones placenteras o desagradables producidas por un alimento a quienes lo prueban. Las escalas hedónicas pueden ser verbales o gráficas.

Las escalas hedónicas verbales son las que presentan a los jueces una descripción verbal de la sensación que les produce la muestra. Las escalas hedónicas gráficas se utilizan cuando hay dificultad para describir los puntos de una escala hedónica debido al tamaño de esta o cuando los jueces tienen limitaciones para comprender las diferencias entre los términos mencionados en la escala.

c) Prueba de aceptación. El deseo de una persona para adquirir un producto es lo que se llama aceptación, y no solo depende de la impresión agradable o desagradable que el juez reciba al probar un alimento, sino que también de aspectos culturales, socio económicos, de hábitos, etc. En la industria alimentaria se investiga si el producto es agradable o no, si es preferible o no, mientras que la determinación de la aceptación corresponde al área de la mercadotecnia. (Anzaldúa- Morales, 2005).

Para el presente trabajo se realizó la evaluación sensorial utilizando la prueba de medición del grado de satisfacción, para la cual se utilizó un panel no entrenado de 20 personas y se aplicó una escala hedónica de tres puntos, en la que se pudo conocer la opinión a cerca de los tipos de hamburguesas preparadas con mezclas de aceites esenciales de romero, albahaca y comino.

Las preparaciones de hamburguesas se realizaron mediante una cocción a la plancha, se tomaron como muestras las hamburguesas que presentaron mejores resultados en el análisis microbiológico, y como referencia la muestra sin mezclas de aceites esenciales.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Evaluación microbiológica del producto terminado

Se realizaron los análisis microbiológicos respectivos a las muestras formuladas con las mezclas de aceites esenciales y muestras control. Después de una semana de almacenamiento a temperatura de refrigeración se realizaron los análisis microbiológicos de cuantificación de: bacterias totales, coliformes totales, bacterias anaerobias totales y enterobacterias. Los resultados son el promedio de tres determinaciones. En la tabla que se presenta a continuación se muestran las proporciones usadas para las mezclas de aceites y las respuestas experimentales, que fueron transformadas para facilitar el cálculo. Para expresar los resultados como variables originales, se debe multiplicar las respuestas por 10^4 .

	x	y	z	Cuantificación microorganismos		
Exp	Albahaca	Romero	Comino	B.Totales	Coliformes	Enterobacterias
1	1	0	0	8	0,466	4,66
2	0	1	0	7,33	0,366	3,33
3	0	0	1	20,33	0,466	16
4	0	0,5	0,5	17,66	1,133	6,33
5	0,5	0	0,5	16,33	0,66	5,66
6	0,5	0,5	0	20,66	0,3	2,1
7	0,66	0,16	0,16	20,66	1,06	3,33
8	0,16	0,66	0,16	9	0,1667	0,53
9	0,16	0,16	0,66	7,33	0,1667	1,266
10	0,33	0,33	0,33	10	0,3667	0,86
Promedio				13,73	0,51511	4,4066

Cuadro 2. Resultados de cuantificación de microorganismos para hamburguesas preparadas según esquema de diseño de mezclas.

4.2. Selección del modelo que optimiza las mezclas de aceites esenciales como preservantes de preparados cárnicos.

En función a los resultados presentados en el cuadro 2, se calcularon modelos de 3ro, 2do y 1er orden para expresar la importancia de los aceites esenciales puros, sus mezclas binarias y terciarias en la inhibición del crecimiento de los microorganismos evaluados. A continuación se presentan las ecuaciones obtenidas para cada una de las variables respuesta. Las abreviaturas empleadas son:

$N_{c.colif}$: Número de colonias de coliformes totales

$N_{c.enterob}$: Número de colonias de enterobacterias

$N_{c.b.tot}$: Número de colonias de bacterias totales

Coliformes Totales:

a) Modelo de tercer orden

$$N_{c.colif} = 0.669A + 0.284R + 0.34C - 0.242AR + 0.942AC + 2.473RC - 11.787ARC$$

b) Modelo de segundo orden

$$N_{c.colif} = 0.693A + 0.307R + 0.364C - 0.96AR + 0.225AC + 1.755$$

d) Modelo de primer orden

$$N_{c.colif} = 0.598A + 0.382R + 0.57C$$

Enterobacterias

a) Modelo de tercer orden

$$N_{c.enterob} = 5.431A + 3.381R + 14.703C - 6.076AR - 19.668AC - 15.681RC - 100.209ARC$$

b) Modelo de segundo orden

$$N_{c.colif} = 0.693A + 0.307R + 0.364C - 0.96AR + 0.225AC + 1.755$$

c) Modelo de primer orden

$$N_{c.enterob} = 2.21A + 0.602R + 10.418C$$

Bacterias Totales

a) Modelo de tercer orden

$$N_{c.b.tot} = 10.576A + 6.588R + 18.277C + 55.44AR + 9.664AC + 10.069RC - 291.256ARC$$

b) Modelo de segundo orden

$$N_c b_{tot} = 11.163A + 7.175R + 18.864C + 37.699AR - 8.097AC - 7.67RC$$

d) Modelo de primer orden

$$N_c b_{tot} = 14.157A + 10.216R + 16.826C$$

4.3. Validación de los modelos obtenidos

Para validar la significatividad total del modelo se analiza la razón entre las dos fuentes de variación del modelo mediante un análisis de varianza. Esta proporción se compara con el estadístico de Fisher, con el cual verificamos la existencia de un modelo lineal.

Coliformes

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Regresión	6	0.381	0.0635
Residual	23	0.654	0.0284

$$H_0 = \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 \dots = \beta_n \quad \text{no existe modelo}$$

$$H_a = \beta_1 \neq \beta_2 \neq \beta_3 \dots \neq \beta_n \quad \text{existe modelo}$$

$$F_{calc} = \frac{0.0635}{0.0284} = 2.23$$

$$F_{tab(90,6,23)} = 2.047$$

$$F_{calc} > F_{tab} \therefore H_0 \text{ se rechaza. Existe modelo}$$

Enterobacterias

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Regresión	6	154.812	25.802
Residual	23	27.247	1.184

$$H_0 = \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 \dots = \beta_n \quad \text{no existe modelo}$$

$$H_a = \beta_1 \neq \beta_2 \neq \beta_3 \dots \neq \beta_n \quad \text{existe modelo}$$

$$F_{calc} = \frac{25.802}{1.184} = 21.779$$

$$F_{tab(95,6,23)} = 2.047$$

$F_{calc} > F_{tab} \therefore H_0$ se rechaza. Existe modelo

Bacterias totales

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Regresión	6	194.104	32.3506
Residual	23	120.239	5.2277

$H_0 = \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 \dots = \beta_n$ no existe modelo

$H_a = \beta_1 \neq \beta_2 \neq \beta_3 \dots \neq \beta_n$ existe modelo

$$F_{calc} = \frac{32.350}{5.227} = 6.1882$$

$$F_{tab(95,6,23)} = 2.527$$

$F_{calc} > F_{tab} \therefore H_0$ se rechaza. Existe modelo

De los resultados obtenidos en la validación de los modelos matemáticos presentados, se observa que los parámetros β de los modelos establecidos son significativos y expresan la relación entre las variables microbiológicas y los componentes de las mezclas.

4.3.1 Comparación entre modelos: optimización

Una medida de la cercanía de los valores calculados por el modelo a los valores observados en los puntos del diseño puede ser obtenida calculando las diferencias $y_u - \hat{y}_u$; $u = 1, 2, \dots, n$; donde y_u es el valor observado de la respuesta y \hat{y}_u es el valor de la respuesta que predice el modelo. Estas diferencias son llamadas residuos.

Para comparar el ajuste de un modelo de primer orden versus un modelo de segundo orden, calculamos la razón F, según la siguiente fórmula:

$$F = \frac{(SCE_{reducida} - SCE_{completa}) / r}{SCE_{completa} / (N - p)}$$

Donde:

$SCE_{reducida}$ = residuo de la suma de cuadrados asociados con el modelo reducido (ecuación de primer grado)

$SCE_{completa}$ = residuo de la suma de cuadrados asociado con el modelo completo (ecuación de segundo grado)

r = diferencia en el número de parámetros en los modelos completo y reducido, y p es el número de parámetros en el modelo completo. (Cornell, 1990)

El análisis realizado comparando los modelos de tercero, segundo y primer orden se obtuvieron los siguientes resultados:

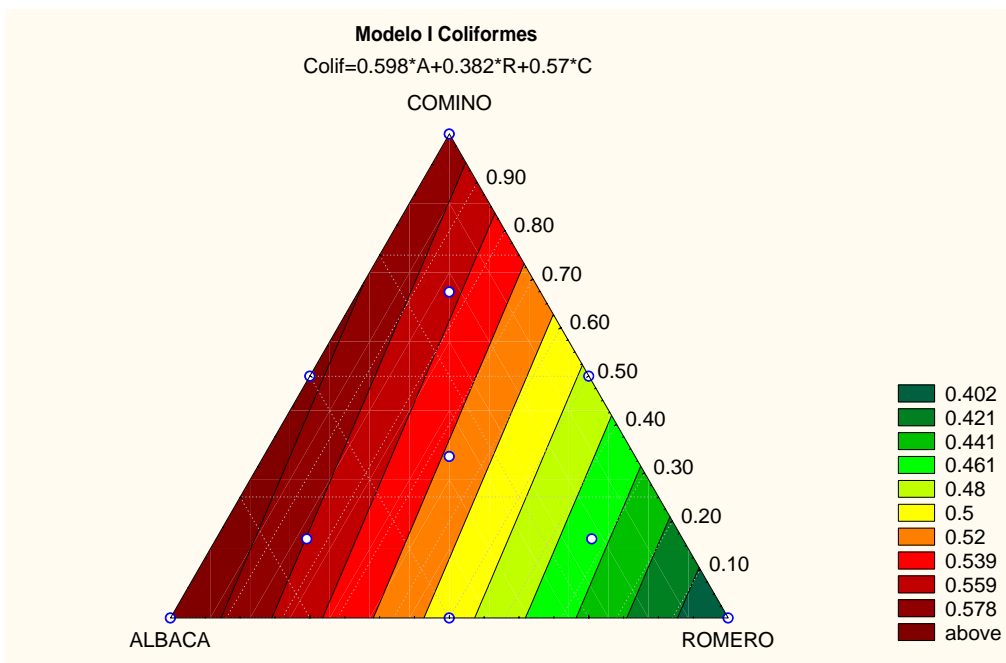
R	Comparación de modelos	F_{calc}	F_{teo}	Conclusión
Coliformes	1er Orden vs 2do Orden	7889,72	3.23 _(0.05,3,16)	El modelo de 2do Orden presenta mejor ajuste
	2 Orden vs 3er Orden	2.79	4.54 _(0.05,1,15)	El modelo de 2do Orden presenta mejor ajuste
Enterobacterias	1er Orden vs 2do Orden	55428,30	3.23 _(0.05,3,16)	El modelo de 2do Orden presenta mejor ajuste
	2 Orden vs 3er Orden	24.08	4.54 _(0.05,1,15)	El modelo de 3er Orden presenta mejor ajuste
Bact. totales	1er Orden vs 2do Orden	20326.92	3.23 _(0.05,3,16)	El modelo de 2do Orden presenta mejor ajuste
	2 Orden vs 3er Orden	30.12	4.54 _(0.05,1,15)	El modelo de 3er Orden presenta mejor ajuste

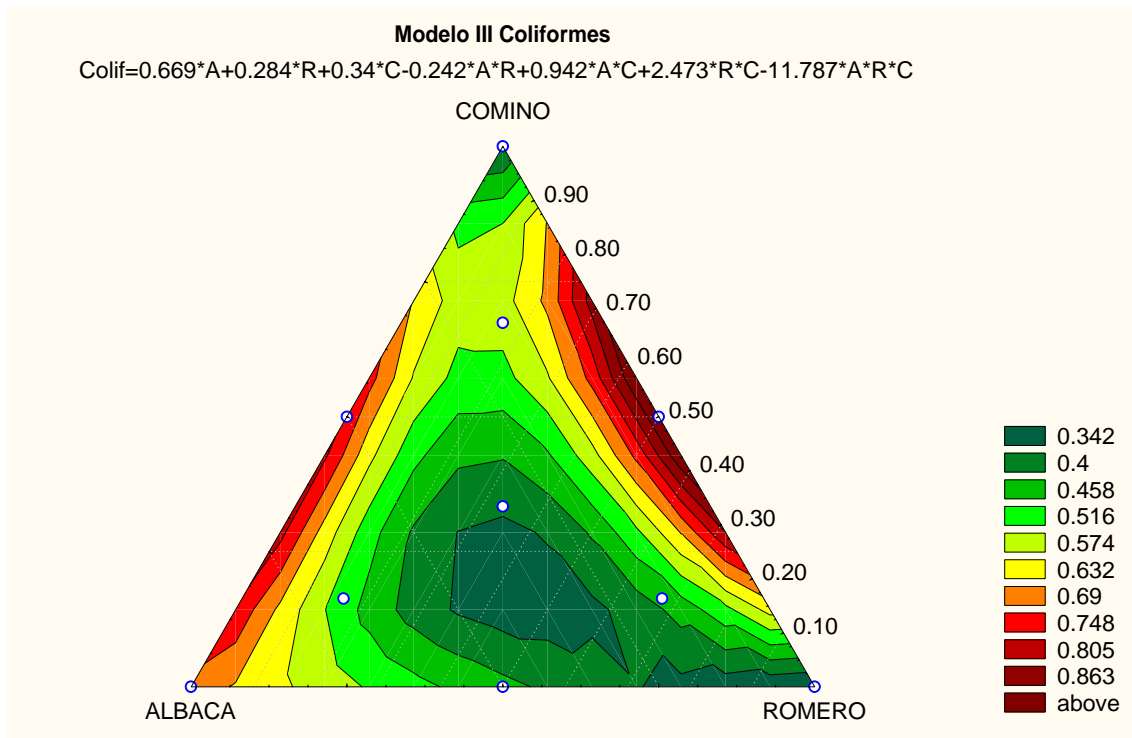
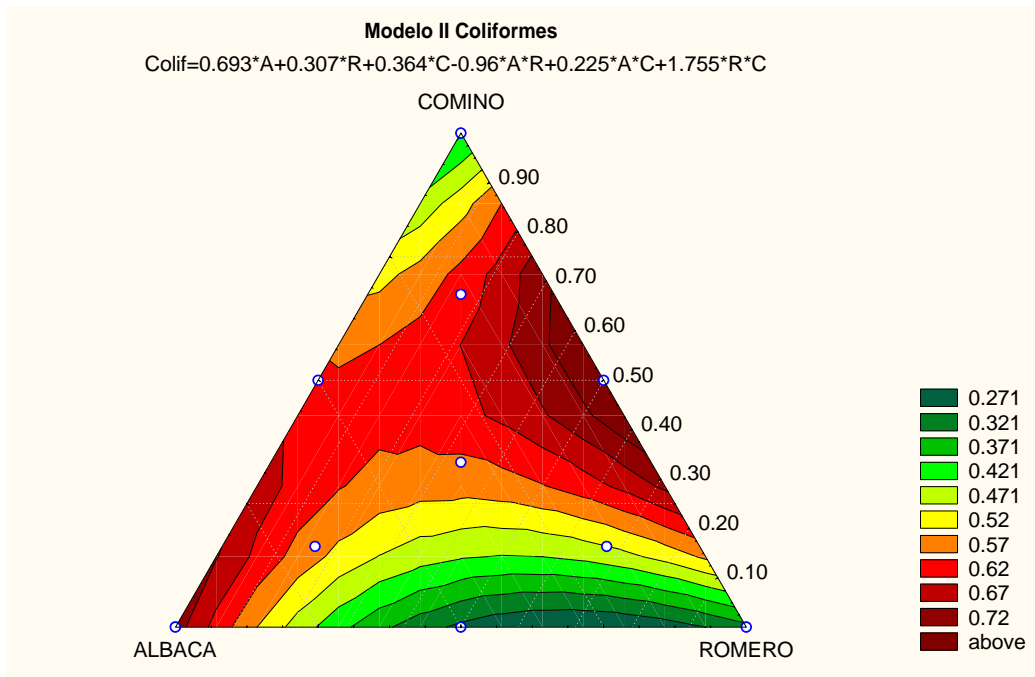
Cuadro 3. Resultados de la comparación entre modelos de 1ero, 2do y 3er orden mediante la prueba F

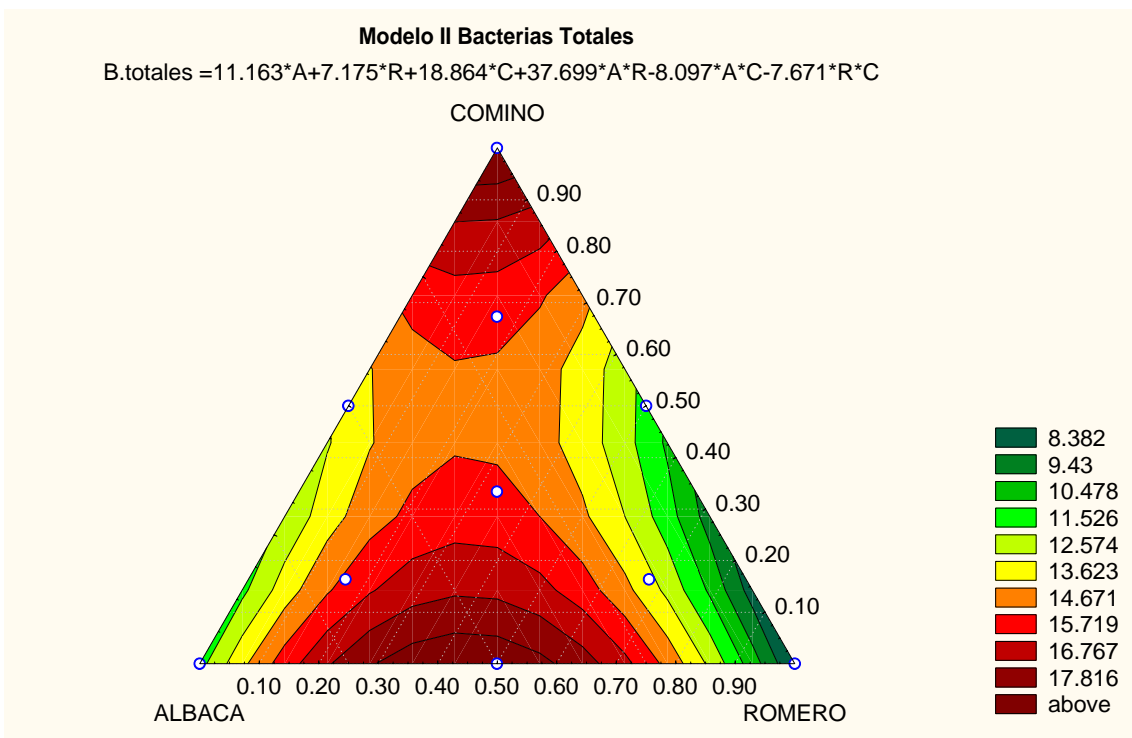
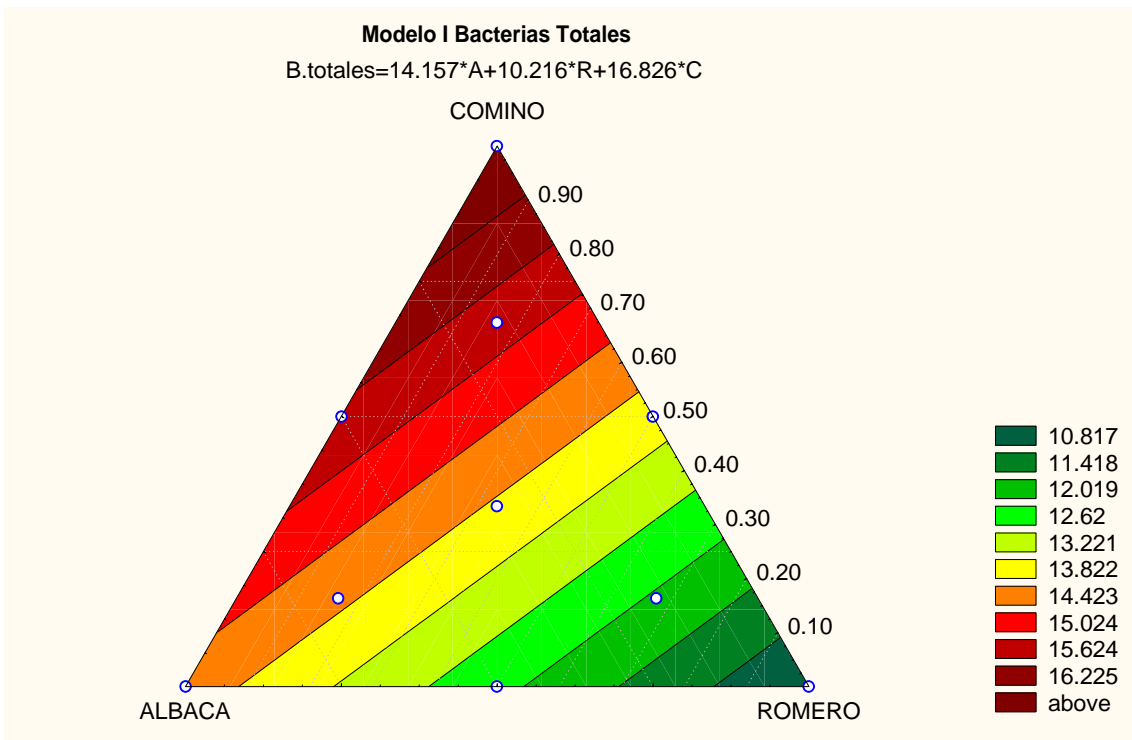
Los resultados presentados en el cuadro 3, muestran al modelo de 3er orden como el de mejor ajuste a las respuestas experimentales.

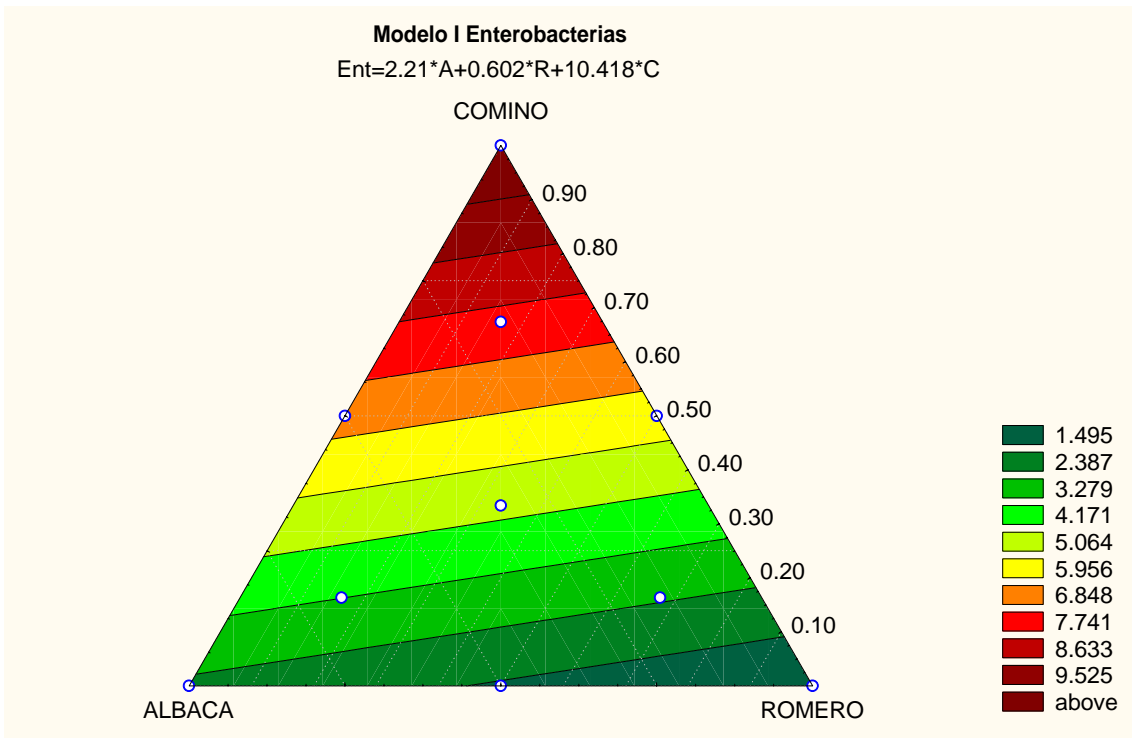
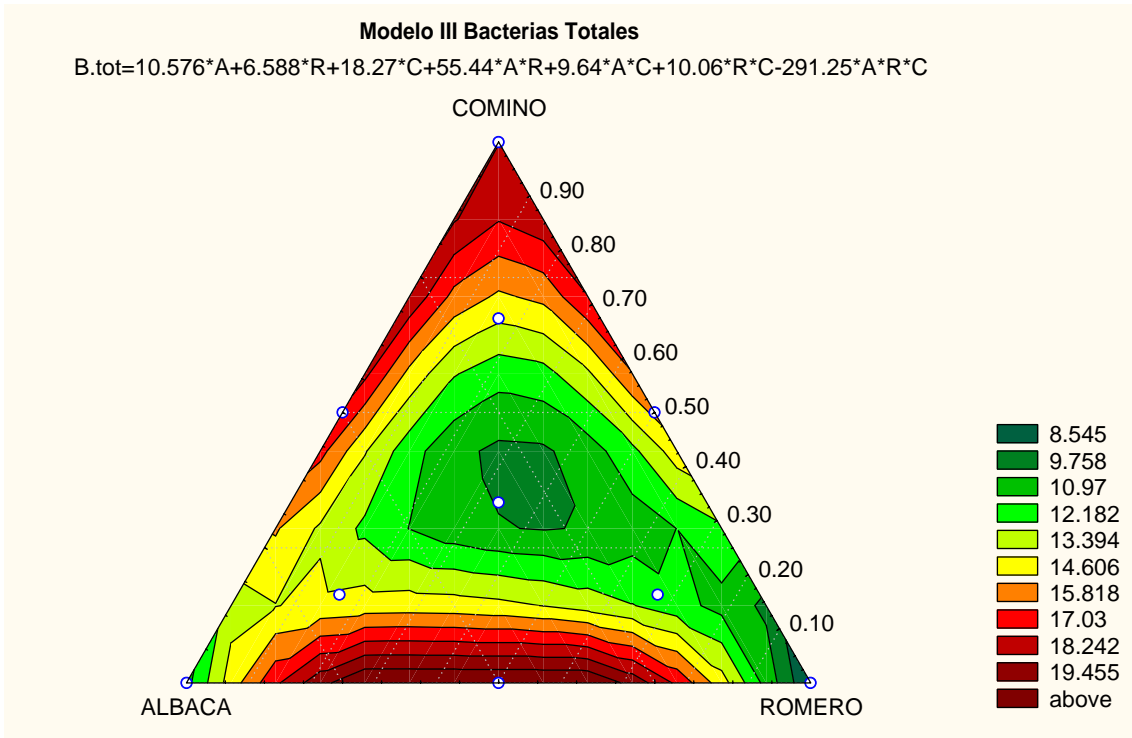
4.4 Superficies de respuesta para los modelos obtenidos

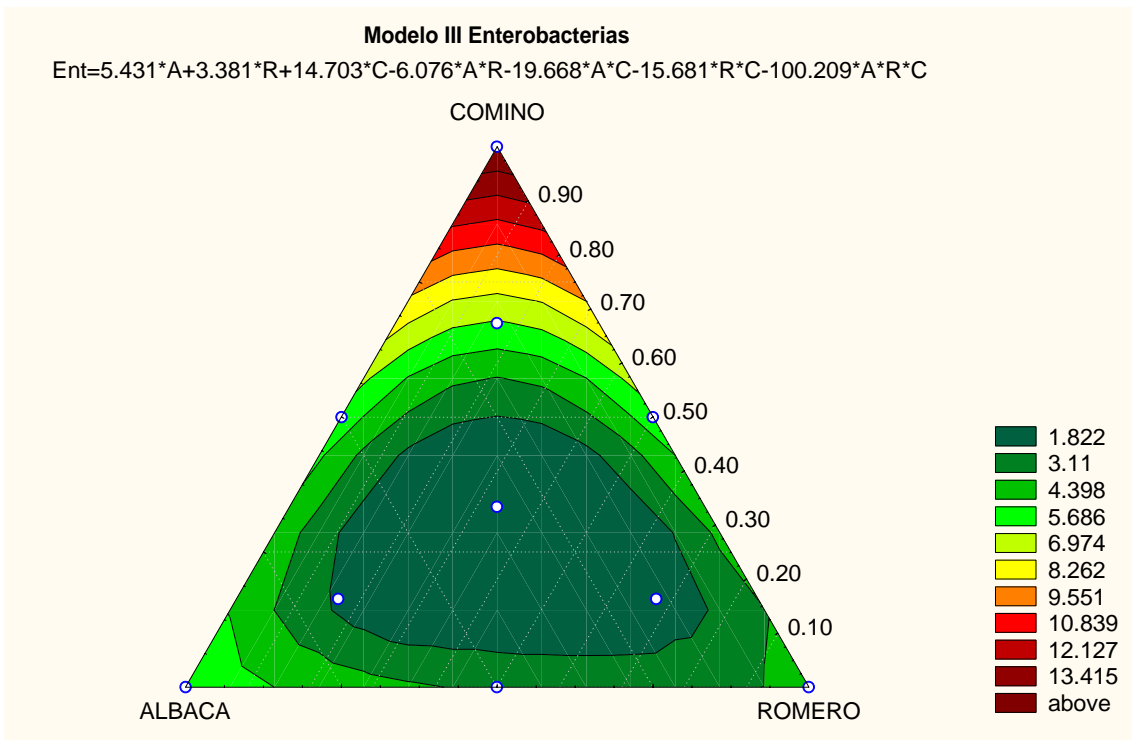
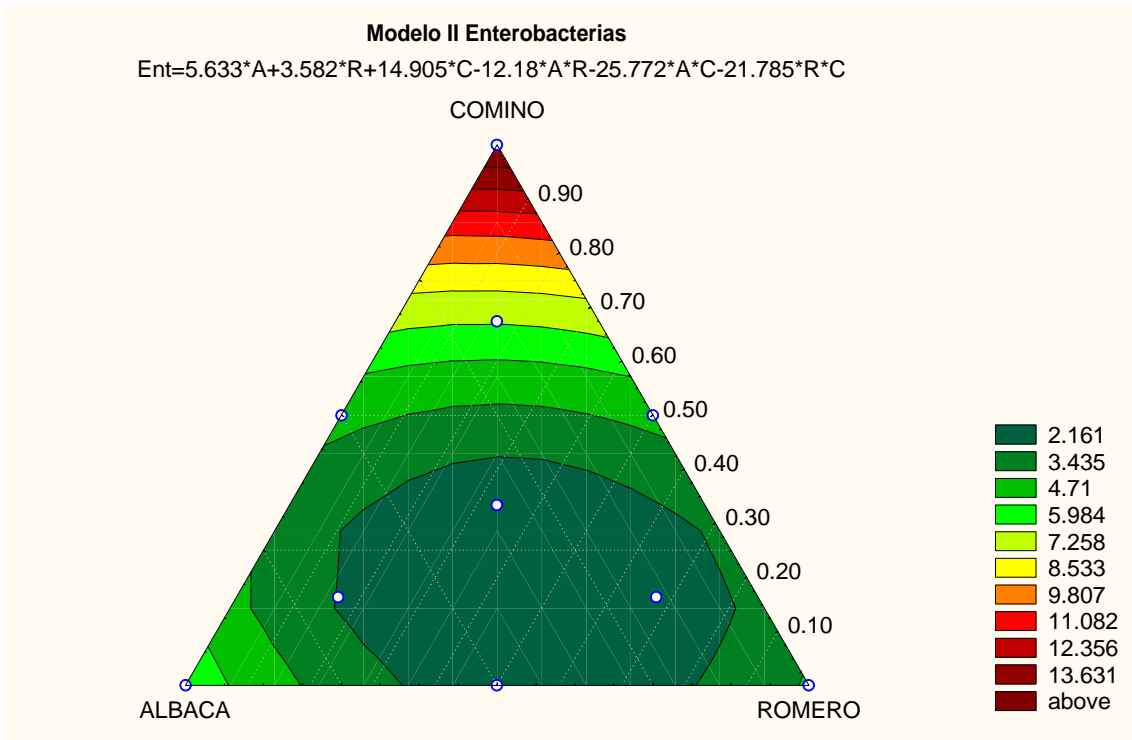
A continuación se presentan los gráficos de superficie de respuesta para los modelos obtenidos, evaluando las respuestas experimentales en función a los componentes de la mezcla.











En los gráficos de superficie de respuesta para los modelos obtenidos, los valores que se observan en la escala representan el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano en

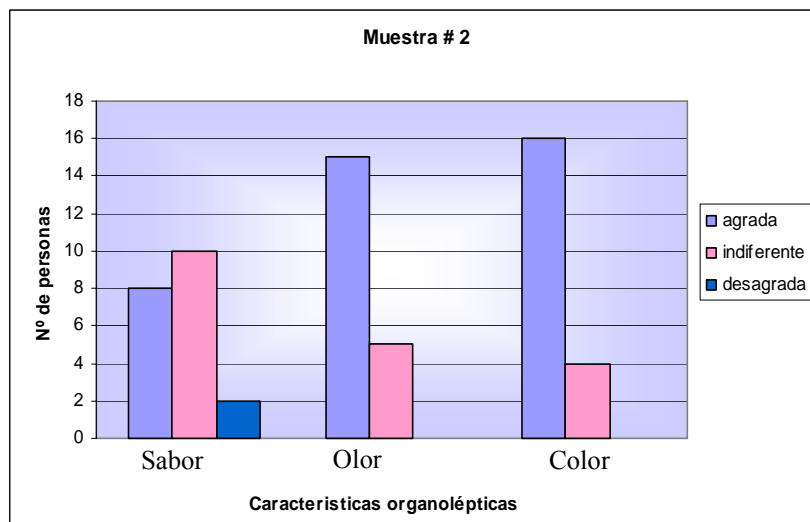
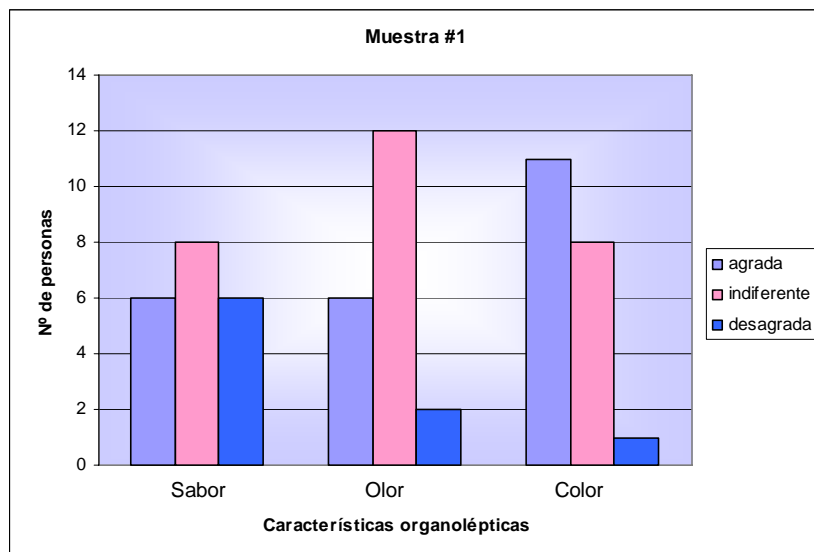
productos cárnicos, los valores menores en la escala indican un menor crecimiento bacteriano en cada caso.

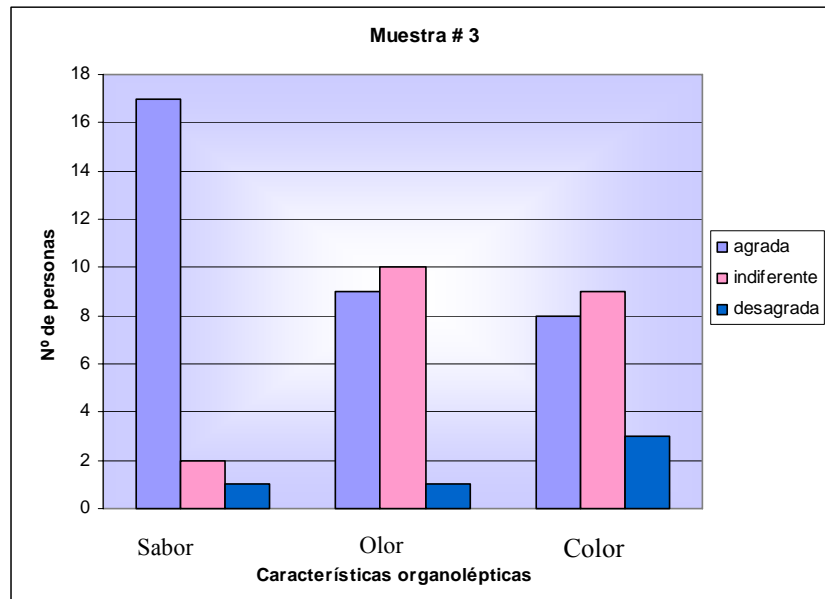
También se puede observar que, para los tres tipos de bacterias utilizadas como microorganismos de prueba, la mezcla de aceites esenciales que presenta un mejor efecto antibacteriano es la mezcla albahaca-romero, a diferencia de las mezclas que contienen aceite de comino que indican valores mayores en la escala, por lo tanto un mayor crecimiento de bacterias.

4.5. Resultados del análisis sensorial del producto terminado

Los resultados del análisis sensorial demostraron que la muestra que contiene la mezcla de albacá 16.66%; romero 66.6 % y comino 16.6 % dieron un mejor resultado, al indicar los jueces que es la muestra que más les agrada, además de ser la que mejor resultados microbiológicos tiene.

Los resultados del análisis sensorial se resumen en los siguientes gráficos.





Figuras 3. Evaluación Sensorial del Producto Terminado

Muestra 1: 16.66% albahaca, 16.66% Romero, 66.66% comino

Muestra 2: 16.66% albahaca, 66.66% Romero, 16.66% comino

Muestra 3: muestra sin aceites esenciales

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los aceites esenciales de las plantas seleccionadas con potencial antimicrobiano (albahaca, romero y comino) por el método de arrastre de vapor, de las cuales el romero y comino presentan un buen rendimiento. Para mejorar el rendimiento del aceite de albahaca se tiene que realizar una extracción con solventes.
- Se realizaron las mezclas de los tres aceites esenciales mediante un diseño de mezclas siguiendo un modelo simplex aumentado.
- Se evaluó la actividad antimicrobiana de las mezclas de aceites esenciales en preparaciones de hamburguesas, con los datos obtenidos en las pruebas microbiológicas se obtuvieron las ecuaciones para las variables respuesta, se puede observar que las tres especies presentan actividad antimicrobiana.
- Con las ecuaciones obtenidas se seleccionó el modelo que optimiza las mezclas de aceites esenciales como preservantes de preparados cárnicos, para las coliformes totales el modelo de segundo orden es el que presenta mejor ajuste, para enterobacterias y bacterias totales el modelo de tercer orden es el que presenta mejor ajuste.
- En los gráficos de superficie de respuesta para los modelos obtenidos se observa que los valores menores en la escala indican un menor crecimiento bacteriano en cada caso. Además se pudo determinar que para bacterias totales, coliformes totales y enterobacterias la mezcla de aceites esenciales que presenta un mejor efecto para inhibir su crecimiento es la mezcla albahaca-romero
- Se realizó el análisis sensorial de las muestras que mejor resultado microbiológico presentaron.

- De los resultados obtenidos, se puede demostrar que los aceites esenciales son eficientes como conservantes para productos cárnicos, por lo tanto el uso de aceites esenciales es una buena alternativa para la industria; además de tener un buen efecto antibacteriano, presenta ventajas como la conservación del aroma, mejoran el color y sabor del producto,
- Además es necesario mencionar que los aceites esenciales no presentan ningún riesgo para la salud humana, a diferencia de los conservantes químicos.

BIBLIOGRAFIA

ALZAMORA L, MORALES L , ARMAS L , FERNANDEZ G.(2003). Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Universidad Peruana Cayetano Heredia, http://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/Anales/v62_n2/pdf/a08v62n2.pdf , 02-10-2007

AMO VISIER, ANTONIO (1994). Industria de la Carne, España, Editorial Aedos, Pág. 88 – 106.

ANZALDÚA MORALES, ANTONIO (2005). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica, España, Editorial Acribia, Zaragoza, Pag 45-92.

BANDONI, ARNALDO (2000). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, Argentina, Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.

BADUI DERGAL, SALVADOR. (1993). Química de los Alimentos, México, Editorial Alhambra Mexicana S.A.

BUCHANAN, B. GRUISSEM, JONES, R.(2000). Natural products, Biochemistry and Molecular Biology of plants physiologists.

COMPLUDOC, Biblioteca de la Universidad Complutense, Preservantes en la industria cárnica. Revisión y actualización, <http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=276059&donde=castellano&zfr>, 15 - 09 – 2007

CORNELL, A. JOHN (1990). Experiments with mixtures, United States of America, A Willey Interscience publication, Second edition, 1990. Pag. 43 – 51.

DESROSIER, NORMAN. (2004). Conservación de Alimentos, Compañía Editorial Continental, Pág. 333 – 369

DIDIER, C., ERCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R., GOICOECHEA, H. (2007). Crossed mixture design and multiple response análisis for developing complex culture media used in recombinant protein production. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 86, pp. 1 -9

FONT QUER. (1988). Plantas Medicinales, el Discórides renovado, España, Editorial Labor S. A, Sexta Edición.

FORREST C. JOHN, ARBELE D. ELTON, HEDRICK HAROLD, JUDGE MAX, MERKEL A. ROBERT.(1979). Fundamentos de la Ciencia de la Carne, España, Editorial Acribia, Zaragoza, Pág. 208 – 212.

GABRIELSSON, J., LINDBERG, N., LUNDSTEDT, T. (2002) Multivariate methods in pharmaceutical applications. *Journal of Chemometrics*, Pág, 141 – 160.

GONZÁLEZ MARÍA, ACOSTA MARÍA, ARAQUE MARÍA, VELAZCO ELSA, KHOURI NANCY, ROJAS LUIS, USUBILLAGA ALFREDO.(2003). Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. Y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes, Laboratorio de Bacteriología Clínica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Los Andes, Venezuela.

<http://www.saber.ula.ve/db/ssaber/Edocs/pubelectronicas/revistafarmacia/vol45/acostam.pdf> , 20 - 09- 2007

GONZALVEZ, J., & GARCIA-DIAZ, J. (2006). Mixture Design Experiments Applied to the Formulation of Colorant Solutions. *Journal of Chemical Education* , 647 - 650.

LARRAÑAGA, C., JUAN, Carballo, F., Julio, Rodríguez, T., Ma. Del Mar, Fernández, S., José.(1999). Control e higiene de los alimentos, España, Editorial Mc Graw Hill, Pag 316- 326

LUCK ERICK. (1981). Conservación Química de los Alimentos, España, Editorial Acribia, Zaragoza, Pág. 65 – 71.

LUNDSTEDT, T., SEIFERT, E., ABRAMO, L., THELIN, B., NYSTROM, A., PETTERSEN, J., BERGMAN, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **42**, 3 -40

PAVIA, D.L, LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S, ENGEL, R. G.(1998). Introduction To Organic Laboratory Techniques: Small Scale Approach. 1st Edition Fort Worth: Saunders College Publishing, Pág, 957p.

PLANTAS MEDICINALES, Vademécum (2006).

(<http://www.healthtopic.com/diccionarioplantas/index.html>), 10-09-2007

ROSSET, R. (1994) Microbiología Alimentaria, Volumen I, España, Editorial Acribia, Zaragoza, Pag 247-260.

ANEXOS

Anexo 1

1.1 Preparación de medios de cultivo.

- Peptona 10g
- ClNa 5g

Bacterias totales:

- Agar PCA 22.5g

Enterobacterias y Coliformes:

- Cromocult 13.3g

Bacterias Anaerobias Totales:

- Agar SPS 40g

Cada medio de cultivo se disuelve en 1000ml de agua destilada, se tiene que esterilizar en autoclave durante 45min.

1.2 Preparación de las muestras.

Se colocó en 20g del preparado cárnico 50µl de los aceites puros y de cada mezcla. De cada muestra se tomó 10g, se colocó en fundas estériles y se mezcló con 90ml de agua de peptona. Se llevó cada funda a un agitador, se realizaron las disoluciones para las siembras respectivas.

Anexo 2**3.1. Ficha de evaluación para la prueba de medición del grado de satisfacción utilizando una escala hedónica de tres puntos.**

Fecha:

Producto: Hamburguesas.

Indique que tanto le gustan o le disgustan las muestras que se le presentan a continuación según la escala:

- 1. Me gusta
- 0. Ni me gusta ni me disgusta
- 1. Me disgusta

Asigne la calificación correspondiente a cada propiedad

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Sabor	_____	_____	_____
Olor	_____	_____	_____
Color	_____	_____	_____

Observaciones:

GRACIAS