

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CONSERVANTE DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE CLAVO (*Syzygium aromaticum*) Y CANELA
(*Cinnamomum verum*), SOBRE LA LEVADURA (*Rhodotorula
mucilaginosa*) EN LECHE CHOCOLATADA**

MARÍA VICTORIA CASTAÑO SEPÚLVEDA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS MEDELLÍN

2012

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CONSERVANTE DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE CLAVO (*Syzygium aromaticum*) Y CANELA
(*Cinnamomum verum*), SOBRE LA LEVADURA (*Rhodotorula
mucilaginosa*) EN LECHE CHOCOLATADA**

MARÍA VICTORIA CASTAÑO SEPÚLVEDA

**Trabajo de grado para optar al título de
Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

VÍCTOR HIGUERA MARÍN

DIRECTOR

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS MEDELLÍN

2012

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, DD, MM, AA

Contenido	Pág.	4
RESUMEN		7
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN		11
OBJETIVO GENERAL		11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS		11
ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN		12
ACEITES ESENCIALES (AE)		15
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES		18
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES (AE)		21
MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE LOS MICROORGANISMOS		25
MÉTODOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIBACTERIAL DE LOS ACEITES ESENCIALES		27
LECHES SABORIZADAS		28
BIBLIOGRAFÍA		31
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE ACEITES ESENCIALES DE CLAVO (<i>Syzygium aromaticum</i>) Y CANELA (<i>Cinnamomum verum</i>), SOBRE <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> EN LECHE CHOCOLATADA		37
Resumen		37
INTRODUCCIÓN		39
MATERIALES Y MÉTODOS		45
RESULTADOS		53
DISCUSIÓN		62
CONCLUSIONES		70
BIBLIOGRAFÍA		72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales componentes de los aceites esenciales de clavo y canela.....	53
Tabla 2. Rendimiento de extracción de los AEs de canela y clavo.....	54
Tabla 3: Abundancia relativa de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	56
Tabla 4: Abundancia relativa de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de Canela (<i>Cinnamomum verum</i>).....	57
Tabla 5: Medida del halo de inhibición de acuerdo a la dosis de los AEs de clavos y canela y el testigo (cms).....	58
Tabla 6: ANOVA para los Aceites esenciales de clavo y Canela y las dosis determinadas.....	58
Tabla 7: Crecimiento promedio en número de UFC/ml de <i>R. mucilaginosa</i> en muestras de leche saborizada (dilución 10-6).....	60
Tabla 8: Calificación de la prueba de aceptación por el panel de consumidores.....	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructuras químicas de algunos de los principales compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en los AE.....19
- Figura 2.** Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*)obtenido por arrastre con vapor.....55
- Figura 3.** Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de canela (*Cinnamomum verum*)obtenido por arrastre con vapor55
- Figura 4.** Halo de crecimiento (cm) para los tratamientos de AE de clavo y canela sobre *Rhodotorula mucilaginosa*.....59

RESUMEN

Los aceites esenciales (AE) son mezclas homogéneas de sustancias orgánicas provenientes de una misma familia química, terpenos y sus compuestos oxigenados. Tienen la propiedad común de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano, algunos presentan propiedades antimicrobianas. El clavo (*Syzygium aromaticum*) y la canela (*Cinnamomum verum*) son especias muy utilizadas en gastronomía y medicina natural, evaluados durante las últimas décadas por su uso potencial como conservantes y antioxidantes en el campo de la agroindustria y alimentos.

El presente trabajo de investigación corresponde a la evaluación de la actividad inhibitoria de los aceites esenciales de clavo y canela obtenidos mediante la técnica de arrastre con vapor, *in vitro* e *in vivo* sobre la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*, como una nueva fuente de conservantes naturales no tóxicos en leche chocolatada.

La investigación se desarrolló en tres etapas: inicialmente se obtuvieron los aceites esenciales utilizando la técnica de arrastre con vapor o hidrodestilación y se caracterizó su composición cualitativamente mediante cromatografía de gases – masa, para la segunda fase se evaluaron los aceites esenciales obtenidos mediante el método *in vitro* para determinar la capacidad mínima inhibitoria comparados con un

testigo comercial, y finalmente bajo los resultados anteriormente obtenidos, se determinó la dosis de aplicación dentro de la formulación para el producto lácteo (Leche chocolatada), evaluando su respuesta *in vivo* y la aceptación por un panel sensorial de consumidores.

Los resultados obtenidos indican el efecto antimicrobiano de los AE de clavo y canela, puesto que en forma individual y en combinación al 50% produjeron acción antimicrobiana sobre la *Rhodotorula mucilaginosa*, lo que indica su potencial aplicación en la industria de alimentos, convirtiéndolos en una alternativa de conservación natural, cuyo uso ayudaría en la disminución de los riesgos toxicológicos aportados por el empleo de los conservantes artificiales o sintéticos.

Palabras Claves: actividad antimicrobiana, aceites esenciales, *Cinnamomum verum*, *Syzygium aromaticum*, leche chocolatada.

SUMMARY

Essential oils (EO) are homogeneous mixtures of organic chemical compounds from the same chemical family, terpenes and their oxygen compounds. They have the common property of generating pleasant aromas, that are perceptible to humans, and some of them have antimicrobial properties. Clove (*Syzygium aromaticum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) are widely used spices in food and natural medicine, evaluated over recent decades for their potential use as preservatives and antioxidants in agribusiness and food business.

This research work evaluates the inhibitory activity of essential oils of clove and cinnamon obtained by steam distillation technique, *in vitro* and *in vivo* on yeast (*Rhodotorula mucilaginosa*) as a new source of natural non-toxic preservatives.

The research was conducted in three stages. Initially essential oils were obtained using the steam distillation or hydrodistillation technique and qualitatively characterized their composition by gas and mass chromatography. For the second phase, essential oils obtained by *in vitro* method were evaluated to determine minimum inhibitory capacity compared to a commercial control. And finally on the results previously obtained, it could be determined the rate of application in the formulation

for a milk product, evaluating its response *in vivo* and the acceptance of a sensory panel of consumers.

The results showed the antimicrobial effect of the EO of cloves and cinnamon, as individually and combined 50%, produced antimicrobial action on *Rhodotorula mucilaginosa*, which justifies their potential application in the food industry, making them a natural conservation alternative, thus eliminating the toxicological risks provided by the use of artificial or synthetic preservatives.

Keywords: antimicrobial effect, essentials oils, *Cinnamomum verum*, *Syzygium aromaticum*, chocolate milk.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum verum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*), sobre levadura *Rhodotorula mucilaginosa* en leche chocolatada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtención de aceites esenciales de las especias clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*) por el método de hidrodestilación.
2. Aislar e identificar las colonias de las levaduras alteradoras presentes en la leche saborizada con chocolate.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria *in-vitro* sobre las colonias *R. mucilaginosa* de los aceites esenciales de clavo y canela
4. Evaluar microbiológicamente, la efectividad de los aceites esenciales aplicados en las diferentes concentraciones vs conservantes químicos en leche chocolatada
5. Evaluar sensorialmente la leche chocolatada con los diferentes tratamientos.

ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN

En general los alimentos y en particular la leche, son altamente perecederos, por lo que necesitan ciertas condiciones de tratamiento y conservación. Su principal causa de deterioro es el ataque por diferentes tipos de microorganismos, bacterias, levaduras y mohos (Orbera, 2004). Esto tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes como para los distribuidores y consumidores. Por otra parte los alimentos alterados pueden resultar perjudiciales para la salud del consumidor, teniendo en cuenta que algunos microorganismos producen sustancias altamente tóxicas. Existen pues razones poderosas para evitar la alteración de los alimentos. Además de los métodos físicos, existen asociaciones con sustancias químicas que causan la muerte de los microorganismos o que al menos evitan su crecimiento, pero también pueden causar daño en la salud de las personas (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Hoy día, los hábitos de consumo reconocen la importancia del uso de sustancias naturales que puedan prolongar la vida útil de los alimentos, es por ello que cada vez cobran más importancia y se está investigando el uso de extractos de plantas que puedan ser aplicadas sin efectos colaterales (Patiño *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 2007; Burt, 2004). En muchos alimentos existen de forma natural sustancias con

actividad antimicrobiana, muchas frutas contienen diferentes ácidos orgánicos como el ácido benzoico o el ácido cítrico; en los yogures su estabilidad se debe al ácido láctico producido durante la fermentación, los ajos, las cebollas y muchas especias contienen potentes agentes antimicrobianos. Algunos estudios han reportado la acción conservante de los aceites esenciales que prometen competir con el amplio mercado de los agentes químicos y/o sintéticos, obligados en su disminución de uso, porque son altamente tóxicos para el hombre y los animales, la gran mayoría son bio-acumulables y después de un largo tiempo de aplicación, se tornan inocuos para muchos microorganismos patógenos (Bosquez *et al.*, 2009). Los AEs tienen como gran ventaja que son obtenidos de materiales vegetales que se han consumido históricamente como alimentos de uso común y tienen demostrada su inocuidad en humanos, como los AEs de hierbas y especias como la canela y el clavo (Lopez *et al.*, 2007; Goñi *et al.*, 2009).

La leche es un alimento altamente perecedero, y saborizada con chocolate presenta gran tendencia a la contaminación, especialmente por crecimiento de las levaduras. La leche chocolatada es un alimento sensorialmente muy atractivo y rico en sustancias de alto valor nutricional que la hacen muy susceptible a la descomposición por el ataque de microorganismos diversos, entre los que se encuentran las levaduras cuyo efecto es más evidente por la producción de gases. Existe el interés en prolongar la vida útil sin la adición de sustancias que puedan

tener efectos colaterales en la salud de los consumidores, es por ello que desde hace algún tiempo se ha venido sometiendo a tratamiento térmico especial y se envasa en un empaque que le proporciona el carácter de "larga vida", lo cual lo convierte en un alimento costoso y poco accesible a algunos grupos poblacionales.

Se han reportado numerosos estudios en los que se ha evaluado el potencial antimicrobiano *in vitro* de los AEs de canela y clavo (López *et al.*, 2007; García *et al.*, 2006) y son pocas las investigaciones en las que se ha determinado *in vivo*, el efecto directo protector en los alimentos, como por ejemplo en leche y sus diferentes derivados.

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto conservante de los AEs de clavo y canela, adicionados a la leche saborizada con chocolate y tratada térmicamente con pasteurización, sobre la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* esperando darle mayor durabilidad o vida útil, sin efectos negativos para la salud del consumidor aplicando las nuevas tendencias de conservantes en alimentos.

ACEITES ESENCIALES (AE)

Los aceites esenciales son una mezcla de lípidos o grasas de bajo peso molecular muy hidrofóbicas, generalmente menos densos que el agua, aromáticos y volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas, formados por terpenos, en particular monoterpenos y sesquiterpenos, así como sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos, ácidos y ésteres terpénicos que se denominan respectivamente, monoterpenoides y sesquiterpenoides. (Batish *et al.*, 2008; Bakkali *et al.*, 2008; Bosquez *et al.*, 2009; Stashenko, 2000). Se les llama aceites por su apariencia física y consistencia parecida a las grasas. Se encuentran muy difundidos en el reino vegetal, especialmente en las fanerógamas y se pueden encontrar localizadas en diferentes partes de la planta, por ejemplo en las hojas (albahaca, mejorana, menta, romero, salvia), en las raíces (valeriana, vetiver), en la corteza (canela, cedro), en la cáscara del fruto (limón, mandarina, naranja) o en los frutos (anís, cardamomo, hinojo). La cantidad y composición del aceite varía de una especie a otra y dentro de los mismos géneros de la planta (Meza *et al.*, 2007; Nejad *et al.*, 2008).

Los AEs se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios (Goñi *et al.*, 2006). De acuerdo con su consistencia, los aceites esenciales se

clasifican en esencias fluidas, líquidos volátiles a temperatura ambiente, bálsamos de consistencia más espesa y poco volátiles, y oleorresinas, las cuales tienen el aroma de las plantas en forma de líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas. De acuerdo a su origen los AEs se clasifican en naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones posteriores o sea que son los compuestos tal como se destilan de la planta; los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento del mismo aceite con uno o varios de sus componentes o mezclas de varios aceites o productos de refinación; y los aceites esenciales sintéticos, son mezclas de componentes sintetizados, que emulan la composición de la esencia natural (Stashenko, 2000). Desde el punto de vista químico pueden ser clasificadas según el predominio de algunos componentes como por ejemplo monoterpenoides (hierbabuena, albahaca, salvia), sesquiterpenoides (aceite de cedro, jengibre), y del tipo de mezcla donde los compuestos oxigenados son mayoritarios, entre estos los fenoles (clavo, canela, anís, albahaca, laurel, tomillo, entre otras) (Sheng-Yang *et al.*, 2005; Bosquez *et al.*, 2009; Stanshenko, 2000).

Los aceites esenciales de clavo y canela poseen actividades biológicas antibacterianas, antifúngicas, insecticidas y antioxidantes, atribuidas al eugenol y al aldehído cinámico, respectivamente, sus principales constituyentes, y se utilizan tradicionalmente como saborizantes y como antimicrobianos en los alimentos (Guam *et al.*,

2007). La canela contiene resinas cianogénicas y ácido hidrocianico con propiedades antibacteriales y taninos con acción hemostática y astringente (Martínez, 2003). Se ha encontrado que estos AEs son eficaces contra bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter spp.*, *Lactobacillus spp.* y *Pseudomonas*. (Gutiérrez *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2008; Goñi *et al.*, 2009; Burt, 2004), y *Salmonella enteritidis*. (Bosquez *et al.*, 2009), inhiben también el crecimiento en el pan de arroz de *Eurotium spp*, *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*, pero su eficacia depende del pH y de la actividad de agua (A_w) (Guynot *et al.*, 2005), también tiene efectos terapéuticos, incluyendo antiemético, analgésico, antiespasmódico, antiséptico, hipoglicémico y preventivo contra el cáncer (Wang *et al.*, 2009; Kwon-Keun *et al.*, 2009; Bosquez *et al.*, 2009).

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Actualmente se conocen más de doscientos AEs, en los cuales se han identificado alrededor de cuatrocientos componentes químicos. Junto con los terpenos y sesquiterpenos (Juárez *et al.*, 2010), se encuentran componentes oxigenados como alcoholes libres (geraniol, linalol, nerol, mentol, terpineol), o en forma de ésteres, aldehídos (cinámico, benzaldehído, citral, geranial), cetonas (alcanfor, mentona), fenoles (carvacrol, eugenol, isoeugenol, timol), ácidos libres (ácido acético, benzoico, cianhídrico, cinámico, propiónico, valeriánico) (Bakkali *et al.*, 2008). Los AEs ricos en terpenos y compuestos fenólicos, poseen actividad antioxidante y alta actividad antimicrobiana, algunas hierbas y especias con estas propiedades incluyen a la pimienta, la albahaca, el laurel, el clavo, la canela, la cúrcuma, el eucalipto, el extracto de semilla de toronja, el orégano, la páprika, el rábano, el romero, la salvia, el tomillo, la valeriana, el estragón, entre otras (Bosquez *et al.*, 2009; Carhuapoma *et al.*, 2005). El eugenol (2-metoxi-4alil fenol) y el aldehído cinámico (3-fenil-2-propenal), son los principales constituyentes volátiles del clavo y de la canela, con alta actividad antimicrobiana. El tomillo y el orégano poseen terpenos carvacrol, p-cimeno y timol como componentes volátiles y de alta actividad inhibitoria sobre bacterias, hongos y levaduras, siendo el timol el que se encuentra en mayor proporción en ambas especias; el flavedo del limón contiene monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes, ésteres y aldehídos con propiedades

antisépticas, antivirales y bactericidas (Draughon, 2004). La figura 1, presenta las estructuras químicas de algunos de los principales compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en los AEs, antes mencionados.

Algunas plantas según sus variedades, aunque poseen los mismos AEs, presentan concentraciones diferentes. Ensayos realizados en cinco especies de canela, *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cinnamomum tamal*, *Cinnamomun burmannii* y *Cinnamomm pauciflorum* para determinar el contenido de cinamaldehído y eugenol, se encontró que la *C. cassia* y *C. zeylanicum* tenían la mayor cantidad de cinamaldehído y *C. zeylanicum*, *C. burmannii* y *C. pauciflorum* eran ricas en eugenol (Wang, 2009).

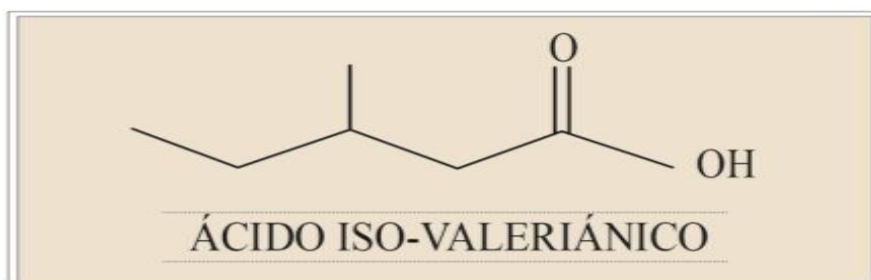
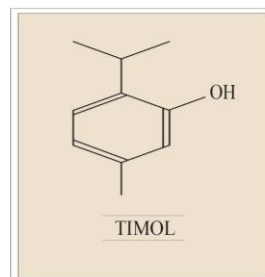
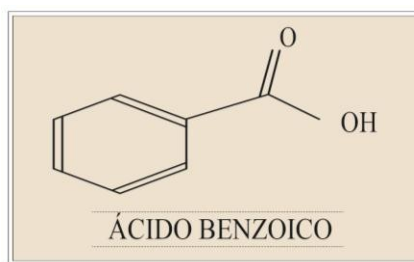
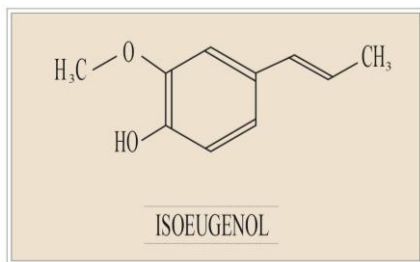


Figura 1. Estructuras químicas de algunos de los principales compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en los AEs de canela y clavos.

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES (AE)

Para obtener un AE de calidad hay que tomar en cuenta los diferentes factores que pueden alterar su composición. Son varios los aspectos fundamentales que determinan la composición química de los AEs, se incluyen la variedad genética, el estado de desarrollo de la planta o sus órganos, factores geográficos y ambientales como temperatura, luminosidad, humedad relativa, composición del suelo; prácticas culturales, corte y operaciones postcosecha, y el método de extracción (Meza *et al.*, 2007; Bosquez *et al.* 2009), siendo este último el más importante de todos los puntos mencionados.

Los métodos empleados para la extracción de AEs incluyen: *Enfleurage* o enflorado, extracción con solventes, extracción por prensado, extracción con fluidos súper críticos e hidrodestilación o extracción por arrastre con vapor (Guan *et al.*, 2007; Ciani *et al.*, 2002; Juárez *et al.*, 2010). El método de hidrodestilación es el más comúnmente utilizado; la extracción con fluidos supercríticos ofrece mejor perfil pero es el más costoso y la extracción con solventes, como hexano ha mostrado mayor actividad antimicrobiana que la hidrodestilación. Los AEs son volátiles y fotosensibles por lo tanto necesitan almacenarse en recipientes herméticos opacos o en la oscuridad y a baja temperatura con el fin de evitar cambios en la composición (Burt, 2004).

□ *Enfleurage* o enflorado: fue usado por los ancestrales egipcios para extraer componentes aromáticos del material vegetal (generalmente flores) y exudados. Su uso continuó hasta el siglo XX, pero ahora no tiene importancia comercial. Las flores se ponen en contacto con un aceite vegetal de punto de fusión alrededor de 40°C, que actúa como vehículo extractor, se extiende el material vegetal en bandejas de profundidad no mayor de 0.5 cm. El contacto puede durar de 3 a 5 días, momento en el cual se remueve el material y se reemplaza por otro fresco, esta operación se repite buscando la saturación de la grasa y la impregnación con el aceite perfumado; la grasa se funde y la mezcla se filtra para remover la materia sólida. El aceite oloroso es extraído con alcohol, se filtra y se destila a vacío hasta recuperar como mínimo un 80% del volumen del alcohol, quedando en el fondo un residuo llamado "absolute" (Archila, 2008; Martínez, 2003).

□ Extracción con solventes: Previamente se muele el material a utilizar, para permitir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente. Durante el proceso, el sólido o el líquido, o ambos estarán en continuo movimiento (agitación), y se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambiente. El proceso puede ejecutarse por lotes o en forma continua. Los solventes solubilizan los aceites y extraen también otras sustancias como ceras (Martínez, 2003; Sanchez 2006). Los solventes más empleados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo,

acetona, cloroformo, finalmente se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados (Guan *et al.*, 2007).

□ *Extracción por prensado:* El material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas tipo batch ó en forma continua. Dentro de éstos se tienen los equipos tornillo sin fin de alta ó de baja presión, extractor expeller, extractor centrífugo, extractor decanter y rodillos de prensa. En estos procesos la mezcla de agua-aceite se centrifuga a 5000 rpm durante 40 minutos y el AE recuperado se coloca a 3° C durante 4 horas, para solidificar gomas y ceras que se localizan en la superficie. El AE se guarda en recipientes oscuros a 12 °C. (Guan *et al.*, 2007; Ciani *et al.*, 2002; Del valle y Aguilera, 1999).

□ *Extracción con fluidos supercríticos:* La extracción con fluidos supercríticos, es una operación unitaria que aprovecha el poder de disolución de los fluidos, en condiciones por encima de su temperatura y presión críticas. Es posible obtener extractos sin disolventes y la extracción es más rápida que cuando se utilizan disolventes orgánicos convencionales (Del valle y Aguilera, 1999). Las propiedades de la fase líquida y/o vapor son las mismas, es decir no hay diferencia visible ni medible entre gas y líquido. La sustancia más empleada es el CO₂ que en estas condiciones presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal). El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara, el líquido supercrítico al penetrar a la muestra,

solubiliza los aceites que son arrastrados, el solvente extractor (líquido supercrítico) se elimina totalmente por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, así se disminuye la pérdida de sustancias volátiles y se evita la formación de sabores y olores extraños (Martínez, 2003). El CO₂ no es tóxico ni explosivo, ni incendiario, es bacteriostático, clasificado por la FDA como GRAS (Generally Recognized As Safe). La temperatura y presión críticas para el CO₂ son P_c 73 bar y T_c 31°C (Guan *et al.*, 2007; Ciani *et al.*, 2002; Del valle y Aguilera, 1999). Este método presenta varias ventajas como: rendimiento alto, ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente y se puede reciclar; además las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no modifican químicamente los componentes de los aceites (Martínez, 2003).

□ *Hidrodestilación o extracción por arrastre con vapor:* Es la técnica más común para la obtención de AEs, el material vegetal se rompe por efecto de la temperatura del vapor de agua (100°C) en un cierto tiempo. El agua caliente penetra y se difunde a través de las membranas de las células de los tejidos, liberando el AE insoluble en agua, se condensa en el separador y se forman dos fases, una de AE y otra de agua a una temperatura menor que la del agua, (Vargas y Bottia, 2008; Wang *et al.*, 2009), donde los vapores generados se condensan y se colectan. La ventaja del método es que no requiere solventes orgánicos y se obtienen

aceites denominados "aromas y sabores naturales" (Stashenko *et al.*, 2003). Si el aceite presenta componentes solubles en agua, estos quedarán en la fase que puede comercializarse como tal, por ejemplo agua de rosas, agua de jazmín (Wang *et al.*, 2009).

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE LOS MICROORGANISMOS

Los aceites esenciales al ser mezclas complejas de numerosas moléculas con gran diversidad de grupos químicos, la actividad antimicrobiana no se debe a un mecanismo específico, ya que en las células hay diferentes sitios donde pueden actuar y los eventos pueden llevarse a cabo en forma independiente, simultánea o consecuente. Bosquez *et al.* (2009) y Maguna *et al.* (2006), proponen como posible sitio de acción, la membrana celular donde los terpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos que podrían provocar la muerte bacteriana. El carácter hidrofóbico de los AEs les permite incorporarse en los lípidos de las membranas bacterianas y mitocondriales perturbando su estructura y consecuentemente su permeabilidad, dando lugar a la fuga de iones y otros contenidos celulares vitales, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo (Bosquez *et al.*, 2009). Los AEs también podrían actuar sobre las proteínas embebidas en la membrana citoplasmática interfiriendo en la interacción lípido-proteína y afectando la actividad de enzimas como la ATPasa, disminuyendo la producción de

energía requerida para el funcionamiento celular. Otra posible acción sería la interacción directa de los componentes lipofílicos con las partes hidrofóbicas de la molécula de proteína (Singh *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

Algunas investigaciones de actividad antimicrobiana de aceites AEs de clavo y canela combinados (Valero y Salmeron, 2003; Burt, 2004; Goñi *et al.*, 2009), se realizaron para evaluar el crecimiento de bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella choleraesuis* y cuatro bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Enterococcus faecalis*. Se determinó que ejercen efecto antagónico sobre el crecimiento de *E. coli* y sinérgico en la inhibición de *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *Y. enterocolitica*.

En otros estudios, sobre el efecto antifúngico del AE de canela (Valero y Salmeron, 2003), y aceite esencial de clavo (Barrera y García, 2008), presentaron un efecto inhibitorio relevante sobre el crecimiento de *Fusarium proliferatum* y la producción de aflatoxinas cuando se aplicaba en nueces que se almacenaban por varios días, determinándose que se puede aplicar con seguridad en alimentos en grano y semillas, como conservantes y como sustitutos de fungicidas químicos. También, Bosquez *et al.*, (2009), determinaron efecto inhibitorio de extractos acuosos de clavo y canela a concentraciones de 5% y 10%, sobre el 100%

del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*, hasta 72 horas de incubación.

MÉTODOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIBACTERIAL DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los métodos actualmente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales son:

□ *Técnica de difusión en agar*: El método consiste en aplicar una cantidad determinada del extracto en estudio, en un disco de papel que se coloca sobre la superficie de la placa donde se ha distribuido el inóculo con el microorganismo sobre el que se quiere ver el poder antimicrobiano. Por gradiente de concentración, el extracto difunde alrededor del disco. La sensibilidad del microorganismo al extracto se relaciona con el tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano. Según el diámetro del halo de inhibición, los microorganismos se clasifican en: no sensibles ($d < 8\text{mm.}$), sensibles ($9\text{mm.} < d < 14\text{mm.}$), muy sensibles ($14\text{mm.} < d < 19\text{mm.}$) y extremadamente sensibles ($d > 20\text{mm}$) (Tajkarimia *et al.*, 2010; Burt, 2004).

□ *Método de dilución en medio de cultivo y en agar*: El extracto se incorpora al medio con agar cuando aún está líquido. Para lograr el rango de dilución deseado se preparan una serie de placas con diferentes

concentraciones del extracto. Los resultados se expresan como Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) o como Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB). CMI se define como la menor concentración del extracto que produce el 90% de reducción en el crecimiento de las colonias. La CMB se define como la mínima concentración del extracto que produce al menos un 99.9% de reducción en el crecimiento de las colonias. Si se usan medios líquidos, el procedimiento es el mismo, sólo que se usan tubos de ensayo para las diferentes diluciones. Ambos métodos permiten obtener datos cuantitativos (Tajkarimia, *et al.*, 2010; Burt, 2004).

LECHES SABORIZADAS

La leche es uno de los productos de origen animal más completo en cuanto a su composición nutricional, y de igual manera es un medio propicio para el crecimiento de microorganismos (Haro y Salazar, 2010). La leche se puede adicionar con una serie de sustancias que le proporcionan aroma y sabor, y la convierten en una bebida atractiva para quien la consume. El sabor más apetecido, desde lo sensorial y económico, es el chocolate que a su vez le aporta a la leche carbohidratos, grasas, proteínas y minerales, y se somete a tratamiento térmico de pasteurización para reducir al mínimo la carga microbiana y eliminar completamente los microorganismos patógenos, sin alterar su

composición y valor nutricional. Entonces se entiende por leche saborizada, "un producto higienizado obtenido a partir de una mezcla de leche fluida o leche recombinada, sometida a una adecuada relación de tiempo y temperatura para destruir la flora patógena y casi la totalidad de su flora banal, sin alterar de manera esencial su valor nutritivo, ni sus características fisicoquímicas y organolépticas, a esta leche se le han adicionado ingredientes y aditivos permitidos" (Ministerio de Salud, Resolución 2310 de 1986).

Las leches saborizadas con chocolate deberán cumplir los siguientes requisitos fisicoquímicos:

pH 6.5 – 6.85; Materia grasa para leches semidescremadas de 1.5 – 2.0% m/m y Proteína 2.3% mínimo.

Como requisitos microbiológicos: recuento de microorganismos mesófilos, máximo 50.000 UFC/ml, de coliformes máximo 10 UFC /ml, de *E. coli* y *Salmonella* 0 UFC /ml y recuento de sicrotrofos máximo 500.000 UFC /ml.

En la elaboración de la leche saborizada, pueden emplearse otros ingredientes y aditivos como: leche en polvo, leche condensada, crema de leche, mantequilla, extracto o jarabe de malta, derivados del cacao, azúcares, jugos o concentrados de frutas; los espesantes y/o estabilizantes autorizados, en cantidad no mayor a 5.0 g/kg. Estar exenta de grasa de origen vegetal o animal diferente a la láctea excepto las que provocan los ingredientes naturales y de sustancias tóxicas y

residuos de drogas o medicamentos. Cada porción de 250 ml debe contener desde el punto de vista nutricional aproximadamente: calorías 193, proteínas 6.3g, fósforo 181mg, calcio 240 mg, vitamina A 1560UI, vitamina B2 0.48 mg, niacina 6mg, (Min Salud, Resolución 2310, 1986).

BIBLIOGRAFÍA

Archila J. 2008. Estudio de los metabolitos secundarios de los extractos y aceites esenciales de flores, hojas y tallos de ylang-ylang, y determinación de los ácidos grasos en sus semillas; Bucaramanga, Colombia; Universidad Industrial de Santander.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Review. Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology. 46: 446-75.

Barrera L., García L. 2008. Antifungal activity of essential oils and their compounds on the growth of *Fusarium* sp. isolate from papaya (*Carica papaya*); Revista Científica UDO Agrícola, 8(1): 33-41.

Batish, D., Singh, H., Kohli, R., Kaur, S. 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. Forest Ecology and Management. 256 (12): 2166-2174.

Burt S., 2004. Review. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of food Microbiology 94: 223 -253.

Bosquez M, Bautista E, Morales J. 2009. Essential oils: biopreservatives of High potential in the food industry. Universidad Autónoma Metropolitana.; Mexico.

Carhuapoma M., P. Bonilla, S. Suárez, R. Vila, S. López. 2005. Estudio de la composición Química y antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "arrayán". Facultad de Farmacia y bioquímica. Ciencia e Investigación. 8 (2): 72-79.

Ciani G, G. Chancalay, A. Girotti, A, Glusman, L. Pacheco. 2002. Extracción de aceites con fluido supercrítico. Invenio 5 (9): 125 – 130.

Del Valle J, Aguilera D. 1999. Review: High Food pressure CO2 extraction. Fundamentals and applications in the food industry. Science and Technology International (5): 1-24.

Draughon, F.A. 2004. Use of botanicals as biopreservatives in foods. Food Technology 58 (2), 20-28.

García C, Quezada Y, Moreno J, Sánchez G, Moreno E, Pérez M. 2006. Actividad antifúngica de los aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare*L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. Revista Mexicana de Fitopatología. 24:1.

Goñi, P., P. López, C. Sánchez, R., Gómez-Lus, R., Becerril, C., Nerín. 2009.

Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chemistry. 116(4): 982-989.

Guan, W., S. Li, R. Yan., S. Tang., C. Quan. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry* 101(4):1558-1564.

Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. 2008. The antimicrobial efficacy of plants essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 124: 91-97.

Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology* 26: 142-150.

Guynot, M.E.; Marín, S.; Setó, L.; Sanchis, V.; Ramos, A.J. 2005. Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. *Food Science and Technology International*. 11 (1), 25-32.

Haro, K., Salazar E. 2010. Proyecto de estabilidad de la leche saborizada con licor de cacao. Escuela Superior Politécnica del Litoral. PROTAL. Guayaquil.

Juárez J, Castro A, Jaúregui J, Carhuapoma M, Choquesillo F, Félix L, Cotillo P, López J, Jaramillo M, Córdova A, Ruiz J, Ramos N. 2010. Composición Química, actividad antibacteriana del aceite esencial de

Citrus sinensis L. (Naranja Dulce) y formulación de una forma farmacéutica. Ciencia e Investigación. 13(1): 9 – 13.

Kwon-Keun H., W. Jeon, S. Hwang, C. Lee, J. So, J. Park, B. Ko and S. Im. 2009. Cinnamon extract suppresses tumor progression by modulating angiogenesis and the effector function of CD8+ T cells Cancer letters 278 (2): 174-182.

López A., Barreto J., Palou E., San Martín F. 2007. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. Food Control 18: 1358–1362.

Maguna F, Romero A, Garro O, Okulik N. 2006. Mecanismos de acción de los Aceites Esenciales. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste; Martínez M., Alejandro. 2003. Aceites Esenciales. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia.

Meza, M., N. Gonzalez,., A. Usubillaga. 2007. Composición del aceite esencial de *Origanum majorana* L. extraído por diferentes técnicas y su actividad biológica. Revista Facultad de Agronomía. 24 (4): 725-38.

Ministerio de Salud de Colombia. Resolución 2310 de 1986 “Por la cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979, en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de Lácteos”.

Nejad S., Hadian J., Mirjalili M., Somboli A., Yousefzadi M. 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Química de los alimentos*. 110(4): 927-931.

Orberá Ratón T. 2004. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Rev Cubana Salud Pública*; 30(3). Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/spu/vol30_3_04/spu16304.htm, consultado enero 12 de 2012.

Patiño A., Murillo E., Méndez J. 2007. Actividad antioxidante y antimicrobiano de los volátiles de cuatro variedades de albahacas cultivadas en el departamento del Tolima. *Scientia et Technica*. 33: 401-403.

Sánchez C. F., 2006. Extracción de Aceites Esenciales. Experiencia Colombiana. II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

Sheng-Yang, W., C., Pin-Fun, C., Shang-Tzen. 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 96 (7): 813-818.

Singh G., Kapoor I., Singh P., Heluani C., Lampasona M. 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology* 46: 3295-302.

Stashenko, E. (2000). Estudio prospectivo de aceites esenciales colombianos de interés industrial. Universidad Industrial de Santander. 18(1):645-6737.

Stashenko E, Jaramillo B, Martínez J. 2003. Comparación de la composición química de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. Rev Acad Colomb Cienc. 27 (105): 579-97.

Tajkarimi M.M., S.A. Ibrahim, D.O. Cliver. 2010. Review. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21: 1199–1218.

Valero M., Salmeron., M. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. International Journal of Food Microbiology 85: 73– 81.

Vargas A, Bottia E. 2008. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y El Peñón -Santander, Colombia. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.

Wang, R., R. Wang, B. Yang. 2009. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10(2): 289–292.

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE ACEITES
ESENCIALES DE CLAVO (*Syzygium aromatum*) Y CANELA
(*Cinnamomum verum*), SOBRE *Rhodotorula mucilaginosa* EN
LECHE CHOCOLATADA.**

EVALUATION OF THE INHIBITORY CAPACITY OF ESSENTIAL OILS OF
CLOVE (*Syzygium aromatum*) AND CINNAMON (*Cinnamomum
verum*) ON *Rhodotorula mucilaginosa* IN CHOCOLATE MILK.

María Victoria Castaño Sepúlveda¹

Resumen.

Se evaluó la aplicación de aceites esenciales de clavo y canela como posibles conservantes naturales en leche saborizada con chocolate, que

permitan sustituir los aditivos sintéticos usados en la industria de los productos lácteos. Los aceites esenciales fueron extraídos por el método de hidrodestilación, identificados por CG/EM y aplicados *in vivo*, en las dosis que presentaron la mayor capacidad inhibitoria sobre la *R. mucilaginosa*, AEs de clavo y canela al 2% cada uno, y combinados al 50% y se compararon con el testigo (0.625% benzoato+ 0.625% sorbato).

¹ Estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agrarias. A.A. 1779. Medellín, Colombia. mavicase@gmail.com

El análisis de varianza mostro efecto significativo del aceite esencial de canela y clavos y su combinación sobre la acción inhibitoria contra el crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa*. La prueba de aceptación sensorial mostro un bajo grado de aceptación para las muestras con mayores cantidades de los AEs, derivado del mayor número de calificaciones indicadoras de rechazo por parte de los consumidores.

Palabras claves: actividad antimicrobiana, aceites esenciales, *Cinnamomum verum*, *Syzygium aromaticum*, leche chocolatada.

Abstract.

We evaluated the application of essential oils of clove and cinnamon as potential natural preservatives in milk flavored with chocolate, for replacing synthetic additives used in the dairy industry. The essential oils were extracted hydrodistillation method, identified and applied in vivo by CG/EM, at doses that had the highest inhibitory activity on *R. mucilaginosa*, cloves and cinnamon to 2% each and 50% combined and compared with the control (0.625% + 0.625%, sorbate + benzoate). The analysis of variance showed significant effect of the essential oil of cinnamon and cloves, and their combination on the inhibitory action. Furthermore, sensory acceptance test performed indicating a very low level of acceptance for samples containing higher amounts of oils, this derivative of the greater number of scores indicating rejection by consumers.

INTRODUCCIÓN

La leche es un producto reconocido por sus atributos organolépticos y nutricionales como fuente de calcio y vitaminas con alto contenido de agua que la ponen a la vanguardia de los alimentos altamente perecederos, por lo que requiere de la aplicación de procesos que mejoren su conservación. La principal causa de su deterioro es el ataque

por diferentes tipos de microorganismos, bacterias, levaduras y mohos (Orbera, 2004).

La presencia de microorganismos alterantes trae implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes como para los distribuidores y consumidores, por otra parte, los alimentos alterados pueden resultar perjudiciales para la salud del consumidor, teniendo en cuenta que algunos microorganismos producen sustancias altamente tóxicas.

Existen razones poderosas para evitar la alteración de los alimentos, además de los métodos físicos, existen asociaciones con sustancias químicas que causan la muerte de los microorganismos o que al menos evitan su crecimiento, pero también pueden causar daño en la salud de las personas (Tajkarimi *et al.* 2010).

Los consumidores actuales, reconocen la importancia del uso de sustancias naturales que puedan prolongar la vida útil de los alimentos y han obligado a la industria a buscar alternativas más sanas y naturales, de esta forma, se ha venido investigando el uso de extractos de plantas que puedan ser aplicadas sin efectos colaterales (Patiño *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 2007; Burt, 2004). Muchos alimentos contienen de forma natural sustancias con actividad antimicrobiana, por ejemplo frutas contienen diferentes ácidos orgánicos como el ácido benzoico o el ácido cítrico; en yogures su estabilidad se debe al ácido láctico producido

durante la fermentación, mientras que los ajos, las cebollas y otras especias contienen potentes agentes antimicrobianos. Algunos estudios han demostrado la acción conservante de los aceites esenciales los cuales prometen competir con el amplio mercado de los agentes químicos y/o sintéticos, obligando a disminuir su uso ya que estos son altamente tóxicos y la gran mayoría son bio-acumulables después de un largo tiempo de aplicación, y se tornan inocuos para muchos microorganismos patógenos (Bosquez *et al.*, 2009). En los últimos años se han realizado investigaciones tendientes al uso de aceites esenciales, especias y plantas como conservantes en alimentos (Rodríguez, 2011; Suarez *et al.*, 2010; Ardila *et al.*, 2009), teniendo en cuenta la sabiduría popular desde tiempos antiguos, se han utilizado diferentes sustancias, alimentos y plantas con poder desinfectante, entre ellas condimentos como pimentón, azafrán y cebolla, y especias como canela y clavo y plantas aromáticas como tomillo, romero y orégano (Marcen, 2000).

Los AEs de hierbas y especias como la canela y el clavo (Lopez *et al.*, 2007; Goñi *et al.*, 2009), se han consumido históricamente y tienen demostrada su inocuidad en humanos.

Los aceites esenciales (AEs) son una compleja mezcla natural de metabolitos secundarios volátiles, (Sánchez, 2006), definidos por unidades de 5 carbonos llamadas isoprenos y se dividen en dos clases: monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15) e incluyen a otros grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, cetona y ésteres, (Juárez, 2010),

aislados de plantas mediante diferentes métodos como: destilación, extracción con solventes, enfleurage, extracción por prensado, extracción con fluidos supercríticos y extracción por arrastre con vapor o hidrodestilación. Los principales constituyentes de los AE son mono y sesquiterpenos (Burt, 2004), los que son responsables de la fragancia y propiedades biológicas de las plantas, y que han sido utilizados en el campo de la cosmética, la conservación de alimentos y la aromaterapia (Martínez *et al.*, 2003), presentan también capacidad antioxidante y anticancerígena (Ardila *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2006). Otros, cumplen actividad biocida contra una variedad de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas (Moreno *et al.*, 2006). Se han atribuido excelentes propiedades antimicrobianas para AE de orégano, cilantro, canela, tomillo, romero, mostaza, salvia, clavo y jengibre (Suarez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Ardila *et al.*, 2009; Bajpai *et al.*, 2008; García *et al.*, 2006; Velluti *et al.*, 2003; Vásquez *et al.*, 2001).

A pesar del uso de tratamientos térmicos y barreras físicas empleadas en los alimentos que ayudan a garantizar una población microbiológica banal, los hongos y las levaduras son microorganismos que pueden llegar a los alimentos a través de sus esporas, los cuales pueden soportar condiciones ambientales adversas y producir eventualmente metabolitos tóxicos que representan un riesgo para la salud de los consumidores (García *et al.*, 2006). Aunque el papel de las levaduras es secundario en la

contaminación microbiana de alimentos, las condiciones ambientales de preservación de estos, que tienden a inhibir el crecimiento de bacterias, favorecen la aparición de levaduras contaminantes (Orberá, 2004). La mayoría de las levaduras en los alimentos pueden producir enzimas, proteasas, lipasas, hidrolasas, entre otras, capaces de descomponer diversos sustratos que provocan el deterioro y la pérdida del valor nutricional y comercial del producto (Centeno y Rodríguez, 2005), son importantes por su capacidad de realizar la descomposición mediante la fermentación de diversos cuerpos orgánicos; principalmente los azúcares o hidratos de carbono produciendo distintas sustancias, son oxidativas, fermentativas, o bien su actividad metabólica es a la vez de ambos tipos, (Liboa et al.2003) . Una de las levaduras más comunes en productos lácteos refrigerados es la *Rhodotorula mucilaginosa* (Stratford y James, 2003; Bleve et al., 2003), principalmente debido a la adición de frutas y saborizantes en polvo (Orberá, 2004). La levadura *Rhodotorula mucilaginosa* posee una amplia distribución en la naturaleza, tiene la capacidad de colonizar múltiples sustratos naturales y artificiales, por lo que se considera una levadura ubicua, además presenta una asombrosa capacidad de adaptarse a ambientes extremos como glaciares y ambientes ácidos, (Guaman y Carvajal, 2009; Libkind, 2007); se ha considerado un patógeno emergente, dado que puede causar infecciones en huéspedes inmunocomprometidos. Se caracteriza por la coloración rojo salmón de

sus colonias debido a la acumulación de pigmentos carotenoides como torularodina, toruleno y β caroteno. (Libkind, 2007).

Estudios realizados (Agaoglu *et al.*, 2007; García *et al.*, 2006; Chalfoun *et al.*, 2004; Patckar *et al.*, 1994), demuestran que los AEs de canela y clavos poseen actividad fungicida e inhibitoria, y han sido evaluados en la inhibición de hongos productores de aflatoxinas en granos y cereales (Agaoglu *et al.*, 2007; García *et al.*, 2006; Chalfoun *et al.*, 2004; Patckar *et al.*, 1994), y en la inhibición del crecimiento de bacterias gram-negativas como *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, y *E. coli* O157:H7 (Tajkarimi *et al.*, 2010; López-Malo *et al.*, 2007; Kalemba y Kunicka, 2003), esporas de *Clostridium* Sulfito reductor y *Salmonella* (Ardila *et al.*, 2009), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium smegmatis* y *Micrococcus luteus* (Agaoglu *et al.*, 2007).

Los antimicrobianos de origen natural deberá ser comprobado su eficacia "in vitro", antes de aplicárseles a los alimentos para determinar la verdadera función frente al compuesto (Rodríguez, 2011), es por esto que el potencial antimicrobiano de los AEs de canela y clavo se ha evaluado *in vitro* en varios estudios, pero son pocas las investigaciones en las que se ha determinado *in vivo*, el efecto protector en alimentos, como por ejemplo en leche y derivados. (López *et al.*, 2007; García *et al.*, 2006), como la leche chocolatada, objeto de este estudio que aunque es un producto que lidera el mercado de las leches saborizadas por ser un

alimento sensorial y nutricionalmente atractivo, es muy susceptible a la descomposición por el ataque de microorganismos diversos, entre los que se encuentran las levaduras cuyo efecto es más evidente por la producción de gases, existe el interés en prolongar su vida útil sin la adición de sustancias que puedan tener efectos colaterales en la salud de los consumidores.

El propósito del presente estudio fue evaluar el efecto conservante de los AEs de clavo y canela, con determinación previa de la concentración mínima inhibitoria (CMI), *in vitro*, adicionados a la leche saborizada con chocolate y contaminada con *Rhodotorula mucilaginosa*, levadura cuya prevalencia se evidenció en varios ensayos realizados en planta, y confrontados con dos conservantes químicos, sorbato de potasio y benzoato de sodio, considerados como aditivos GRAS (“generalmente reconocidos como seguros y son activos contra levaduras”), muy empleados en la industria de los alimentos y por ende en la de los derivados lácteos, (Romero, et al, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en los laboratorios de Bromatología y Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Material vegetal. Para la obtención de los aceites esenciales se utilizaron especias de clavos (*Syzygium aromaticum*) y canela

(*Cinnamomum verum*), obtenidas en la Central Mayorista de la ciudad de Medellín, empacados en bolsas de polipropileno y se almacenaron mientras se realizaba la destilación, en lugar aireado y seco y a una temperatura de 20°C.

Extracción de los aceites esenciales (AE). Se utilizó la técnica de hidrodestilación y arrastre con vapor, descrita por Vásquez *et al.*, 2001; Juárez *et al.*, 2010; Cerpa, 2007, para la obtención de los aceites esenciales de las especies clavo y canela, utilizando un equipo Clevenger, se tomaron aproximadamente 30 gramos de cada uno de las especias (canela y clavo) molidas, se agregó agua destilada suficiente para cubrir totalmente la muestra (aproximadamente 200ml), finalmente se calentaron en una manta de calentamiento hasta el punto de ebullición 96°C durante 2 horas. Como producto se obtuvieron dos fases, una de aceite esencial y otra de agua, posteriormente al condensado obtenido se le realizó la separación y los Aes se recolectaron en un separador de fases. El material se pesó para determinar el rendimiento de los AEs siguiendo la siguiente fórmula, (Roldán F. 2010):

$$\% \text{ de concentración de aceite} = \frac{\text{Cantidad aceite recuperado (g)}}{\text{Cantidad de material (g)}}$$

Las muestras fueron envasadas en frascos ámbar y almacenadas a una temperatura de 4°C±0.2°C hasta el momento de su caracterización y uso.

Propiedades fisicoquímicas y organolépticas. Las propiedades fisicoquímicas de los AEs de canela y clavo fueron determinadas a 20°C, las densidades relativas se evaluaron mediante la relación del peso y el volumen ocupado en una micropipeta por cada uno de los aceites, se empleó una balanza analítica marca Perkin Elmer y los índices de refracción fueron medidos con un refractómetro *ABBE* Atago Model 60/ED (Bellinghan+Stanley Ltd).

Las propiedades organolépticas: color, se evaluó con un patrón de colores para aceites esenciales, mientras que el olor y el sabor, fueron caracterizados por un panel.

Caracterización de los aceites esenciales. La identificación cualitativa de los compuestos químicos presentes en los AEs, se utilizó un Cromatógrafo de Gases combinado con un Espectrómetro de Masas (CG/EM), (6890N-G1530N), Agilent Tech., USA., equipado con una columna capilar de Helio e Hidrógeno como gas de arrastre, (Ruiz 2008). El CG/EM fue operado mediante la inyección de alícuotas de 0.5ml, con el siguiente programa de temperatura: se inicio a 50°C, se incremento a 325°C a razón de 5°C/min, luego se bajó a 250°C y se mantuvo por 60 minutos. Los componentes de los aceites esenciales fueron identificados por comparación computarizada de los espectros de masas con los compilados por la librería NIST 98. Cada muestra fue analizada por triplicado por ambas columnas.

Aislamiento y conservación de la cepa de la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* obtenidas a partir de leche saborizada con chocolate.

Bajo condiciones de higiene se tomaron 3 muestras de 10ml de leche saborizada con chocolate y se realizaron 6 diluciones utilizando agua peptonada al 0,1%. Se tomó 1mL de la dilución 10^{-6} y se realizó la siembra en superficie en agar YGC (Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol), de acuerdo a norma AOAC 17.2.02 (AOAC, 1998).

Seguidamente las placas fueron incubadas a 27°C durante 5 días e inmediatamente se realizó el recuento del número de colonias por gramo (UFC/g) a cada una de las muestras analizadas. Se identificaron macroscópicamente las levaduras según características de color, brillo, tamaño, propias de las colonias y fueron aisladas en Agar Glucosa y Cloranfenicol (AGC) a 27°C, siguiendo la técnica descrita por (Baraggio *et al.*, 2007), luego se les realizó la identificación bioquímica mediante el método API - C aux ®(BioMérieux): (Proceso automático de identificación) (López *et al.*, 2010), en el laboratorio de microbiología del Instituto Universitario Colegio Mayor de Antioquia.

El cultivo identificado fue mantenido en Agar Glucosa y Cloranfenicol (AGC) con incubación a 27°C por 5 días, luego se llevo a refrigeración a 4°C y se repico cada semana para mantener su actividad durante la ejecución del trabajo.

Preparación del patrón y el inoculo. Para estandarizar la densidad del inoculo se utilizo una suspensión de sustrato base con un estándar de turbidez que corresponde a un 0.5 de Mc Farland. La densidad se corroboró con un espectrofotómetro luego de preparado el patrón que corresponde a 1.0×10^6 ufc/ml. (Jiménez, 2006). A partir de un cultivo puro se tomo una asada de colonias y se suspendió en 5 ml de solución salina fisiológica estéril y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda de 600nm), se ajusto a la densidad óptica hasta alcanzar la concentración aproximada equivalente al patrón (1.0×10^6 ufc/ml), el cual se denomino cultivo estandarizado.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se determinó *in vitro* mediante la técnica de difusión en placa, (Tajkarimia *et al.*, 2010; Burt, 2004); del cultivo estandarizado se tomo una asada y se extendió sobre la superficie de una placa de Agar Mueller Hinton, (Cona, 2002), inmediatamente y bajo condiciones asépticas, se colocaron discos vacíos de papel filtro Whatman de 5mm de diámetro y esterilizados en autoclave

los cuales fueron impregnados con 1 microlitro de aceite esencial de canela y clavo previamente esterilizados y en concentraciones de 0.1%, 0.3%, 0.5%, 1.0%, 1.5% y 2.0% respectivamente. Cada concentración fue comparada con un testigo positivo, sorbato de sodio y benzoato de potasio al 0.625%, mientras que como control negativo se utilizo agua estéril. Las cajas fueron incubadas a 27°C por 5 días. Una vez transcurrido

este tiempo, se midió el halo con una regla milimétrica. Para cada ensayo se realizaron 5 repeticiones en el tiempo.

Evaluación de AE en muestras de leche saborizada. Para la elaboración de la leche chocolatada, se siguió el protocolo que tiene establecido la Universidad Nacional: se tomó leche semidescremada líquida al 1.8% la cual fue adicionada con sacarosa (10%), cocoa (2%) y carragenina (0,1%) y sometida a homogenización en un equipo ultraturrax (UTL 50 INLINE Janke & Kunkel IKA-Labortechnik) a 2000 rpm, seguidamente se pasteurizó a 85°C por cinco minutos y posteriormente fue enfriada a 12°C utilizando un baño de hielo y finalmente envasadas en recipientes flexibles coextruidos con barrera a los gases de 150 ml, a los cuales se les adicionó cada uno de los AEs de canela y clavo según los niveles de evaluación determinados como CMI, además de la muestra: control positivo (Benzoato de sodio y Sorbato de potasio) y del control negativo (leche sin conservante) y a todas se les adicionó el microorganismo de prueba (*Rhodotorula mucilaginosa*) previamente activado en una concentración 1×10^6 ufc/ml, luego se almacenaron en refrigeración a 4°C. Las muestras obtenidas fueron evaluadas cada tres días durante su vida útil (15 días), en términos de recuento total de levaduras utilizando Agar Glucosa y Cloranfenicol (CGA), de acuerdo a la norma AOAC 17.2.02 (AOAC, 1998). Las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Los datos tomados fueron analizados estadísticamente usando el análisis de varianza (test de Anova). El nivel de significación establecido previamente fue de $p < 0.05$ y las medias fueron comparadas usando Student t-test.

Pruebas de aceptación por el consumidor. Se realizó una prueba hedónica con un panel no entrenado de 30 personas (estudiantes consumidores habituales), con edades comprendidas entre 20 y 23 años, la cual se realizó en un período de 48 horas de elaborado el producto (una vez se estabilizó el producto) y al final de la vida útil (15 días), con el fin de evaluar el grado de aceptación o rechazo del producto adicionado con los AE.

Se utilizó una escala de cinco puntos, comprendidas entre 1 "me disgusta mucho", 3 pasando por ni me gusta ni me disgusta, hasta 5 "me gusta mucho". Las muestras fueron codificadas con números aleatorios de 3 dígitos y a cada juez le fue dado 50ml de la muestra (Anzaldúa-Morales, 1994).

Se utilizó un análisis de varianza, para evaluar las diferencias entre el producto patrón y los adicionados con AE con un nivel de significancia del < 0.05 , utilizando el programa estadístico SAS versión 9.0.

Análisis estadístico de la información. El análisis de datos se realizó a través de un arreglo factorial $2 \times 2 \times 6$ (2 niveles de aceite de clavos, 2 niveles de aceite de canela y 6 tiempos), que dieron lugar a 24

combinaciones de tratamientos realizadas en dos ocasiones (bloques). Para cada ocasión se realizó diferente aleatorización.

Los resultados fueron analizados a partir de ANOVAS, utilizando el método LSD (mínimas diferencias significativas) como método de comparaciones múltiples, con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha = 0.05$), por medio del programa estadístico SAS versión 9.0.

RESULTADOS

Características de los aceites esenciales:

En la **tabla 1** se muestran las características organolépticas y las propiedades físicas de los AEs de canela y clavo extraídos.

Tabla 1. Principales características de los aceites esenciales de clavo y canela.

ACEITE ESENCIAL CARACTERISTICAS	ACEITE ESENCIAL CLAVO	ACEITE ESENCIAL CANELA
Densidad relativa (25°C)	1,041g/ml	1,062g/ml
Índice de refracción (20°C)	1,409	1,597
Olor	Muy aromático, característico a clavo	Muy aromático, característico a canela
Color	Amarillo fuerte	Amarillo claro
Sabor	Muy picante	Muy picante
Aspecto general	Líquido fluido transparente	Líquido fluido transparente

Porcentaje de rendimiento de los AEs.

El porcentaje de rendimiento obtenido se presenta en la tabla 2, resulta del promedio de 3 réplicas de los AEs obtenidos de canela y clavo y calculados según la ecuación propuesta.

Tabla 2. Rendimiento de extracción de los AEs de canela y clavo

ESPECIA	% DE RENDIMIENTO
Canela	0.6
Clavo	3.1

Caracterización de los aceites esenciales

Los perfiles cromatográficos de los metabolitos secundarios obtenidos experimentalmente por CG-EM de cada uno de los AE de canela y clavo, se muestran en las Figuras 2 y 3 respectivamente, encontrando que el componente mayoritario eluido de la cromatografía de gases para el AE de clavo es el Eugenol y el Cinamaldehído para el AE de canela.

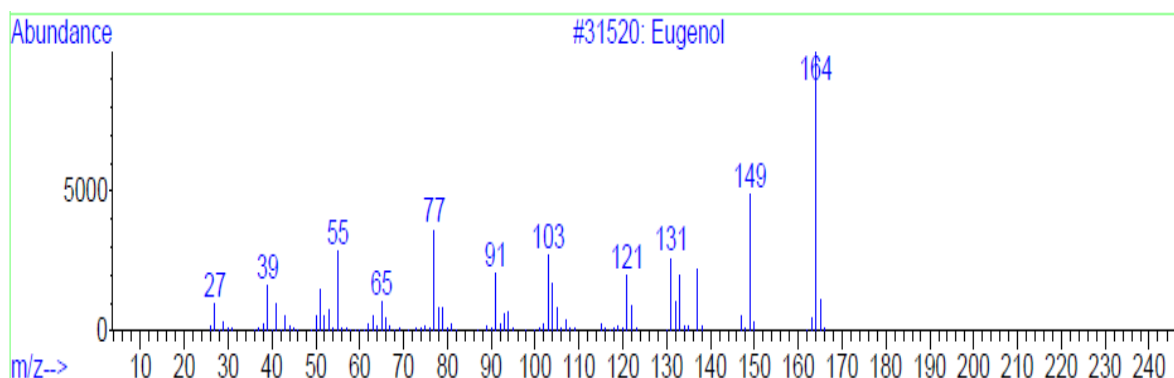


Figura 2. Perfil cromatográfico para el aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) obtenido por hidrodestilación y arrastre con vapor.

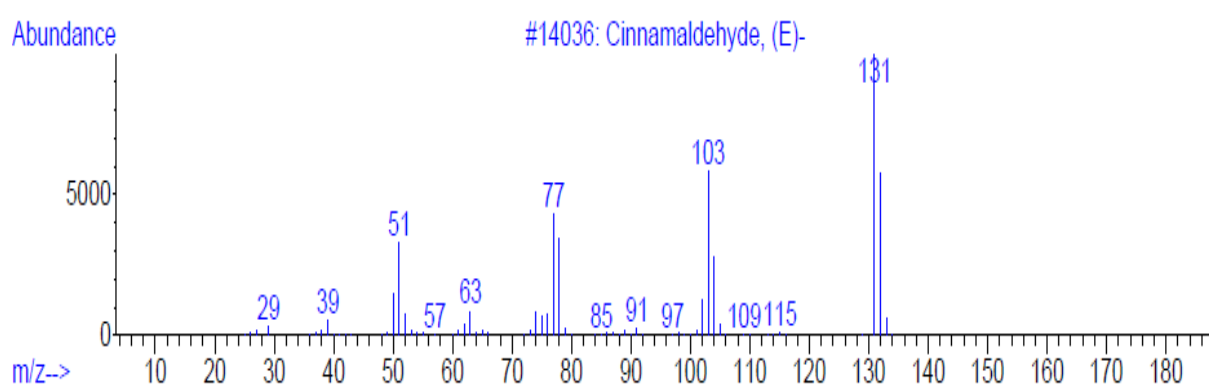


Figura 3. Perfil cromatográfico para el aceite esencial de canela (*Cinnamomum verum*) obtenido por hidrodestilación y arrastre con vapor.

En la Tabla 3 se muestra los resultados de los análisis (promedio de tres repeticiones), de los principales componentes identificados en el AE de clavos y el tiempo de retención de cada uno, encontrándose en abundancia del 98% el Eugenol, con un tiempo de retención de 21.5 minutos.

Tabla 3: Abundancia relativa de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de Clavo (*Syzygium aromaticum*).

COMPONENTE MAYORITARIO	PORCENTAJE	TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)
Etil cetona	90	8.9
Acetato de bencilo	97	10.98
Acido salicílico	95	11.7
Fenilo, 2-metoxi-3- (2-propenil)	98	16.3
Eugenol	98	21.5
Eugenil acetato	95	23.7

La Tabla 4 muestra los principales componentes identificados en el AE de canela en porcentaje y su ordenamiento de acuerdo al tiempo de retención. Encontrándose en mayor proporción (97%), los componentes el A-terpineno, Eugenil-acetato y Cinamaldehído, los cuales presentaron tiempos de retención de 7, 22.4 y 27 minutos respectivamente.

Tabla 4: Abundancia relativa de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum verum*).

COMPONENTE MAYORITARIO	PORCENTAJE %	TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)
p-menta-1,5-dieno	90	68
m-cimeno	91	7.4
A-terpineno	97	7.8
α -ocimeno	96	8.0
α -pineno	95	8.2
Terpinoleno	96	9.5
Linalol	95	21.8
Eugenil acetato	97	22.4
Cinamaldehído	97	27.0
Benzoato de	96	27.0

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

En la tabla 5 se aprecian las medidas de los halos de inhibición en cm, (promedio de cinco repeticiones) de las dosis empleadas de los AEs de canela y clavos obtenidas mediante la técnica de difusión en placa y comparadas contra control positivo (benzoato de sodio+sorbato de potasio).

Tabla 5: Medida del halo de inhibición de acuerdo a la dosis de los AEs de clavos y canela y el testigo (cms).

Dosis	Canela	Clavos	Control
%	(cm)	(cm)	(cm)
0.1	0.425	0.26	0.22
0.3	0.35	0.35	0.24
0.5	0.38	0.325	0.225
1	0.4	0.5	0.28
1.5	0.82	0.58	0.2
2	1.44	0.72	0.14

Tabla 6: ANOVA para los Aceites esenciales de clavo y Canela y las dosis determinadas.

	Num	Den		
Effect	DF	DF	F Value	Pr > F
A	2	43	52.21	<.0001
D	5	43	20.54	<.0001
A*D	10	43	11.99	<.0001

La tabla 6 muestra el resultado del ANOVA donde A= aceite esencial y D=dosis, todos los efectos son significativos tanto los principales de aceite y de dosis como el efecto de interacción. Según el valor p para el tratamiento A resulto ser significativo para la inhibición del crecimiento de la *Rhodotorula mucilaginosa* ya que $p < \alpha$ (0.05), de igual manera fue significativa la dosis y también la interacción entre los aceites y las dosis e la inhibición del crecimiento de la levadura.

Puede apreciarse en la Figura 4 que para dosis hasta 1% es muy similar la respuesta entre los tres tratamientos, siendo ligeramente superior la de AE de clavos y canela que la del testigo (S+B), sin embargo para dosis de 2.0% las respuestas adquieren mejores resultados en la CMI sobre la *R. mucilaginosa* con un halo de inhibición mayor de 1cm.

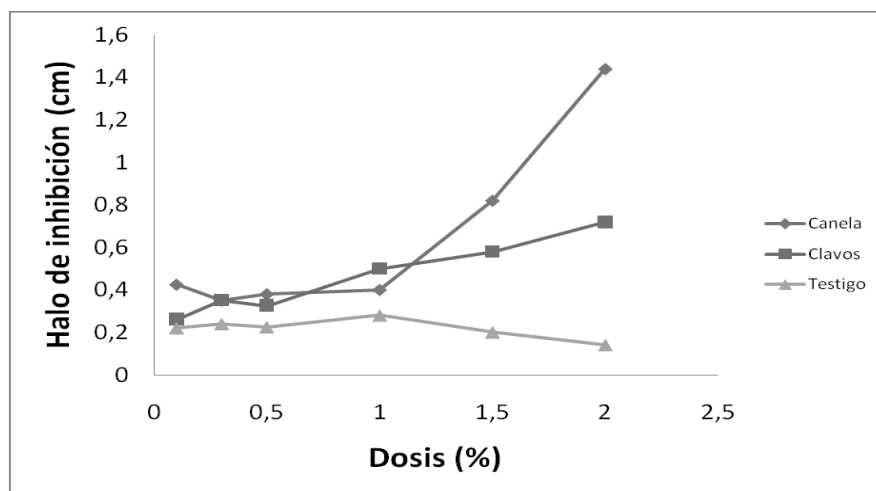


Figura 4. Actividad inhibitoria sobre *Rhodotorula mucilaginosa* según la concentración de los AEs de canela y clavos y testigo (B+S), expresadas en diámetro de halo (cm).

Evaluación de AE en muestras de leche saborizada.

La tabla 7 presenta los resultados del número de UFC/ml a través del tiempo de almacenamiento para los AE y la mezcla de conservantes comerciales. El análisis de varianza no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) en el número de UFC/ml de *R. mucilaginosa* en las muestras de leche saborizada con chocolate, por efecto del tipo de AE ni de la dosis aplicada a través del tiempo de almacenamiento. El tratamiento testigo,

mezcla de benzoato y sorbato (B+S), conservantes comerciales, presentó diferencias a través del tiempo de almacenamiento, con un aumento pronunciado a partir del día 6.

Tabla 7. Crecimiento promedio en número de UFC/ml de *R. mucilaginosa* en muestras de leche saborizada (dilución 1×10^{-6}).

Tratamiento	1%canela+1%clavo	2%clavo	2%canela	testigo
Día 0	0	0	0	0
Día 3	0	0	0	0
Día 6	0	0	0	1.5×10^{-6}
Día 9	0	0	0	2.7×10^{-6}
Día 12	0	0	0	3.5×10^{-6}
Día 15	0	0	0	6.5×10^{-6}

Análisis sensorial

La tabla 8 presenta las calificaciones de los jueces para los tratamientos con AE en leche saborizada. El ANOVA presentó diferencias significativas entre el producto patrón y los adicionados con AE ($p < 0.05$). Los productos con mayores adiciones de AE presentaron los mayores puntajes de rechazo entre el panel de consumidores.

Tabla 8. Calificación de la prueba de aceptación por el panel de consumidores

Calificación	Clavo 2%	Canela 2%	Canela1% +Clavo	Testigo
Indicador				
1 me disgusta mucho	10	8	3	

2 me disgusta	15	14	10	
3 ni me gusta ni me	5	6	10	9
4 me gusta	-	2	7	17
5 me gusta mucho	-	-	-	4

DISCUSIÓN

Rendimiento de los AEs

El rendimiento de los AEs de las especias canela y clavo, expresado en porcentaje (gramos de aceite obtenido por cada 100 gramos de muestra), fue de 0.6 y 3.1%, respectivamente, concuerda con lo obtenidos por De la Torre y López, 2010 y Rea, 2011, quienes obtuvieron valores entre 0.01 y el 3.0%, a diferencia de Wang et al, 2009, en estudios sobre el rendimiento de cinco especies de canela, encontraron que para *C. cassia*, *C. zeylanicum*, *C. pauciflorum*, *C. tamala* y *C burmanii* los rendimientos fueron 1.54%, 1.50%, 1.36%, 0.72% y 0.78% respectivamente, mencionando que los resultados pueden variar según la especie de origen, así mismo que la cantidad de aceite obtenida depende del método de extracción, de los cuales la Hidrodestilación es el que presenta mayor rendimiento, igualmente el más usado a nivel industrial por su sencillez y bajo costo, además la naturaleza del aceite no se ve afectada durante la extracción. (Marquez, 2003; Monsalve, 2007).

Caracterización de los aceites esenciales de clavo y canela.

Los resultados obtenidos coinciden con los encontrados por Gende *et al.*, 2006, sin embargo, las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de los AEs en general, son muy diversas, puesto que en el material vegetal se combinan sustancias heterogéneas y la composición cambia de acuerdo a la época de recolección del material, del lugar geográfico, modo de cultivo, métodos de almacenamiento, manejo, edad y actividad biológica, lo que influye directamente sobre sus características (Rea, 2011).

La caracterización cualitativa del AE de canela coincide con López-Malo *et al.*, 2007, quienes mencionan la presencia de sustancias del tipo aldehído, alcohol, alcanos, alquenos, cetonas, éteres y sulfuro (Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005), el eugenol, Alpha-phellandrene, M-cimeno y benzoato de bencilo, fueron los componentes con mayor área encontrados y el cinamaldehido, α pineno y linalol encontrados con áreas menores de 1.0%, como lo reporta Wang *et al.* 2009, quienes evaluaron los compuestos de los aceites esenciales en hojas de canela de la especie *Cinnamomum zeylanicum* ó *Cinnamomum verun* e indicando la presencia de sesquiterpenos y monoterpenos (Vásquez *et al.*, 2001). De igual manera, la caracterización cualitativa del AE de clavo, del presente estudio concuerda con lo encontrada por Tajkarimi *et al.*, 2010; López-Malo *et al.*, 2007 y Kalemba y Kunicka, 2003.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los AE derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos (Tajkarimi *et al.*, 2010; López-Malo *et al.*, 2007). Los estudios “*in vitro*” realizados con AEs han demostrado que la actividad antimicrobiana está influida por el medio de cultivo, temperatura de incubación y tamaño del inóculo utilizado (Skandamis and Nychas, 2003).

El análisis de varianza mostró que las variables AEs de canela y clavo tuvieron un efecto significativo (a un nivel de confianza del 95%), sobre el crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa*, posiblemente atribuida a la efectividad en la inhibición de microorganismos de los compuestos mayoritarios Cinamaldehído y el Eugenol presentes en estas especias (Acosta *et al.*, 2003).

Mientras que Kalemba y Kunicka (2003), mencionan que el eugenol y carvacrol y los derivados fenólicos del aceite esencial de clavo, causan cambios morfológicos en los mohos como el *Cladosporium herbarum*, su micelio es traumatizado y se vuelve frágil, con protuberancias similares a vesículas; se rompen las hifas, hay variación en su diámetro y disminución en el número de esporas, igualmente señalan que estas deformaciones morfológicas se relacionan posiblemente con la acción del eugenol y carvacrol sobre algunas enzimas de la pared celular como las quitinasas y las glucanasas; las cuales producen escape y coagulación del

citoplasma, así mismo los AE también inhiben la síntesis de DNA, RNA, proteínas y polisacáridos en las células bacterianas y fúngicas. Igual que lo encontrado por otros autores, los compuestos fenólicos poseen una potente acción antibacteriana y fungistática, según Rodríguez *et al.* (2007) quienes evaluaron la capacidad antimicrobiana de una película comestible de parafina adicionada con AE de canela en fresas, obteniendo una inhibición total de los hongos *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, y *Eurotium repens*, además de proveer una actividad significativa contra *Penicillium nalgiovense* y *P. roqueforti*. En contraste, no se presentó inhibición para las bacterias Gram-positivas evaluadas como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, y *Staphylococcus aureus*, a diferencia para bacterias Gram-negativas como *Salmonella cholerasuis*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, y *Pseudomonas aeruginosa* se presentó actividad inhibitoria .

El eugenol, componente mayoritario del aceite de clavo de olor, y el cinamaldehído, componente de la canela, actúan inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular. La adición de los AE presenta una buena respuesta a la inhibición al crecimiento de *E. coli*, (Kalemba y Kunicka, 2003), quienes también mencionan que los derivados fenólicos tales como carvacrol y eugenol provenientes del clavo de olor y tomillo, causan la desintegración de la membrana en la *E. coli* y *S. typhimurium*.

Es importante tener en cuenta que los conservantes comerciales aprobados para alimentos no presenten inhibición a las concentraciones evaluadas, se puede explicar considerando que las condiciones de cultivo *in vitro* son ideales para el crecimiento microbiano. Por esta razón, estos resultados no deben extrapolarse a una matriz alimentaria específica sin realizar los estudios respectivos (Castaño *et al.*, 2010).

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los AEs en muestras de leche chocolatada.

Los AE evaluados mostraron una buena respuesta a la inhibición del crecimiento de *R. mucilaginosa* en muestras de leche chocolatada a través del tiempo de almacenamiento, convirtiéndose en una alternativa para la industria de alimentos en el mantenimiento de la vida útil, por su efectividad en la inhibición del crecimiento de esta levadura, sumado a sus bondades ya mencionadas en el control de microorganismos patógenos. Las dosis aplicadas de cada uno de los AE por separado y en mezclas del 50%, no mostraron efecto significativo según análisis de varianza a un nivel de significancia de $p < 0.05$, sobre el porcentaje de inhibición de la *R. mucilaginosa*, lo cual sugiere que la dosis mínima de la mezcla de AE sería la más indicada para ser utilizada en este tipo de producto. En cuanto a los conservantes comerciales, benzoato de sodio y

sorbato de potasio aplicados en su dosis permitida, presentaron inhibición solo hasta el día 6. Estudios del AE de canela sobre *A. flavus* en nuez pecanera (*Carya illinoensis*), demuestran una capacidad antifúngica de 83% con 100 ppm, e inhibición completa con 250 ppm (García *et al.*, 2006; Velluti *et al.*, 2003). Según Wang *et al.*, (2005) el cinnamaldehído presente en el AE de canela es el principal componente con propiedades antifúngicas, de acuerdo a los estudios realizados con hongos de pudrición de la madera (*Coriolus versicolor*, *Lenzites betulina*, *Pycnoporus coccineus*, *Trichaptum abietinum*, *Oligoporus lowei*, *Antrodia taxa*, *Fomitopsis pinicola*, *Laetiporus sulphureus*, *Phaeolus schweinitzii*). López-Benítez *et al.*, 200); mientras que Agaoglu *et al.* 2007, en estudios realizados para el AE de clavo, obtuvo 100% de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae* en concentraciones de 5 y 10% y para cepas de *Candida albicans* determinaron halos de inhibición entre < 10 y > 30 mm.

Igualmente Bosquez *et al.*, (2009), evaluaron concentraciones de 5% y 10%, de extractos de clavo y canela obteniendo un efecto inhibitorio del 100% del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*,

Rhizoctonia solani y *Verticillium dahliae*, a las 72 horas de incubación. Así mismo López-Malo *et al.* (2007), utilizando aceite esencial de canela a una concentración de 0.2%, encontraron inhibición total del crecimiento de *Aspergillus flavus* en agar papa-dextrosa.

Estudios sobre el efecto antifúngico de AEs de canela y clavo en mezcla realizados por (Valero y Salmeron, 2003; Barrera y García, 2008) encontraron un efecto inhibitorio relevante sobre el crecimiento de *Fusarium proliferatum* y la producción de aflatoxinas en nueces almacenadas, por lo tanto puede ser utilizado como sustitutos de fungicidas químicos en granos y semillas.

Análisis sensorial

El ANOVA presentó diferencias significativas entre el patrón y los adicionados con AE ($p < 0.05$). Los productos con mayores adiciones de AEs de clavos y canela, presentaron los mayores puntajes de rechazo entre el panel de consumidores.

Los AE de clavo y canela son empleados en la industria alimenticia y cosmética por su sabor y aroma característicos (Tajkarimi *et al.*, 2010), pero debido a estas mismas propiedades requieren de concentraciones de inclusión apropiadas, al presentar astringencia y retrogusto al consumidor, como lo expresaron los panelistas en el presente estudio. La aplicación de los extractos y/o la dosis de uso, puede implicar un impacto organoléptico, causado por la alteración del sabor natural de los alimentos que puede sobrepasar los umbrales de sabor aceptable (Goñi *et al.*, 2009). Bajo esta apreciación sería necesaria la formulación de una dosis de AE que se matice con los sabores del producto lácteo al cual va a ser

adicionado. Así es que López- Malo *et al.* (2007), sugieren que los extractos de canela y clavo podrían utilizarse como agentes antimicóticos en alimentos con sabor compatible, como por ejemplo productos de panadería, frutos secos, entre otros.

CONCLUSIONES

- Se realizó la extracción de los aceites esenciales de las especias clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*), por la técnica de hidrodestilación, así mismo, se identificaron sus componentes mayoritarios, eugenol y cinamaldehído, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).
- Los cultivos microbiológicos de hongos realizados a la leche chocolatada, permiten identificar a *Rhodotorula mucilaginosa* como la levadura de mayor prevalencia.
- Los mejores resultados en la CMI fueron obtenidos bajo la dosis de 2.0% de los AE de clavos y canela con halos de inhibición mayores de 1cm.
- Los AE de clavo y de canela en forma individual al 2%, y en combinación al 50%, presentaron acción antimicrobiana sobre la *Rhodotorula mucilaginosa*.
- Es notable el efecto antimicrobiano de los AE de clavo y canela con respecto a los conservantes químicos usados como control positivo, lo que justifica su potencial aplicación en la industria de alimentos, convirtiéndolos en una alternativa de conservación natural, eliminando así, los riesgos toxicológicos aportados por el uso

de los conservantes artificiales o sintéticos, pero es necesario determinar las dosis correctas de acuerdo al producto alimenticio al que desee adicionarse.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, M., M. González, M. Araque, E. Velazco, N. Khourl, L. Rojas y A. Usubillaga. 2003. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. Revista de la Facultad de Farmacia 45 (1):19-24.

Agaoglu, S., N. Dostbil and S. Alemdar. 2007. Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 51(1), 53–57.

Anzaldúa-Morales A. 1994. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A. pp. 67-117. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Yeasts and molds in foods. 17.2.02 17 th. Edit. 1998.

Ardila Q., I. Martha, A. Vargas, F. Andrés, G. Mejía y F. Luis. 2009. Evaluación de aceites esenciales del *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* como posibles antioxidantes y conservantes en el salami. Vector Vol. 4: 95–106.

Bajpai, V., A. Rahman and S. Kang. 2008. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb to control food -borne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 125(2):117–122.

Baraggio N.G., Carrasco M.S., Simonetta A.C. 2007. Aislamiento de levaduras a partir de leche y productos lácteos. Determinación de sus características tecnológicas de interés caseario. *Revista Argentina de Lactología*. 25(8): 19 – 31.

Bleve, G., L. Rizzotti, F. Dellaglio and S. Torriani. 2003. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7):4116-22.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Journal of Food Microbiology* 94(3):223 - 253.

Castaño, H., G. Ciro, J.E Zapata y S. Jiménez. 2010. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *VITAE* 17(2):149-154.

Centeno S. y R. Rodríguez. 2005. Evaluación microbiológica de pescados congelados producidos en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica FCV-LUZ*, XV (2):168-175.

Cerpa G. 2007. Hidrodestilación de Aceites Esenciales: *Modelación y Caracterización*. Tesis de Doctorado. Universidad de Valladolid. Departamento de Química y Tecnología del Medio Ambiente. España.

Chalfound, S., M.C. Pereira, M.L. Resende, C. Lima-Angelico and R.A Da Silva. 2004. Effect of powdered spice treatments on mycelial growth, sporulation and production of aflatoxins by toxigenic fungus. *Ciencia Agrotecnologia* 28(4): 856-862.

Colombia, Ministerio de Salud. Resolución 4125 de 1991, abril 5, por el cual se reglamenta el Título V Alimentos de la Ley 09 de 1979 en lo concerniente a los conservantes utilizados en alimentos. Bogotá: El Ministerio; 1991.

Cona E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*. 19(2): 77-81.

De la Torre C R., López J. 2010. La agricultura y la ganadería Extremeñas en 2010. Las plantas aromáticas y medicinales. Futuro y potencialidad en Extremadura. 139-152.

García Caramillo, E, M. Quezada Villamil, J. Moreno Lara, G. Sanchez Hernandez, E. Moreno Martínez y M.C. Pérez Reyes. 2006. Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela y orégano y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. Revista mexicana de fitopatología 24(1): 8-12.

L.Gende,; M.Maggi; G.Formato; N.Damiani; S.Ruffinengo; G.Velis; R.Fritz; M.Eguaras.2006. Actividad antimicrobiana frente a *paenibacillus larvae subsp. larvae*, propiedades fisicoquímicas, y toxicidad sobre *apis mellifera* de los aceites esenciales de clavo de olor (*syzygium aromaticum*) y canela (*cinnamomum zeylanicum*). Congreso; Workshop "Malattie delle api e resiumi nei prodotti dell' alveare". Roma, Italia.

Goñi P, P. López, C. Sánchez, R. Gómez-Lus, R. Becerril and C. Nerín. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chemistry 116 ():982–989.

Guaman C., J. Carvajal. 2009. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. Universitas Scientiarum 14(2): 187-197.

Juárez R.Cecilia. 2010. Fertilización orgánica e inorgánica en la producción y calidad de aceites esenciales en Manzanilla, Menta y Tomillo. Tesis. México.

Juárez José R., Américo J. Castro, José F. Jaúregui, Jesús V. Lizano, Mario Carhuapoma, Fritz F. Choquesillo, Luis M. Félix, Pedro A. Cotillo, Julio P. López, Marilú R. Jaramillo, Augusta I. Córdova, Julio R. Ruíz, Norma J. Ramos. 2010. Chemical composition, antibacterial activity of essential oil *Citrus sinensis* L. (Sweet orange) and formulation of a pharmaceutical form. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Ciencia e Investigación. 13(1): 9-13.

Jimenez A., L., F. 2006. Determinación de la dosis letal 50 (dl50) de una cepa nacional de *vibrio ordalii* en trucha arco iris (*oncorhynchus mykiss*). Tesis. Universidad Austral de Chile. Fac. de Ciencias Veterinarias, Instituto de patología animal.

Kalemba, D, and A. Kunicka. 2003. Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry 10(10): 813-829.

Libkind D. 2007. Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. Rev. Argentina de Microbiología 39: 133-137.

Liboa M., ME. Guerín, L. Pegoraro. 2003. Influencia de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, en el crecimiento de *Rhodotorula sp.* de origen lácteo. Universidad Tecnológica Nacional. Argentina.

López Benítez, A., S. López Betancourt, M.E Vásquez Badillo, S. Rodríguez Herrera, M. Mendoza Elios y E. Padrón. 2005. Inhibición del crecimiento

micelal de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Verticillium dahliae* Kleb, mediante extractos vegetales acuosos. Revista mexicana de fitopatología 23(2): 183-190.

López-Malo, A., J. Barreto-Valdivieso, E. Palou and F. San Martín. 2007. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. Food Control 18(11):1358–1362.

López D., Jimenez M., López A. 2010. Identificación de hongos benéficos que participan en el proceso de obtención del queso Paipa en lácteos IBEL, municipio de Belén (Boyacá). Rev. De la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 19(21).

Marcen L., J. J. 2000. Antimicrobianos Naturales. Revista Medicina Naturista. 2: 104 – 108.

Marquez L. 2003. Extracción del aceite esencial de mandarina (*Citrus reticulata*) utilizando dióxido de carbono en condición supercrítica como solvente. Tesis de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ingeniería Química.

Martínez, J., B. Sulbarán de Ferrer, G. Ojeda de Rodríguez, A. Ferrer y R. Nava. 2003. Actividad Antibacteriana del Aceite esencial de mandarina. Revista Facultad de Agronomía 20(4): 502-512.

Ministerio de Salud. Resolución Número 4125 de 1991. Por el cual se reglamenta el Título V de alimentos, de la Ley 02 de 1979, en lo concerniente a los conservantes utilizados en alimentos.

Monsalve, S., L. 2007. Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown, provenientes de diferentes regiones de Colombia. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Bucaramanga.

Moreno, S., O. Crescente, S. Ortiz y M. Quintero. 2006. Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens* Triana. *Interciencia* 31(010):745-747.

Orberá Ratón T. 2004. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Rev Cubana Salud Pública*; 30(3). Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/spu/vol30_3_04/spu16304.htm, consultado diciembre 14 de 2011.

Patkar, K.L., C.M. Usha, H.S. Shetty, N. Paster and J. Lancey. 1994. Effects of spice oil treatment of rice on moulding and micotoxin contamination. *Crop Protection* 13(7):519-524. Rea V. 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) como potencial bioconservador en la carne de trucha. Tesis de grado. Escuela Superior de Chimborazo. Fac, de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. E-cuador.

Romero B., C. A., P. B. Zamudio, L. A. Bello. 2011. Antimicrobials in oxidized banana starch films: Effect on antibacterial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10 (3): 1 – 9.

Rodríguez A., R. Batlle, C. Nerín. 2007. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in Organic Coatings* 60(1):33–38.

Rodríguez E.N. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* 7(1):153-170.

Roldán F., L. 2010. Evaluación del uso de los aceites esenciales como alternativa al uso de los antibióticos promotores de crecimiento en pollos de engorde. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Fac. Medicina Veterinaria y zootecnia. Bogota D.C.

Ruiz N., C. 2008. Estudio de metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K., en tres estados fenológicos. Universidad Industria de Santander. Fac. de Ciencias. Escuela de Química. Bucaramanga.

Sánchez, F.J. 2006. Extracción de Aceites Esenciales-Experiencia Colombiana. En: II Segundo Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Palmira-Colombia.

Skandamis, P.N. and Nychas, G.J.E. 2003. Modeling the microbial interaction and the death of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives. *Journal of Food Protection* 66(7), 1166-1175.

Stratford, M. and S.A. James. 2003. Non-alcoholic beverages and yeasts. En: "Yeasts in food. Beneficial and detrimental aspects". Ed: T., Boekhout, y V., Robert. Behr's Verlag, Hamburg. pp: 309-346.

Tajkarimi, M.M., S.A. Ibrahim and D.O Cliver. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21(9):1199–1218.

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

Velluti, A., V. Sanchis, A.J Ramos, J. Ejido and S. Marin. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Journal of Food Microbiology* 89(2-3):145-154.

Wang S.Y., P.F Chen and S.T. Chang. 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 96(7):813–818.

Wang, R., R. Wang, B. Yang. 2009. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(2): 289–292.

Zhang, W., S. Xiao, H. Samaraweera, E. Lee and D. Ahn. 2010. Improving functional value of meat products. *Meat Science* 86(1):15–31.