



**TESIS DE MAESTRIA EN
PREVENCIÓN Y CONTROL DE
ZONOSIS**

UNNOBA

**APLICACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN
SOBRE LA SUPERFICIE DE CARNE DE AVES.**

**SU EFECTO SOBRE MICROORGANISMOS
IMPLICADOS EN ETA**

TESISTA: Méd. Vet. María Cecilia Villat

DIRECTORA: Dra. Fernanda J. Coll Cárdenas

CODIRECTORA: Dra. Marina Khoury

Contenido

1- RESUMEN	4
2- INTRODUCCION	6
2.1 LA CARNE AVIAR	6
2.1.1 LA CARNE AVIAR EN EL MERCADO MUNDIAL	6
2.1.2 LA CARNE AVIAR EN ARGENTINA.....	7
2.1.2.1 PRODUCCIÓN DE CARNE	7
2.1.2.2 EVOLUCIÓN DE LA AVICULTURA EN EL PAIS	8
2.1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA CARNE COMO MATERIA PRIMA	9
2.1.4 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	14
2.1.5 MICROBIOLOGÍA DE LA CARNE	15
2.1.5.1 MICROORGANISMOS ALTERANTES	17
2.1.5.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS	19
2.1.5.3 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA).....	19
2.1.5.3.1 ESCHERICHIA COLI	22
2.2 ACEITES ESENCIALES	23
2.2.1 DEFINICION Y COMPOSICION	23
2.2.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES	28
2.2.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES	31
2.2.4 ACEITE ESENCIAL DE LIMON (EOL).....	31
2.2.4.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EOL	33
2.3 ECOLOGÍA MICROBIANA.....	35
2.4 MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA.....	35
2.4.1 MODELO DE GOMPERTZ	40
2.4.2 MODELO DE REGRESIÓN LINEAL	41
2.5 EVALUACION SENSORIAL	42
3-OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVOS GENERALES	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4- MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1 OBTENCIÓN DEL EOL.....	45
4.1.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	45
4.1.2 EXTRACCIÓN DE EOL EN PLANTA PILOTO	45
4.1.2.1 ADQUISICIÓN DE MATERIA PRIMA PARA OBTENCIÓN DE EOL	45
4.1.2.2 ACONDICIONAMIENTO	46
4.1.2.3 EXTRACCION DE EOL	48

4.1.2.3.1 FUNDAMENTO.....	48
4.1.2.3.2 METODOLOGÍA	48
4.1.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).	51
4.1.3.1 CEPA UTILIZADA Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO	51
4.1.3.2 PREPARACIÓN DEL EOL A UTILIZAR COMO ANTIMICROBIANO	51
4.1.3.3 DETERMINACIONES	52
4.1.4 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS MUESTRAS DE CARNE DE AVE.....	53
4.1.5 DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN DEL EOL SOBRE PECHUGAS DE CARNE DE AVE.....	54
4.1.6 DETERMINACIÓN DEL ANÁLISIS SENSORIAL	55
4.1.6.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	55
4.1.6.2 PANEL SENSORIAL.....	56
4.1.7 DETERMINACION DE LA VIDA ÚTIL MICROBIOLÓGICA.....	58
4.1.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
5- RESULTADOS Y DISCUSION	59
5.1 CARACTERÍSTICAS DEL EOL OBTENIDO	59
5.1.1 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO	59
5.1.2 DENSIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE	60
5.1.3 pH.....	61
5.1.4 TEMPERATURA DE EBULLICION	61
5.1.5 OTRAS CARACTERÍSTICAS DEL EOL OBTENIDO	61
5.2 CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	61
5.3 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS MUESTRAS DE CARNE DE AVE	62
5.4 ACCIÓN DEL EOL SOBRE PECHUGAS DE CARNE DE AVE.....	64
5.5 ANÁLISIS SENSORIAL	70
5.6 EVALUACION DE LA VIDA UTIL MICROBIOLOGICA	71
6- CONCLUSIONES.....	74
7-BIBLIOGRAFÍA.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS	94
ANOVA DE RECuentOS PROMEDIO a 4 y 8 °C. ¡Error! Marcador no definido.	
MEDIOS DE CULTIVO	99

1- RESUMEN

Los objetivos generales de este estudio fueron evaluar y demostrar el efecto inhibitor del aceite esencial de limón sobre microorganismos mesófilos presentes en la superficie de carne aviar, potencialmente implicados en Enfermedades Transmitidas por Alimentos –ETA-.

Para el presente estudio se utilizó aceite esencial de limón (EOL) obtenido por autoproducción en el laboratorio a partir del hesperidio o fruto del Limón (*Citrus limon* (L.) de la Familia: Rutáceae). Los limones se adquirieron en el comercio local. Para la extracción de EOL se utilizó el Método de destilación por arrastre con vapor. Dicha destilación es la técnica utilizada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en una mezcla. Posteriormente se recolectó y caracterizó fisicoquímicamente constatando volumen, % de rendimiento, densidad y pH. Se envasó en frascos estériles, de vidrio color caramelo y se mantuvo refrigerado a 4 °C hasta su posterior aplicación.

Se realizó la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), utilizando la cepa de referencia, *E. coli* ATCC 25922, también, la concentración bactericida mínima (CBM) presentando en ambos casos un valor de 5,00 % V/V. Para evaluar la acción del EOL sobre microorganismos mesófilos, potencialmente implicados en ETA, presentes en la superficie de carne aviar, se utilizaron pechugas de procedencia comercial. La mitad de las muestras se rociaron con 1ml de dilución de EOL en propilenglicol (concentración según CIM determinada) y se identificaron como tratadas, en tanto las otras fueron consideradas como control, sin tratar. Posteriormente, todas las muestras se envasaron en bolsas individuales de polietileno y se almacenaron a temperaturas de refrigeración de 4 y 8 °C durante un tiempo máximo de 15 días. A diferentes tiempos de almacenamiento, se realizaron recuentos microbianos de las muestras tratadas y sin tratar, para determinar Microorganismos Mesófilos Totales, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* spp. Los resultados se modelaron matemáticamente.

Las Enterobacterias de las muestras almacenadas a 4 °C resultaron ser los microorganismos más sensibles a la acción del tratamiento conjunto (EOL, temperatura de almacenamiento) debiendo ser modelados a partir del modelo de regresión lineal, permaneciendo en fase logarítmica durante el tiempo que duró

la experiencia (15 días). Esta familia microbiana presentó el mayor valor de LPD (16,66 días) y de μ (0,03 log (UFC/cm²) días⁻¹).

Con el fin de realizar el análisis sensorial, las muestras cárnicas crudas con y sin agregado de EOL fueron evaluadas mediante un panel no entrenado en términos de los atributos Apariencia, Aroma, Color y Aceptabilidad Global utilizando una escala hedónica estructurada de 9 puntos (1: no me gusta nada - 9: me gusta mucho) presentando en todos los atributos buenos valores de aceptabilidad (con promedios cercanos a 6 puntos), semejantes a los de las muestras sin tratar.

Finalmente se evaluó la vida útil por estabilidad microbiana de la carne aviar cruda, tratada y sin tratar, observándose los mayores valores de extensión de vida útil (14,56 días) en las muestras tratadas y almacenadas a la menor temperatura (4 °C).

Los resultados obtenidos en el presente estudio al evaluar el efecto descontaminante del EOL coinciden con los reportes de varios autores que lo adicionaron sobre cultivos microbianos observando y remarcando su acción inhibitoria, resultando por tanto en una herramienta útil para el tratamiento de las carnes de ave con el fin de evitar el desarrollo de posibles ETA.

2- INTRODUCCION

2.1 LA CARNE AVIAR

2.1.1 LA CARNE AVIAR EN EL MERCADO MUNDIAL

La carne procedente de las aves ha desempeñado a nivel mundial un papel clave posicionándose desde 2018 en la cumbre de la industria cárnica, constituyéndose en una de las principales producciones. En ese sentido, en julio de 2021 tuvo un valor de 101,00 millones de toneladas, registrando una ligera disminución respecto al mes de abril del mismo año, impulsada por una fuerte caída en China (Servicio Agrícola Exterior del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, USDA, 2021), seguida por aproximadamente 98,10 millones de toneladas de carne porcina y 61,60 millones de toneladas de carne bovina, afianzándose en 2022 al registrar una producción cercana a los 136 millones de toneladas (Orús, 2023). Junto con el pescado es la proteína animal más consumida del mundo por su valor proteico, la calidad del producto, el sabor y el costo, convirtiéndose en una alternativa alimentaria atractiva.

Estados Unidos con un volumen de aproximadamente 21 millones de toneladas se convirtió en el máximo productor de carne de pollo del mundo en 2022; encabezando el liderazgo en producción y consumo mundial, posición mantenida en 2023, en tanto, Rusia se ubica como el principal importador, seguido por la Unión Europea que, aunque autosuficiente en la producción, importa un volumen muy cercano al volumen exportado.

Las exportaciones mundiales de carne de pollo de 2021 de 12,00 millones de toneladas fueron 3 por ciento más altas en 2022, llegando a un récord de 13,30 millones de toneladas. Brasil continúa siendo el principal país exportador mundial, continuando con una expansión relativamente alta impulsada por la demanda interna y externa. Los factores determinantes de encabezar el primer lugar en el ranking mundial han sido la credibilidad alcanzada en los mercados internacionales sostenida por el elevado nivel sanitario de los planteles, con excelente calidad de producto final a precios altamente competitivos (Orús, 2023b).

2.1.2 LA CARNE AVIAR EN ARGENTINA

2.1.2.1 PRODUCCIÓN DE CARNE

Desde los orígenes de la avicultura industrial, en 1959, en que la carne de aves se consumía como plato de días festivos a razón de 4,00 kg/habitante/año, hasta la actualidad, el consumo por habitante por año ha ido en aumento, alcanzando en el primer cuatrimestre de 2020 un récord histórico de consumo interno de 50,00 kg/hab/año, significando un aumento de 5,00 % comparado con el mismo período del año anterior, cifra que, alcanzó al consumo de 53,00 kg per cápita registrado para la carne bovina a pesar de la crisis sanitaria por el Covid-19, según registros del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP) (2020). El aumento observado en dicho consumo está ligado al bajo precio relativo del pollo, así como también a la tendencia cada vez mayor por parte de la sociedad de consumir carnes magras y de fácil preparación. En tanto, posteriormente, durante los años 2021 y 2022 se registraron pequeñas disminuciones, menores a un 1,00 %, de este consumo per cápita promedio llegando a valores de 45,70 kg/habitante/año y 45,50 kg/habitante/año, respectivamente (MAGyP, 2021; MAGyP, 2022).

También se observó que, durante este mismo periodo, el sacrificio de aves de corral aumentó en 6,00 % y la producción de carne aviar en 7,50 %, incrementándose así las exportaciones de la industria avícola en un 9,00 %.

Durante el año 2021, la faena nacional de aves en establecimientos con habilitación de Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) alcanzó 741,40 millones, 2,20 % por debajo del año 2020 y durante el año 2022, 751,70 millones, 1,40 % por encima del año 2021 (MAGyP, 2022).

En nuestro país, la producción avícola posee un estatus sanitario excelente, gracias a los controles a lo largo de todo el ciclo de producción que son realizados por el SENASA y representan el ejemplo del trabajo mancomunado entre el sector privado y el Estado. Además, el país se encuentra libre de algunas enfermedades infecciosas tales como Influenza aviar y Newcastle, que afectan actualmente a la avicultura mundial y representan barreras ineludibles al comercio internacional de productos avícolas hacia los mercados de la carne aviar en los principales países.

2.1.2.2 EVOLUCIÓN DE LA AVICULTURA EN EL PAIS

Si bien en Argentina, la actividad avícola comenzó bajo el gobierno del general Justo José de Urquiza el 2 de Julio de 1857 cuando arribaron a la Provincia de Entre Ríos los primeros colonos suizos que fundaron la Colonia entrerriana de San José, la producción avícola ha pasado de ser una actividad complementaria dentro de las explotaciones agropecuarias a cargo de las mujeres y los menores de la familia, a convertirse en la actualidad en una de las producciones pecuarias más importantes, intensificada, de tecnología dura con manejo de tipo industrial. El Centro de Empresas Procesadoras Avícolas, CEPA (2023), documenta que a partir de 1945 se evidencian en el país las primeras explotaciones avícolas comerciales de pedigree y cruza doble propósito, hembras para producción de huevos y machos para consumo como carne, con un manejo semi industrial, y alimentación basada en mezclas de granos en explotaciones a campo en semi libertad y caseras. Por aquel entonces, la comercialización se organizaba en acopios, consignaciones personales o cooperativas que confluían en el Mercado Concentrador de Aves y Huevos de la Capital Federal, donde tenían sus puestos de venta los mayoristas. La mercadería clasificada y seleccionada se comercializaba viva, con aproximadamente 5 meses de edad y un peso promedio de 2,30 kg, sólo se sacrificaba a solicitud y se desplumaba vendiéndose entera, sin eviscerar, del mismo modo que en las ventas caseras, criadas de manera doméstica en gallineros familiares. La calidad de la carne era similar a la de caza, fibrosa y seca, utilizada para preparaciones de cocción prolongada. En aquel momento, el consumo llegaba a 3,00 kg/hab/año. Este tipo de producción continuó hasta 1959, momento a partir del que se considera el nacimiento de la avicultura industrial con el ingreso a nuestro país de los planteles de reproductores de carne. A partir de 1960, el sector continuó creciendo considerablemente y en pocos años, el consumo por habitante/año pasó de 4,00 kg a 8,00 kg en 1965, coincidiendo con el surgimiento de galpones de aves en Entre Ríos y Buenos Aires y la instalación de la primera Planta de Faena integral de aves con capacidad de faenar, desplumar y eviscerar 1800 pollos/hora, para llegar a un consumo de 10,00 kg/hab/año en 1970; incorporándose a la alimentación de las familias argentinas de manera frecuente y no sólo en ocasiones especiales o días festivos.

El consumo para pasados los años ´70 ya era de 12,00 kg/hab/año, y aunque el crecimiento era positivo, era difícil proyectar la oferta y fluctuaba relacionado con el precio y dependiendo de las carnes rojas; es así que para 1976, con el objeto de aumentar la competitividad comenzó el proceso de integración vertical que concentraba todo el ciclo productivo en el producto final, el pollo terminado eviscerado, proceso que continuó hasta 1983 quedando todo el sector integrado produciendo huevos fértiles, pollitos BB, alimento balanceado, tercerizando en criadores integrados el cuidado y la guarda para luego faenar y comercializar el pollo. Este concepto de producción disminuyó el precio al consumidor final lo que afianzó el hábito de consumo, aumentándolo a 14,00 kg/hab/año creciendo posteriormente, de manera constante.

A partir de 1990, el aumento observado en el consumo de los productos avícolas en el mundo, motivados por la genética, cobró relevancia como proteínas animales de alto valor biológico, accesibles a bajo costo, así como también la tendencia al consumo de carnes magras y de fácil preparación, llegando en nuestro país a 26,00 kg/hab/año, originado esto por el exceso de oferta sin salida de exportaciones.

Posteriormente, hacia 2012-2022, influenciado por los cambios económicos de entonces, se alcanzaron niveles de competitividad y producción en ascenso que favorecieron la exportación a otros continentes y un aumento sostenido en el mercado interno con cifras de consumo de 45,73 kg/habitante/año, registrado durante el año 2022.

Actualmente, nuestro país exporta productos avícolas a 5 continentes, con llegada a más de 60 destinos.

2.1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA CARNE COMO MATERIA PRIMA

Desde el punto de vista nutricional, la carne aporta una fuente importante de nutrientes a la dieta de las poblaciones, es considerada como un alimento esencial; la carne de ave, en particular, ofrece características deseables. Constituida por proteínas de alto valor biológico, vitaminas sobre todo del grupo B, y minerales, es un alimento que reúne las condiciones de ser nutricionalmente completo para todas las etapas de desarrollo de los individuos, aunque, diferenciándose en su composición de acuerdo con la especie de procedencia

por lo que, algunas se adaptan más que otras por sus posibles efectos sobre la salud.

El Código Alimentario Argentino, C.A.A. (Ministerio de Salud, ANMAT, 2023) en el artículo 247 (Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 12-E/2017) define genéricamente como carne a la parte comestible de los músculos de los vacunos, ovinos, porcinos y caprinos, entre otros, declarados aptos para la alimentación humana por la inspección veterinaria oficial antes y después de la faena incluyendo con la misma definición la de los animales de corral (pollos, pollas, gallos, gallinas, etc.), animales silvestres de caza o criados en cautiverio, pescados, crustáceos, moluscos y otras especies comestibles. Asimismo, define ave eviscerada, a aquella que se le ha extraído cabeza, tráquea, esófago, estómagos glandular y muscular, intestinos, pulmón, sacos aéreos, corazón, bazo e hígado con la vesícula biliar, ovarios y testículos. La clasificación sanitaria definida por el C.A.A. es de primera calidad o Grado "A", segunda calidad o Grado "B" y tercera calidad o Grado "C".

La composición de la carne de aves depende, al igual que las otras carnes, de la dieta, edad, sexo y grado de desarrollo de los animales, verificable en los contenidos de sus nutrientes.

Gallinger y col. (2016), describen que la carne de ave, particularmente el pollo, se ha difundido por proporcionar carne blanca a la alimentación, aportar nutrimentos necesarios para las diferentes etapas fisiológicas del organismo humano, siendo recomendada para su consumo al considerarla un alimento de alto valor biológico, apropiado para diferentes etapas de la vida e incluso recomendada para personas con necesidades nutricionales especiales. Estos investigadores, a partir de un estudio descriptivo obtuvieron parámetros de calidad en carne de aves (cada 100 g de porción comestible) en muestras de pata-muslo y pechuga, con y sin piel, determinando materia seca, proteínas, grasa total, ceniza y energía (Tabla 1).

Tabla1: Composición centesimal de la carne de pollo argentina (cada 100 g de carne)

PECHUGA				
Determinación	Sin Piel		Con Piel	
	Media	DE	Media	DE
Contenido de agua (g)	74,00	1,00	70,00	1,30
Cenizas (g)	1,20	0,10	1,00	0,10
Proteína (g)	23,70	1,00	20,20	1,10
Grasa (g)	1,40	0,30	8,90	1,50
Energía (Kcal)	107,00	4,00	161,00	14,00
Total=27 Unidades Muestrales				

Fuente: Gallinger y col. (2016)

Como se observa en la Tabla 1 y coincidiendo con estudios realizados por Claus, Colby y Flick (1994), las porciones comestibles de las canales de pollos parrilleros tienen un contenido de agua de aproximadamente 70,00-74,00 %, mientras que el contenido de proteínas digeribles de alta calidad es de 20,20 % - 23,70 %, el contenido calórico de la carne del pollo es bajo, sobre todo en la carne sin piel (1,40 %) aunque algo superior a la de pavo o avestruz, cuando se consume con piel. Dicho contenido graso –lípidos- puede variar significativamente dependiendo de la parte consumida, siendo bajo en las partes magras como la pechuga, como observamos anteriormente (Tabla 1), con una media de 9,70 % cuando se trata del animal entero; el tejido más graso es la piel, pudiendo tener hasta un 48,00 % de grasa. También presenta un 40,00 % de aminoácidos esenciales e hidratos de carbono en menos de 1,00 %. Contiene además, enzimas que actúan durante los procesos de maduración, principalmente las de tipo glucolíticas (cimasas), lipasas, fosfatasas y proteasas, con cantidades apreciables de cenizas (1,00 a 1,20 %), vitaminas hidrosolubles del complejo B, tiamina, niacina, retinol y vitaminas B6 y B12, liposolubles como vitaminas A, D, E, K, minerales tales como hierro y zinc de alta biodisponibilidad, cobre, magnesio, selenio, cobalto, fósforo, cromo y níquel.

Más de la mitad de los ácidos grasos son insaturados, con valores superiores al que presentan el resto de las carnes; de éstos, la mayor parte son monoinsaturados (MUFA), siendo el ácido oleico el más abundante. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que se destacan son el linoleico (C18:2 n-6) y alfa-linolénico (C18:3 n-3). Los ácidos grasos saturados (SFA) predominantes

son el ácido palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0) y en menor cantidad, el mirístico (C14:0), el más aterogénico, con un potencial cuatro veces mayor que el palmítico. La carne de pollo sin piel contiene unos 110 mg de colesterol/100 g de parte comestible y 69 mg/100 g en el caso de la pechuga. En ese sentido, con respecto a la grasa, su bajo contenido y alta calidad en estas carnes, han propiciado que el consumidor siempre la considere como la carne más sana y menos grasa (Carbajal Azcona, 2005). Además, la grasa en el pollo se encuentra debajo de la piel y en la cavidad abdominal, lo que facilita su remoción a diferencia de las carnes rojas (vaca, cerdo).

Según Bautista y col., 2013, las características principales que determinan la calidad de la carne son las propiedades fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas; si bien existen diferencias en los parámetros que se consideran para determinar la calidad en el caso específico de la carne de aves.

El pH, definido como el menos logaritmo de la concentración de protones, es uno de estos principales parámetros a tener en cuenta para verificar la calidad porque afecta varias de sus cualidades (color, capacidad de retención de agua, etc.) (León y col., 2018). Tras la muerte del animal, el valor disminuye principalmente, por la degradación del glucógeno a ácido láctico. Esta reacción, es influenciada, por la actividad de enzimas sensibles a la temperatura. En ese sentido, los valores de pH procedentes de músculos luego del deshuese, es de aproximadamente 7 unidades, reduciéndose durante la glicólisis hasta 5,50-5,90. Estos resultados aparecen principalmente en la pechuga de pollo (pH 5,70-5,90), la que se deteriora más lentamente que los muslos que presentan un pH levemente más neutro (pH 6,30-6,60) (Carrillo y col., 2007). Como cada microorganismo tiene un pH de crecimiento óptimo, mínimo y máximo, este factor puede llegar a ser determinante para controlar el crecimiento bacteriano, teniendo en cuenta que la mayoría de las bacterias patógenas crecen en un pH casi neutro (6,60-7,50).

En forma similar, la actividad de agua (A_w) en carne fresca es de 0,98, favoreciendo el crecimiento de gran número de microorganismos patógenos y alterantes. Las bacterias tienen rangos óptimos de A_w para su crecimiento y normalmente se desarrollan bien en un valor por encima de 0,91, por lo cual los alimentos que ofrecen esta condición facilitan la proliferación bacteriana. De esta manera, el proceso de conservación de la carne debe estar dirigido a mantener

las condiciones ideales que impidan el desarrollo de microorganismos patógenos y retrasen el crecimiento de los alteradores (Talero, 2019).

La industria avícola evoluciona continuamente de acuerdo con las necesidades de los consumidores, que buscan como características deseables buena pigmentación, apariencia, tamaño y peso del animal, así como suavidad, color, capacidad de retener agua y capacidad de cohesión (del Pilar Castañeda, 2011). En Argentina, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos describe en el Protocolo de calidad para pollos enteros y cortes (2008), qué atributos de calidad deben cumplir los pollos enteros y sus cortes para aspirar al sello de calidad de “Alimentos Argentinos”. Los criterios especifican los vinculados al producto, al proceso y al envase y fijan Criterios Generales para la carne de pollo entero o trozado, para considerarlo de calidad diferenciada, debiendo cumplir con determinadas condiciones allí definidas y especificadas, las vinculadas al producto, al proceso y al envase, siendo analizadas mediante técnicas oficiales reconocidas y en laboratorios de redes oficiales o acreditados para éstas, recomendándose implementar un sistema de Gestión de Calidad e Inocuidad como la Norma ISO 22000 y la Norma ISO serie 14000. En ese sentido, el pollo entero y los diferentes cortes presentan atributos que pueden considerarse como diferenciadores del producto; estos tienen en cuenta las características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas que los caracterizan. Estas consideraciones se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Características Fisicoquímicas en porción de 100,00 g.

	Pollo	Cuarto trasero	Pata	Muslo	Ala	Pechuga	Metodología sugerida
Proteínas (g)	20,00 ± 2	17,00 ± 2	16,00 ± 2	17,00 ± 2	15,00 ± 2	23,00 ± 2	AOAC 39.1.19 (2005)
Grasa total (g)	< 10,00	15,00 ± 2	15,00 ± 2	13,00 ± 2	< 20,00	<6,00	AOAC 39.1.05 b (2005)
Humedad (g)	75,00 ± 3	70,00 ± 3	65,00 ± 3	70,00 ± 3	70,00 ± 3	70,00 ± 3	AOAC 39.1.02 (2005)

Fuente: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (2008)

Puede observarse en esta Tabla, que en el caso particular de la pechuga es el corte que presenta más contenido proteico y menor contenido graso, lo que la hace altamente saludable y francamente elegido por el consumidor.

El valor nutritivo y la digestibilidad de la carne de pollo son muy elevados, presentando valores superiores a los de otros tipos de carnes, por lo que juegan un papel importante en la dieta. Al ser alimentos con una alta densidad de nutrientes y baja densidad energética presentan gran interés para la dieta de la población en general y, especialmente, para determinados grupos como ancianos, adolescentes, gestantes, personas que realizan dietas hipocalóricas, etc. (Barker, 2003; Campbell y col., 1999; Castañeda y col., 1995a, 1995b).

2.1.4 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

En relación con las características organolépticas, la carne de ave es clara, tiene bajo contenido en pigmentos hemínicos, así como en citocromos y flavonoides. Dependiendo de la parte anatómica considerada, se pueden encontrar diferencias en las proporciones de fibras musculares rojas o blancas. Muslo, contramuslo y cuello presentan mayores contenidos de fibras rojas, mientras que en pectorales y alas predominan las fibras blancas.

El proceso de maduración de la carne es muy rápido en estos animales. El rigor mortis aparece en 1-2 hs y es máximo entre 2 y 8 hs aproximadamente, debido al rápido descenso del pH provocado por la alta velocidad del proceso glucolítico. A partir de las 8 hs, la rigidez se va resolviendo, consiguiéndose en las primeras 24 hs una terneza adecuada de la carne (suficiente a veces con tan sólo 4 hs), y el proceso finaliza antes de 3 días. Existe variabilidad y diferencias significativas entre los diferentes músculos, de manera que la pechuga se enternece con 10-12 hs, mientras que en muslos y contramuslos se consigue una tenderización adicional 2-5 días más tarde, a temperatura de refrigeración.

Contrariamente al ganado vacuno o porcino, la estabilidad de la carne de aves es inferior frente a los procesos oxidativos motivado por el mayor contenido en PUFA, sobre todo en los contramuslos, donde los contenidos de grasa intra e intermuscular son más elevados.

En la carne de aves –como de otras especies- puede observarse un número de casos de carnes de evolución anormal, en este sentido, la palidez exagerada sobre todo en las pechugas origina carnes pálidas, blandas y exudativas (PSE),

defecto que podría estar relacionado con una mayor proporción relativa de fibras blancas de tipo IIb, y mayor susceptibilidad al estrés. En pollos, esta alteración de la carne aparece con mayor frecuencia en animales de elevado peso en épocas calurosas. En tanto, a diferencia de las otras especies domésticas de consumo, la predicción de las tipologías PSE o DFD (carnes oscuras, firmes y secas) mediante medidas de pH a los 15-20 minutos resulta poco fiable, siendo un indicador de mayor precisión la realización de medidas colorimétricas en la pechuga (Castelló y col., 2002).

La calidad de la carne engloba numerosas características por las cuales el alimento una vez sometido a cocción resulta un producto con propiedades comestibles, aspecto atractivo y valor nutritivo adecuado para el consumo humano.

Actualmente, la percepción de los consumidores sobre la carne en general y particularmente sobre el pollo ha evolucionado, pasando de ser una fuente accesible de proteína a una carne nutricionalmente equilibrada, fácil de cocinar y versátil, a la que se le exige una seguridad total desde el punto de vista microbiológico.

2.1.5 MICROBIOLOGÍA DE LA CARNE

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2020), los alimentos deben estar disponibles en cantidad y calidad nutricionalmente adecuadas, además de estar libres de contaminación que podría conducir al desarrollo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Durante el procesamiento, los cadáveres de carnes rojas y aves de corral pueden contaminarse con microorganismos patógenos y de descomposición de la materia fecal, el contenido del estómago y la piel. Las fuentes adicionales de contaminación microbiana son las herramientas y el equipo de procesamiento, los componentes estructurales de la instalación, el contacto humano y el contacto de carcasa a carcasa (Capita y col., 2004).

La piel de las aves puede contener varios microorganismos de descomposición: *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter*, *Moraxella* spp., *Enterobacter* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta* y *Lactobacillus* spp. El patógeno *Campylobacter jejuni* también puede estar presente en la piel y, en consecuencia, ser transferido a las superficies de trabajo (Forsythe, 2013). El

peligro de generar, en ocasiones, una infección microbiana por consumo de carne de aves, ETA, es posibilitado por el hábito, durante el proceso de sacrificio y faena, que la piel permanezca como parte integrante de la canal, constituyendo una pieza comestible. Es necesario reconocer la flora propia de descomposición y la patógena con el objeto de reducir accidentes alimentarios provocados por contaminación.

Los productos cárnicos por su condición de frescos, A_w , composición y pH son dables de favorecer el desarrollo de microorganismos responsables de modificar la calidad y generar procesos alteradores y tóxicos de naturaleza e importancia diversa.

En la carne de ave se han encontrado varios cientos de especies de microorganismos, los que pueden dividirse en dos grupos generales, los microorganismos que producen alteración en las carnes, alterantes y los que son capaces de producir enfermedades en humanos, denominados patógenos.

La mayoría de los microorganismos son aeróbicos mesófilos y pocos logran desarrollarse a temperaturas inferiores a 7 °C. Su recuento se ha utilizado como indicador de la calidad higiénica de los alimentos y, cuando están presentes en grandes cantidades, indica fallas durante la producción. Las bacterias aerobias mesófilas están constituidas por especies de *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* y *Streptococcus*. El recuento estándar en placa (en Plate Count Agar) proporcionará además una idea de su vida útil. Su presencia en gran número indica materia prima excesivamente contaminada, limpieza y desinfección inadecuadas de superficies, higiene insuficiente en la producción y condiciones inapropiadas de tiempo y temperatura durante la producción o conservación de los alimentos (Forsythe, 2013).

El crecimiento de microorganismos alteradores y/o productores de ETA ocupa el primer lugar entre las causas de la disminución de la calidad y seguridad biológica de los alimentos, debido a la acción de enzimas, toxinas y células bacterianas.

En las aves, todavía con el animal vivo, y en óptimo estado de salud, el músculo es prácticamente estéril, no así la piel, patas e intestino que vehiculizan microorganismos que durante el sacrificio, evisceración y desplume pueden difundirse y contaminar la superficie de los músculos a través de pequeños desgarros (Giavarini, 1986). A pesar de considerar el bienestar animal en las

actividades de manejo prefaena, el "estrés" al que se somete inevitablemente al animal, ya sea en el momento de su captura o bien durante el transporte desde el criadero hasta el matadero, podría aumentar la permeabilidad de las paredes intestinales, facilitando el paso de las bacterias presentes en el intestino hacia diversos tejidos y órganos.

Durante el procesado, la contaminación microbiana se produce debido a los equipos, al contacto con el agua o con otras aves que se están procesando, y, en menor medida, por los trabajadores (Pérez Arnedo, 2015). En la contaminación de las canales de aves, un punto importante lo representa el escaldado por inmersión, en el que el polvo de las plumas, la materia fecal de las patas y el contenido del tracto intestinal son liberados al agua del escaldador. La temperatura del agua (58 a 62 °C) favorece la dilatación de los folículos de la pluma, con lo cual, el tener los poros abiertos, colabora que una importante variedad de bacterias (*Clostridium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, estafilococos, entre otros) encontradas en el agua del escaldador, "lodo bacteriano", hayan sido aisladas de las canales y sacos aéreos después de este proceso. En ese sentido, con el objeto de disminuir la contaminación cruzada, Pérez Arnedo (2015), realizó diferentes experiencias tales como acidificar el agua del tanque escaldador pre y post-lavado, realizar el escaldado en etapas múltiples, hacer renovación frecuente del agua, entre otros, que si bien incrementaron la inocuidad de la carne de ave y produjeron una aparente solución al problema, no se logró resolver, reemplazándose, posteriormente esta práctica, por tecnología de aire caliente, transformando por completo el proceso. Se debe tener en cuenta que la carne de pollo pertenece a la categoría de alimentos muy perecederos, por lo que su temperatura de conservación debe ser menor de 5 °C.

2.1.5.1 MICROORGANISMOS ALTERANTES

Un alimento alterado es aquel que ha perdido su genuinidad, aquel que, por causas naturales de índole física, química y/o biológica o derivadas de tratamientos tecnológicos inadecuados y/o deficientes, aisladas o combinadas, ha sufrido deterioro de sus características organolépticas, en su composición intrínseca y/o en su valor nutritivo (Min. de Salud, 2022). En ese sentido, presenta sabores u olores desagradables o extraños. La alteración o deterioro

de la carne de pollo es fundamentalmente de origen bacteriano y se debe principalmente al crecimiento no deseado de microorganismos que, durante su metabolismo, producen compuestos volátiles, de mal olor detectables por los sentidos del gusto y del olfato, producidos por ellos.

Según Morales Muñoz (2019), la microbiota alterante (o asociación alterante) de la carne de pollo al momento de su deterioro, está compuesta por microorganismos que contribuyen activamente y otros que sólo se han multiplicado, pero que no causan cambios desagradables para el sentido humano. Este consorcio bacteriano implica interacciones sinérgicas y antagónicas. Algunos microorganismos tienen la capacidad de producir exoenzimas que aumentan la disponibilidad de nutrientes en el medio, permitiendo el desarrollo de otras bacterias, que, de otra manera, no podrían crecer. En cambio, la competencia por nutrientes esenciales, cambios en el pH por la producción de ácidos orgánicos o la formación de sustancias antimicrobianas, como bacteriocinas, afectan negativamente la supervivencia o la multiplicación de otros microorganismos.

Se consideran como bacterias alterantes primarias, a aquellas que tienen la capacidad de producir metabolitos asociados con el deterioro a partir de una matriz alimentaria, aun cuando están en un cultivo puro (Gram et al., 2002). Las especies bacterianas que componen la microbiota alteradora de la carne del pollo son múltiples, e incluso varían entre los cortes y la temperatura de almacenamiento (Nychas et al., 2008; Zhang et al., 2012; Lee et al., 2017). No obstante lo anterior, *Pseudomonas* spp. ha sido repetidamente reportada como el principal alterante primario de la carne de pollo envasada en aerobiosis, desde la década del '50 (Ayres, 1960; Barnes y Thornley, 1966; Russell, 1995; Arnaut-Rollier et al., 1999; Balamatsia et al., 2006; Liang et al., 2012; Lee et al., 2017). Dentro de este género, principalmente *P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. lundensis* y *P. putrida* son las principales responsables de la alteración en carne fresca de pollo. Otras bacterias que pueden estar presentes en la carne de ave deteriorada en ambientes con oxígeno son *Shewanella putrefaciens*, Enterobacterias como *Hafnia* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp. y bacterias ácido-lácticas como *Carnobacterium piscícola*, *C. divergens*, *Lactococcus* spp, *Leuconostoc* spp, y *Brochothrix thermosphacta* (Smolander et al., 2004).

Si bien *Acinetobacter* y *Moraxella* se pueden encontrar en números importantes

en las plumas, tienen un bajo potencial alterante, por no originar productos derivados de la degradación aminoacídica, de olores desagradables. Sin embargo, potencian la actividad alteradora de *Pseudomonas* y *Shewanella putrefaciens* al restringir la disponibilidad de O₂ para estas bacterias, por lo que favorecen la producción de sustancias de olor desagradable producto de la degradación de aminoácidos, incluso en presencia de glucosa.

Las levaduras también pueden contribuir a la alteración de la carne de pollo fresca, en ese sentido, *Yarrowia lipolytica* es una de las especies que se aísla con más frecuencia en carne de pollo alterada.

2.1.5.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Los microorganismos patógenos son altamente preocupantes para los seres humanos y en la producción avícola se pueden transmitir fácilmente entre las aves de una manada. Los pollos jóvenes contagiados son capaces de extender rápidamente *Salmonella* y *Campylobacter* a otros miembros de iguales edades. La dosis infectiva de *Salmonella* para pollitos de un día es muy baja (menos de 100 células), en tanto, aves de mayor edad se vuelven más resistentes (ICMSF, 1998; Pérez Arnedo, 2015).

Está comprobado que la mejor alternativa para minimizar el desarrollo microbiano y la pérdida de la calidad durante el procesamiento y almacenamiento consiste en la acción combinada de distintos factores limitantes del crecimiento microbiano (enfoque de la tecnología de vallas u obstáculos). Este abordaje permite la compatibilización de una mejor calidad sensorial con la seguridad biológica y sustenta las nuevas tendencias en la producción de alimentos, incluyendo la utilización de aditivos seleccionados y agentes conservantes adecuados (Rodríguez y col., 2019).

2.1.5.3 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)

La calidad de los alimentos está influenciada por diversos agentes. La pérdida de calidad debida a ellos puede obedecer entre otros a cambios enzimáticos producidos por alteraciones en enzimas intrínsecas o por agentes microbianos. Los alimentos de origen animal son fácilmente contaminados con microorganismos. Los productos avícolas; sobre todo tras su procesamiento, suman microorganismos que además de indeseables son inevitables,

dependientes de la calidad sanitaria y microbiológica de los animales previa al proceso de faena, y de las prácticas higiénicas durante la manipulación, el tiempo y la temperatura de almacenamiento, que pueden motivar esa contaminación y consecuentemente ocasionar el deterioro de la calidad de la carne.

En la carne de ave se han encontrado bacterias capaces de producir ETA en los consumidores. El crecimiento de estos microorganismos alteradores o patógenos, productores de ETA ocupa el primer lugar entre las causas de la disminución de la calidad y seguridad biológica de los alimentos, debido a la acción de enzimas, toxinas y células bacterianas. Estos microorganismos son afectados diferencialmente por una multiplicidad de factores limitantes presentes en el alimento, por ejemplo, temperatura, pH, Aw, de proceso (conservantes, deshidratación, cocción) e intrínsecos del microorganismo (injurias, inóculo) (Rodríguez y col., 2019).

Un brote de ETA se da cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de haber ingerido un mismo alimento y los estudios epidemiológicos lo señalan como el origen de la enfermedad, siendo luego confirmado mediante análisis de laboratorio.

Los signos clínicos más comunes son los gastrointestinales (diarrea, náuseas, vómitos y dolor estomacal) aunque pueden acompañarse de dolor de cabeza, fiebre, signos neurológicos, visión doble y otros. Ciertas ETA pueden generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daños renales, artritis, meningitis, aborto y, en casos extremos, la muerte. Por lo tanto, el tratamiento será específico según los síntomas que presente el paciente y el origen de la infección/intoxicación.

Epidemiológicamente, muchas de estas enfermedades son subnotificadas habida cuenta que, si cursan con cuadros gastrointestinales muchas veces son autolimitantes y por ello no se reportan en el sistema de salud. Asimismo, aquellas que sí son asistidas, no siempre logran diagnosticarse si es que se limitan con tratamiento sintomático, por ende, no todas llegan a la identificación del agente etiológico y a la notificación ante las autoridades de Salud Pública.

La OMS estima la carga global de las ETA a nivel mundial, caracterizando el impacto de más de 30 agentes, indicando por ejemplo en sus resultados que, casi 1 de cada 10 personas enferman cada año al ingerir alimentos contaminados y 420000 mueren como consecuencia de estas enfermedades. En

ese sentido, los niños corren un riesgo especial de padecer enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos: 220 millones enferman y 96000 mueren cada año. La diarrea suele deberse a la ingestión de carne y huevos crudos o mal cocidos, verduras y frutas mal lavadas, y productos lácteos, contaminados por norovirus, *Campylobacter*, *Salmonella* no tifoídica y *Escherichia coli* patógena (OMS, 2015).

Por otra parte, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2011) estiman que en Estados Unidos 48 millones de personas se enferman por una infección/intoxicación alimentaria, 128000 son hospitalizadas y 3000 mueren anualmente.

Algunos patógenos reportados en productos avícolas son: *Campylobacter* spp., *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. y *Yersinia enterocolitica*. Sin embargo, recientes estudios demuestran que, en caso de carne de ave, *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. son las causas más comunes de ETA, mientras que *L. monocytogenes* es un problema grave asociado a productos procesados de carne de ave (Keklik et al., 2010).

La colonización de los alimentos con bacterias patógenas depende de las buenas prácticas de manufactura y de la sanidad alimentaria, que en base a normas estandarizadas deben reducir y/o eliminar los agentes patógenos de los alimentos, previo al consumo humano. En la prevención de las ETA se evidencia una urgente necesidad de desarrollar un enfoque interdisciplinario, con una interacción directa entre la vigilancia y evaluación de riesgos.

Aunque son numerosos los microorganismos que pueden causar contaminación microbiológica de los alimentos, las bacterias son las principales responsables de más del 90 % de los casos de ETA confirmados. En ese sentido, en términos de ETA, es fundamental considerar la matriz alimentaria y el espacio donde ocurre el evento emergente por lo que es necesario distinguir entre infecciones e intoxicaciones alimentarias. Las primeras, son enfermedades causadas por la ingestión de alimentos que contienen microorganismos patógenos vivos y determinadas por la invasión, multiplicación y alteraciones de los tejidos del hospedador por dichos microorganismos. Mientras que, en el caso de las

intoxicaciones alimentarias, las manifestaciones son producidas por la ingestión de alimentos contaminados con toxinas, que pueden ser de diversos orígenes, formados en tejidos de plantas o animales, de productos metabólicos excretados por microorganismos en los alimentos, o sustancias químicas que se incorporan de manera accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde la producción hasta su consumo.

2.1.5.3.1 *ESCHERICHIA COLI*

E. coli es una bacteria que comúnmente se encuentra en el tracto digestivo de mamíferos y aves formando parte de la microbiota normal del intestino, sin embargo, otras cepas pueden causar enfermedades, lo que representa un riesgo significativo para la salud. Entre estas últimas se encuentra *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), principalmente la cepa O157:H7, causante de colitis hemorrágica, enfermedad que cursa con cuadros de diarrea con sangre, debido a la hemorragia en el intestino; también encontramos *E. coli* uropatógena (UPEC), es decir causante de enfermedad del aparato urinario y la *E. coli* aviar (APEC), cepa O1:K1:H7 que provoca cuadros de enfermedad (colibacilosis) en aves de corral.

Los rumiantes en general y el ganado vacuno en particular, han sido señalados como los principales reservorios de EHEC. La contaminación de la canal durante el sacrificio es la ruta primaria que lleva a la contaminación de la carne bovina. La forma más frecuente que conduce a que se presente la enfermedad es una cocción insuficiente, la supervivencia del patógeno y la subsecuente infección. La principal vía de transmisión son los alimentos contaminados tales como los productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, embutidos fermentados, leche y jugos no pasteurizados, vegetales que se consumen crudos, entre otros. Otras formas de transmisión incluyen la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, el contacto directo del hombre con los animales, bañarse en aguas recreacionales contaminadas y de persona a persona por la ruta fecal-oral (FAO, 2011). Se sabe que, durante la manipulación, almacenamiento y comercialización de carne de aves, se producen cambios en la carga microbiológica provenientes del ambiente y de los manipuladores. Estudios previos sobre indicadores de contaminación cruzada señalan que en aquellos comercios donde se ponen en contacto la carne aviar con la de origen

bovino predomina la presencia de EHEC, lo que indicaría la necesidad de reforzar las medidas de control e higiene en los establecimientos expendedores de productos avícolas (Alonso y col., 2012; Silva, 2015).

El uso de dosis subterapéuticas de agentes antimicrobianos en la alimentación del ganado y las aves de corral para prevenir y controlar enfermedades infecciosas, produce un aumento de peso mejorado y una mayor eficiencia alimentaria, con el inconveniente de modificar la microflora intestinal y crear una presión selectiva que favorece la aparición de cepas resistentes a los antibióticos (Aarestrup et al., 2004). La aparición de bacterias patógenas y resistentes a los antimicrobianos en animales representa un grave problema de seguridad alimentaria y una amenaza para la salud pública. En bacterias aisladas de aves de corral, se han identificado determinantes de la resistencia a los antibióticos en elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones e integrones, lo que permite potencialmente que estos determinantes se propaguen entre especies (Fricke et al., 2009). Diarrassouba et al. (2007), estudiaron la resistencia a los antibióticos y los determinantes de la virulencia en múltiples granjas de pollos de engorde, y aislaron varias *E. coli* resistentes a los antibióticos (Forgetta y col., 2012), lo cual se traduciría en una importante amenaza.

2.2 ACEITES ESENCIALES

2.2.1 DEFINICION Y COMPOSICION

En el metabolismo de las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, en el que se producen metabolitos necesarios para su funcionamiento y el de los organismos, la mayor parte del carbono, nitrógeno y de la energía termina en moléculas de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, comunes a todas las células y presentes en todas las plantas desempeñando las mismas funciones. Sin embargo, a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas, los metabolitos secundarios, denominados también productos secundarios o naturales, de distribución restringida en el reino vegetal a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies, y que sintetizados en pequeñas cantidades sin función directa en

procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa distribuidos diferencialmente entre grupos taxonómicos. Presentan propiedades biológicas, funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales, muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de la semilla y caracterizándose por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Algunos, proporcionan a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas, venenosas o intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009; Oldfield y Lyn, 2012).

Gran número de estos productos se utilizaban antiguamente como remedios para combatir enfermedades, y actualmente se utilizan además con otros fines tales como resinas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc.

Se clasifican principalmente en:

- Terpenos: Entre ellos se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos: Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides.

Los terpenos, o terpenoides presentan más de 40000 moléculas diferentes. La ruta biosintética común, da lugar a metabolitos primarios entre los que se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran importancia en las estructuras de membranas), así como metabolitos secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C) (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2011) clasificándose por el número de esas unidades que contienen en:

- Hemiterpenos: terpenos de 5 carbonos, es decir, compuestos formados por un isopreno.
- Monoterpenos: terpenos de 10 carbonos, es decir, compuestos formados por dos unidades de isopreno.
- Sesquiterpenos: terpenos de 15 carbonos, es decir, compuestos formados por tres unidades de isopreno.
- Diterpenos: terpenos de 20 carbonos, es decir, compuestos formados por cuatro unidades de isopreno.
- Triterpenos: terpenos de 30 carbonos, es decir, compuestos formados por seis unidades de isopreno.
- Tetraterpenos: terpenos de 40 carbonos, es decir, compuestos formados por ocho unidades de isopreno.
- Politerpenos: terpenos formados por más de ochos unidades de isopreno (Soto-Restrepo y col., 2017).

Estos metabolitos se sintetizan en el citoplasma y plastidios de las células vegetales a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar dicho ácido que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. El IPP y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por pernil transferasas para dar lugar a pernil bifosfatos como geranil difosfato (GPP) precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos.

El grupo de los terpenos, como mencionamos anteriormente, incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), látex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas). Aunque las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno.

A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial. En ese sentido, muchos

terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas.

Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc.

Muchas plantas (limón, menta, eucalipto o tomillo) producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales, responsables de los olores y sabores característicos, algunos de los cuales actúan como repelentes de insectos o insecticidas. Los terpenos que se encuentran en los aceites esenciales son generalmente monoterpenos, como el limoneno y el mentol, principales constituyentes de los aceites de limón y menta, respectivamente.

Los aceites esenciales (AE o EO) se definen como metabolitos secundarios volátiles de las plantas que le dan a la misma un olor, sabor o ambos, distintivos. Son líquidos aceitosos aromáticos, naturales, volátiles, obtenidos por extracción a partir de material vegetal o plantas especiales (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces); constituyen una mezcla compleja de metabolitos secundarios (terpenos, compuestos fenólicos, alcohol), poseen una amplia gama de actividades biológicas, incluidas las antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias. Se obtienen generalmente como resultado de la hidrodestilación, la destilación al vapor, la destilación en seco o el prensado mecánico en frío de las plantas. También a través de fermentación, extracción, y por hidrodestilación asistida por calentamiento óhmico, siendo este último uno de los métodos que presentan mayor rendimiento y conservación de la bioactividad de los aceites. Sin embargo, dependiendo del método elegido, la composición química del EO obtenido puede ser diferente. Los EO son producidos por más de 17500 especies de plantas de muchas familias de angiospermas, tales como Lamiáceas, Rutáceas, Mirtáceas, Zingiberáceas y Asteráceas, aunque solo unos 300 de ellos se comercializan.

La mayoría de los alimentos deben su sabor y olor a sustancias químicas que se encuentran presentes en el orden de partes por millón. En la naturaleza, algunas especies evolucionaron con niveles mucho mayores de estas sustancias químicas que otras. Con el descubrimiento de la destilación, se hizo posible separar del material botánico estas sustancias o sus mezclas, dando lugar al

nacimiento de los EO como producto comercial (Cerrutti y Neumayer, 2004).

Se clasifican en base a diferentes criterios: a) consistencia, b) origen y c) naturaleza química de los componentes mayoritarios (Martínez y col., 2003; López Casigña, 2018):

- a) De acuerdo con su consistencia, los EO se clasifican en esencias fluídas, bálsamos y oleorresinas. Las Esencias fluídas 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 típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.).
- b) De acuerdo con su origen, los EO se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales, se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalol, o la esencia de anís enriquecida con anetol. 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, elaborados por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.).
- c) Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los EO se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias de los componentes mayoritarios. Según esto, los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (p.ej. clavo, canela, anís, etc.) (Martínez y col., 2003).

Se producen y almacenan en estructuras secretoras complejas, como glándulas, cavidades secretoras y conductos de resina, concentrándose en regiones particulares de las plantas, y están presentes como gotas de líquido en ellas, hojas, tallos, flores y frutos, cortezas y raíces de las plantas, por lo que su composición puede ser distinta. Se encuentran en niveles de 20 a 70 %, aunque principalmente dos o tres son los prevalentes de acuerdo al aceite esencial; de hecho, los EO son mezclas muy complejas de principalmente terpenos, terpenoides y fenilpropanoides, pero pueden contener también otros compuestos, como ácidos grasos, óxidos y derivados del azufre, dependiendo no solo de la especie, sino, dentro de ella, de factores como las condiciones de crecimiento, el tiempo y el lugar de recolección de la materia prima, el secado y el almacenamiento.

Proporcionan sabor y olor a innumerables alimentos, aunque también son usados en la industria cosmética. Entre los más difundidos se encuentra el del limón (EOL), siendo la Argentina uno de sus mayores productores en el mundo. Se define al umbral de reconocimiento (UR) como el valor mínimo de un estímulo sensorial que permite la identificación de la sensación percibida. Los datos relativos al UR permiten comparaciones de la intensidad o potencia de las sustancias olorosas. Los UR dependen de la tensión de vapor de los compuestos, la temperatura y la composición del medio. En agua a 20 °C para el limoneno el UR es de 0,01 ppm y para el linalol es de 0,006 ppm. Para tener una referencia, el etanol tiene, en las mismas condiciones, un UR de 100 ppm (Cerrutti y Neumayer, 2004).

Los EO, se han empleado en las industrias farmacéutica, agronómica, alimentaria, cosmética y de perfumes debido a varias propiedades biológicas informadas. De entre 3000, se utilizan comúnmente aproximadamente 300 aceites aislados.

2.2.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Según declaraciones de la OMS (2021), la resistencia a los antimicrobianos es una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad. Requiere de medidas multisectoriales urgentes para poder lograr los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). El uso indebido y excesivo de los antimicrobianos es el principal factor que determina la aparición de patógenos

farmacorresistentes. Se han propuesto diferentes estrategias tendientes al abordaje de esta problemática, que incluyen desde la inhibición de bombas de resistencia a fármacos múltiples, la formación de biopelículas en bacterias y el desarrollo de antibióticos con mecanismos de acción novedosos. En este sentido, dado que la resistencia bacteriana se ha convertido en un problema grave en todo el mundo, es necesario buscar nuevas sustancias activas que puedan superar este inconveniente y mejorar la eficacia del tratamiento de las infecciones bacterianas, tal el caso de los EO.

En el caso específico de los EO, su actividad antimicrobiana depende de la estructura química de sus componentes y de la proporción y tipo de compuestos presentes. Se reconocen alcoholes alifáticos y fenoles que exhiben acción inhibitoria para el crecimiento de hongos, compuestos fenólicos presentes naturalmente en plantas como fenoles simples y ácidos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico y los flavonoides. Dichos flavonoides se han estudiado ampliamente por su actividad antibacteriana y se constituyen como alternativas prometedoras con este fin. En algunos casos, mostraron actividades antibacterianas hasta seis veces más fuertes que los medicamentos estándar en el mercado, frente a *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Farhadi et al., 2019).

Se han realizado numerosos estudios en EO para confirmar la eficacia biológica sobre bacterias y hongos. Sin embargo, varios autores e investigaciones realizadas han sugerido diversos mecanismos de acción, pero es difícil predecirlo exactamente ya que los EO contienen distintos componentes y su acción antimicrobiana no puede ser confirmada por la actividad de un único compuesto. Además, diferentes aceites o sus diferentes componentes presentan un modo de acción antimicrobiano no solo en un lugar de la célula sino en distintos (Carson y col., 2002; Talero, 2019).

Su naturaleza hidrofóbica y sus compuestos fenólicos, les permite interactuar con la membrana lipídica de bacterias patógenas alterándola. Es así como sus compuestos volátiles se unen a las proteínas de la membrana, estas proteínas son enzimas que mantienen las propiedades funcionales de almacenamiento de hidratos de carbono en la membrana lipídica, así podrían ser responsables de la inhibición en sus funciones sobre las células (Wendakoon y Sakaguchi, 1995). También traspasan la membrana citoplasmática y la desorganizan en las

distintas capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos (Knobloch y col., 1986; Stratako y Koidis, 2016).

Los EO han presentado diversos efectos biológicos tales como citotóxicos, fototóxicos y mutagénicos. La citotoxicidad incluye daños sobre la membrana bacteriana. La permeabilización de las membranas se asocia con la pérdida de iones y reducción en el potencial de membrana y colapso en la bomba de protones (Knobloch y col., 1989; Sikkema y col., 1995; Helander y col., 1998; Ultee y col., 2000; Di Pasqua y col., 2007). Algunas investigaciones realizadas por Bakkali y col. (2008), demostraron que determinados EO presentan actividad mutagénica sobre el material de bacterias y levaduras. La exposición a éstos podría inducir daño mitocondrial involucrando a la membrana y al ADN, dando lugar a deficiencias en la respiración celular y a pequeños cambios mutagénicos citoplasmáticos. Pero todo esto depende de la composición del EO, la velocidad de penetración a nivel del citoplasma y de su toxicidad.

Ultee y col. (2000), realizaron estudios sobre la actividad antimicrobiana del carvacrol (presente en aceites de orégano y tomillo) sobre *B. cereus*, un esporo formador, patógeno en alimentos. Expusieron células vegetativas de esta bacteria a concentraciones de carvacrol mayores a 1mM, que permitieron la extensión de la fase de latencia, la disminución de la tasa de crecimiento bacteriano y de la densidad poblacional. Demostraron también que el compuesto produjo un incremento en la salida de protones, con variación del pH e inhibición en la síntesis de ATP, produciendo finalmente la muerte celular.

Otros estudios realizados por Delgado y col. (2004), demostraron que el timol al ser un isómero del carvacrol puede desintegrar la membrana externa e incrementar la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP en células de *E coli* y *S. Typhimurium* (Talero, 2019).

Zengin y Baysal (2014), determinaron que los compuestos α -terpineol, linalol, eucaliptol y α -pineno obtenidos a partir de aceites esenciales tenían actividad antibacteriana in vitro frente a bacterias patógenas desarrolladas durante el deterioro, observándose efectos tóxicos sobre cuatro cepas Gram negativas y tres Gram positivas con diferente nivel de potencia. La bacteria más resistente a todos los componentes probados fue *Shewanella putrefaciens*, la cepa más sensible fue *E. coli* O157: H7.

Si bien existen numerosos estudios realizados para determinar la eficacia

antimicrobiana de los EO vegetales in vitro, en sistemas in vivo contra patógenos transmitidos en alimentos, como las carnes, se ha investigado pobremente (Bajpai et al., 2012).

2.2.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

La aplicación de aditivos sintéticos se utiliza para extender el tiempo de vida de anaquel de los alimentos crudos y/o procesados, como un recurso para prevenir la contaminación durante la producción, venta, distribución de estos. No obstante, existen opiniones controvertidas en referencia a la utilización de conservantes químicos asumiéndoles responsabilidad de toxicidad residual, así como carcinogénicos y teratogénicos (Skandamis et al., 2001). Por ese motivo, Hsouna et al. (2017), resaltan la importancia de los compuestos derivados de plantas y hierbas naturales como una nueva alternativa para prevenir la proliferación de microorganismos y proteger los alimentos de la oxidación.

2.2.4 ACEITE ESENCIAL DE LIMON (EOL)

El limonero (*Citrus limon*) es una planta perteneciente a la familia Rutácea. El género *Citrus*, está integrado por vegetales que constituyen una de las principales fuentes valiosas de este EO utilizado en alimentos y con fines medicinales.

Es el más importante de los árboles frutales en el mundo, con una producción aproximada anual de 115,50 millones de toneladas (Del Ángel-Coronel y col., 2018).

El EOL en nuestro país, tiene una producción aproximada de 4,40 mil toneladas (Min. de Hacienda, 2018) ocupando dicha producción el segundo lugar luego del de naranja dulce.

Argentina es uno de los mayores productores de EOL junto con Estados Unidos e Italia; también producen, aunque con menos relevancia, Brasil, Costa de Marfil, Grecia, España, Israel, Australia, Perú, Guinea, Indonesia, Venezuela y Chile. En nuestro país las principales zonas de producción son Tucumán, Corrientes, Entre Ríos, Misiones y Salta. La producción de este producto GRAS (Generally Recognized as Safe), es exportada aproximadamente en un 40 % al oeste de Europa, 35 % a los Estados Unidos y 8 % a Japón (Cerrutti y Neumayer, 2004). La cáscara de limón contiene 0,40% de aceite, alojado en sacos de esta, ovales,

localizados en la porción coloreada o en el pericarpio (o corteza), constituido por el flavedo y el albedo, y representa las capas exteriores del fruto que actúan como barrera tóxica natural contra microorganismos e insectos. El flavedo (o exocarpio) es la parte más externa pigmentada, mientras que el albedo (o mesocarpio) es la parte interna del pericarpio y suele ser de color blanco y esponjoso. Las glándulas de aceite se encuentran alojadas principalmente en el flavedo y en ellas se almacenan los aceites esenciales característicos de cada especie y variedad.

La parte comestible o pulpa (endocarpio) es la parte más interna del fruto y está formada por segmentos (gajos) separados por septos.

Aunque la mayor producción de EOL se realiza por prensado en frío; se obtiene también por otros métodos como destilación por arrastre de vapor, destilación con agua, hidrofusión, etc.

Existen diferencias que responden al terreno, clima y métodos de producción. En el limón, el tenor de aceite se incrementa con la maduración de este y decrece justo después de los períodos de lluvia. Los frutos blandos generalmente dan menores rendimientos que los firmes, esto es debido a que, en los blandos, la ruptura de los sacos contenedores de aceite es ineficiente.

Como se expresó anteriormente, los EO generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden tener compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos); monoterpenos; sesquiterpenos y fenilpropanos (Martínez y col., 2003). En el caso específico del EOL contiene aproximadamente 2 % de sustancias no volátiles en su mayoría en la forma de Coumarine, alrededor de 18 alcoholes, 16 aldehídos, 11 ésteres, 3 cetonas, 4 ácidos, y 23 hidrocarburos. Los componentes hallados en forma mayoritaria del aceite esencial obtenido por prensado de la cáscara son:

- . 63 % limoneno (Monoterpeno monocíclico)
- . 12 % beta-pineno (Monoterpeno bicíclico)
- . 9 % gama-terpineno (Monoterpeno monocíclico)

Otros componentes cualitativamente importantes son:

- . 1,50 % geranial (aldehído)
- . 1,00 % neral (limón) (aldehído)
- . 0,50 % neril acetato (frutal, floral, rosa)

- . 0,40 % geranil acetato (frutal, floral, rosa)
- . 0,20 % citronelal (fuerte, cítrico, verde)
- . 0,20 % linalol (brillante, lavanda) (monoterpeno aciclico)
- . 0,10 % nonanal (fuerte)

Los hidrocarburos de terpenos constituyen la mayor parte del aceite, son insolubles en agua y susceptibles a oxidaciones. Para producir un aceite estable y soluble se llevan a cabo operaciones de extracción, concentración y deterpenización (Cerutti y Neumayer, 2004).

2.2.4.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EOL

Zu et al. (2010), evaluaron la actividad in vitro de diez aceites esenciales comerciales de diferentes plantas, contra *Propionibacterium acnes*, aunque los aceites esenciales de tomillo, canela y rosa exhibieron las mejores actividades antibacterianas, el aceite esencial de lima también mostró efectos de inhibición positivos logrando matar a la bacteria dentro de los 30 minutos al igual que el aceite esencial de toronja, mientras que el aceite esencial de menta no mató a la bacteria incluso después de 120 minutos.

Sokovic et al. (2010), evaluaron la actividad in vitro de diez aceites esenciales de diferentes plantas contra *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* O157:H7, *Micrococcus flavus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Enteritidis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. Typhimurium*, y *Staphylococcus aureus*. Algunos de los aceites esenciales fueron extraídos en laboratorio, mientras que el aceite esencial de *Citrus limon* fue de origen comercial y mostró tener efectos antibacterianos positivos para todas las bacterias evaluadas por el método de microdilución; mientras que por el método de zonas de inhibición no presentó actividad para *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, pero con resultados positivos para las demás cepas. Estos autores concluyen que el carvacrol y timol fueron los dos componentes de EO con mayor actividad antibacteriana, coincidiendo en los resultados con los reportes de De Oliveira et al. (2015), quienes determinaron el efecto de uso combinado de carvacrol y 1,80-cineol sobre un cultivo mixto de *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas fluorescens* en vegetales procesados.

El carvacrol mostró una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 1,25 µl/ml y el 1,80-cineol de 40 µl/ml, mientras que el índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) de los compuestos combinados fue de 0,25 contra el inóculo mixto, lo que sugiere una interacción sinérgica.

Hsouna et al. (2017), evaluaron la actividad del aceite esencial de flores de *Citrus limon*, con dos componentes dominantes: limoneno (39,74 %) y β-Pineno (25,44 %), frente a bacterias Gram positivas (*B. cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* y *Micrococcus luteus*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *S. Enteritidis* y *Klebsiella pneumoniae*), encontrando en los compuestos derivados de hierbas naturales y plantas, alternativas para prevenir la proliferación de microorganismos y proteger los alimentos de la oxidación, observando así mismo que la aplicación de 0,06 y 0,31 mg/g de aceite esencial de *Citrus limon* sobre carne bovina picada logró inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* demostrando su potencial como conservador de la carne, siendo una prometedora oportunidad para la prevención de la contaminación y el crecimiento de bacterias patógenas a 4 °C de temperatura.

En referencia a la extensión de la vida útil de productos marinos mediante la aplicación de aceites de cítricos, Alfonso et al. (2017), investigaron los efectos bioconservadores de microemulsiones de EOL en sardinas saladas (*Sardina pilchardus*) demostrando en análisis químicos la persistencia de varios compuestos orgánicos volátiles derivados del aceite durante el periodo de maduración que, tras la adición, lograron disminuir las concentraciones de todos los grupos microbianos determinando además menor acumulación de histamina en las sardinas en comparación con el tratamiento control, y puntuaciones más altas de evaluación sensorial para el sabor y la aceptabilidad general en presencia del aceite, resultando una estrategia válida para mejorar la seguridad y las características sensoriales de este producto. De modo similar, Djenane (2015), también evaluó el efecto del aceite esencial de cáscara de cítricos (*Citrus limon* y *Citrus aurantium*) contra *Staph. aureus* inoculado sobre *Sardina pilchardus*, demostrando que el aceite de *Citrus limon* tuvo el mayor efecto antibacteriano, con un valor CIM de 0,25 a 0,40 µl/ml; en tanto al aumentar la dosis a 4 x CIM, el aceite esencial de *Citrus aurantium* redujo completamente el

crecimiento de este microorganismo desde el día 2 hasta el final del almacenamiento a 8 °C.

Además de los resultados precedentes varios estudios han determinado otras funciones principales del EOL, tales como su actividad antifúngica (Razzaghi et al., 2009; Bosquez et al., 2010; Fekrazad et al., 2015; Simas et al., 2017); su actividad antioxidante como importante preservador natural (Tounguanchan et al., 2013; Zengin y Baysal, 2014; Djenane, 2015); su actividad citotóxica y anticancerígena in vitro (Zu et al., 2010); como bioinsecticida con actividad contra larvas y mosquitos adultos (Fouad y da Cámara, 2017; Chellappandian et al., 2018) y como aditivo en biopelículas activas (Bosquez et al., 2010; Domínguez y Jiménez, 2012; Tounguanchan et al., 2013; Peretto et al., 2014; Fernández et al., 2015; Perdones et al., 2016).

2.3 ECOLOGÍA MICROBIANA

El proceso de desarrollo en alimentos es complejo, regido tanto por factores que impactan en la microbiota como en la matriz alimentaria que la contiene. Dichos factores, genéticos, bioquímicos y medioambientales (tríada GBMa), conforman la ecología microbiana, encargada de estudiar la interacción entre ellos y los atributos químicos, físicos y estructurales del alimento, los factores y tecnologías de proceso y la microbiota que constituye la población microbiana correspondiente (Rodríguez y col., 2019).

Un microorganismo alterador o productor de ETA puede ser afectado por múltiples factores limitantes presentes en el alimento, p.ej. temperatura, pH, A_w , de proceso (conservantes, deshidratación, cocción) e intrínsecos del microorganismo (injuria, inóculo). La mayoría de estos factores interfieren con la estabilidad del medio interno celular de los microorganismos, representada por variables tales como el pH intracelular, la osmolaridad celular, la integridad del ADN y las membranas celulares.

2.4 MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

La "microbiología predictiva" ha sido utilizada en el campo de la microbiología industrial, sin embargo, existen antecedentes en microbiología de alimentos, ya que, en 1922, Esty y Meyer describieron la muerte térmica de esporas de *Clostridium botulinum* tipo A mediante un modelo logarítmico lineal, en el que

estimaron el procesamiento térmico necesario en alimentos enlatados con bajo contenido de ácido, para inactivar un porcentaje de la población celular en una unidad de tiempo constante.

Scott (1936), investigó cómo la tasa de mortalidad específica dependía del agua disponible, cuantificada hoy por la llamada A_w , un número adimensional entre 0 (seco) y 1 (húmedo).

Los primeros modelos predictivos de *Salmonella* publicados por Anellis, Lubas y Raymond en 1954, se centraron en los problemas técnicos de la determinación y el cálculo de la resistencia al calor probados sobre siete cepas diferentes de *Salmonella*, y la inactivación bacteriana en productos de huevo, carne de pollo y otros productos alimenticios. Las investigaciones demostraron la influencia del pH en la resistencia al calor de las bacterias y la tasa de destrucción, que fue en algunos casos, más rápida en medios alcalinos.

La microbiología predictiva describe matemáticamente el efecto de las condiciones ambientales en la respuesta bacteriana al entorno alimentario en varias etapas de la cadena alimentaria.

La necesidad de contar con modelos propios en microbiología de alimentos comenzó a considerarse en las últimas 2 décadas. Fakruddin y col. (2011), refieren que McMeekin et al. (1993), en el primer libro publicado sobre el tema, la define como una ciencia cuantitativa que permite evaluar objetivamente el efecto de las operaciones de procesamiento, distribución y almacenamiento sobre la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos. Para estos autores, el objetivo de la microbiología predictiva es desarrollar ecuaciones matemáticas que describan el comportamiento de los microorganismos bajo diferentes factores ambientales (físicos, químicos, competitivos). Por su parte, Yarce (2013), la define como el campo de estudio que combina elementos de la microbiología, matemáticas y estadística para desarrollar modelos que además de describir, también predigan matemáticamente el crecimiento o muerte de microorganismos cuando se ven sometidos a factores específicos.

A partir del modelado microbiano se puede describir y predecir el comportamiento del microorganismo en determinadas condiciones ambientales, las que pueden ser intrínsecas, como el pH o extrínsecas, como la temperatura o la salinidad. Las respuestas microbianas se prueban en condiciones controladas y los resultados se expresan como una ecuación matemática que

permitirá la predicción de combinaciones de condiciones no probadas (Hajmeer y Cliver, 2002). Como dichas respuestas son reproducibles, de este modo es posible, predecir las respuestas de esos microorganismos en otras condiciones similares (Ross y McMeekin, 2000).

Chang Fornaris (1998), afirma que la microbiología predictiva se basa en el desarrollo de modelos matemáticos que permiten predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos bajo determinadas condiciones ambientales, que pueden afectar el crecimiento microbiano en los alimentos por lo cual estos factores deben tenerse en cuenta para lograr una determinada predicción; ejemplo de ellos, son la temperatura y el pH.

Varios autores consideran el modelado predictivo del crecimiento y la inactivación bacteriana como tema de investigación de importancia entre los microbiólogos de alimentos (Buchanan, 1993; Skinner y Larkin, 1994; McMeekin et al., 1997).

Estos modelos permiten estimar la vida útil de los alimentos, aislar puntos críticos en el proceso de producción y distribución y pueden dar una idea de cómo las variables ambientales afectan el comportamiento de bacterias patógenas o de descomposición. La microbiología predictiva proporciona una estimación del crecimiento potencial de microorganismos particulares en una variedad de condiciones. Los modelos utilizados en microbiología predictiva se desarrollan a partir de trabajos experimentales, generalmente realizados en medios de laboratorio. Estos modelos luego se extrapolan a los alimentos (Fakruddin y col., 2011).

Desde el punto de vista de la salud pública, el desarrollo de bacterias patógenas y microorganismos de deterioro resulta indeseable por el posible riesgo de causar en los consumidores ETA. El crecimiento de los microorganismos se encuentra influenciado simultáneamente por la acción de diversos factores físicos y químicos que resultan limitantes. En ese sentido, tanto los microorganismos alteradores como los patógenos, causantes de ETA tienen una capacidad de sobrevivir e iniciar su crecimiento influenciada por la acción conjunta de factores extrínsecos, como pH, temperatura, A_w ; factores intrínsecos, propios del alimento y los propios del microorganismo (Coll Cárdenas y col., 2001).

Para prevenir el desarrollo microbiano de las bacterias alteradoras, resulta útil la aplicación del concepto de tecnología de obstáculos mediante métodos combinados, que de modo individual no generarían una adecuada acción de preservación, aunque sí en combinación o de forma conjunta. El hecho de aplicar este concepto y obtener resultados satisfactorios, al comprobar la influencia de los factores ambientales, sobre el desarrollo microbiano merece un estudio minucioso y por ende ser cuantificado. El diseño de procesos que garanticen un nivel de calidad y seguridad hasta el consumo, se realiza la mayor parte de las veces con información incompleta y para una situación determinada. Esto es debido a la falta de datos respecto al efecto que un conjunto de factores distintos tendría sobre los microorganismos en diversas condiciones (Farber,1986; Bell y col.,1997; Coll Cárdenas y col., 2001).

La velocidad de crecimiento de los microorganismos se puede predecir utilizando modelos matemáticos, a partir de los que se logra establecer, la duración y seguridad de los alimentos, determinar la estabilidad microbiana de nuevos productos alimenticios y ayudar en la evaluación de posibles riesgos para la salud basándose en ecuaciones aplicadas a determinadas condiciones ambientales.

Las predicciones, a veces, presentan imprecisiones atribuyéndose como principal desventaja e indicando sólo una tendencia, siendo imposible realizar la predicción fuera del rango de condiciones consideradas.

Los modelos se clasifican en tres niveles:

1) Modelos de nivel primario: su objetivo es describir matemáticamente la curva de crecimiento generada por los microorganismos de interés bajo condiciones ambientales definidas, con el objeto de estimar los parámetros cinéticos que caracterizan dicha curva: tiempo de latencia, máxima velocidad específica de crecimiento y máxima densidad celular (Cayré y col., 2007).

En los mencionados modelos, se consideran también cambios en el número de microorganismos en función del tiempo, cuantificando p.ej. en UFC/rnl, formación de toxinas, productos metabólicos, absorbancia o impedancia (Coll Cárdenas, 2005). Ejemplos de estos modelos son la ecuación de Gompertz, la ecuación exponencial y el modelo logístico. La ecuación de Gompertz es uno de los modelos más utilizados para describir el desarrollo microbiano (Gibson y col.,

1988; Zwietering, 1990) determinando la respuesta de los microorganismos bajo diversas combinaciones de factores (Buchanan y Klawitter, 1992). Permite estimar parámetros tales como tiempo de latencia (LPD), velocidad específica de crecimiento (μ) y la máxima concentración de células (MPD) de los microorganismos en esas condiciones (Coll Cárdenas, 2005).

2) Modelos de nivel secundario: son modelos descriptivos, basados en las respuestas de los parámetros de los modelos primarios, al modificar condiciones de desarrollo tales como temperatura, pH o Aw. Ejemplo: ecuación de Arrhenius, modelo de la raíz cuadrada.

3) Modelos de nivel terciario: Se corresponden a softwares de cálculos que transforman a los modelos anteriores, primario y secundario en programas que logran interpretar la respuesta de los microorganismos en las diferentes condiciones y comparar el comportamiento de estos verificando los efectos o contrastar el comportamiento de varios microorganismos.

A su vez, los modelos pueden ser caracterizados como empíricos, aquellos que son puramente descriptivos o cinéticos que se basan en criterios microbiológicos; asimismo, pueden ser lineales, no lineales, segregados (población de células heterogéneas) o no segregados, estructurados (multicomponentes) o no estructurados (Whiting, 1995; Coll Cárdenas, 2005).

Los modelos matemáticos se realizan en dos etapas principales:

1) Modelado de la curva de crecimiento del microorganismo

2) Descripción de la variación de los distintos parámetros que afectan la mencionada curva.

Estas curvas se ajustan y sus parámetros se derivan usando programas computacionales (Buchanan, 1991).

La elaboración de un modelo matemático implica la validación de este, lo cual comprende una primera etapa en la cual se realizan experiencias en medios de cultivo bajo combinaciones de los factores limitantes, diferentes a las empleadas en la construcción del modelo a fin de comparar los resultados experimentales con los predichos. En una segunda etapa, se realizan ensayos de validación en un alimento elegido, bajo algunas condiciones particulares de interés y se comparan los resultados experimentales con los predichos. La validación de un modelo matemático elaborado a partir de los resultados obtenidos en medios de

cultivo, simulando las condiciones de un sistema alimenticio, es una condición fundamental para su empleo en la predicción del comportamiento de los microorganismos de interés en dicho sistema (Whiting y Masana, 1994).

2.4.1 MODELO DE GOMPERTZ

Entre las funciones matemáticas más reconocidas, este modelo diseñado para describir fenómenos biológicos y funciones asociados al crecimiento, asume que la tasa de crecimiento se incrementa monótonicamente hasta cuando alcanza un máximo y después decrece en forma monótona asintóticamente. La correspondiente curva de crecimiento es una sigmoideal, con un punto de inflexión (que corresponde a la máxima tasa de crecimiento) y una asíntota (Lawrence y Flower, 2002).

La ecuación de Gompertz surge a partir de modelos de crecimiento autorregulados, donde la tasa de crecimiento decrece exponencialmente con el tiempo después de alcanzar el punto de inflexión. Es una función doble exponencial basada en 4 parámetros que describen una curva sigmoideal asimétrica (Coll Cárdenas, 2005).

El modelo de Gompertz es cinético porque se basa en la respuesta del agente de estudio, crecimiento o supervivencia bajo determinadas condiciones (McMeekin et al., 1993), y primario porque describe, fundamentalmente, el número de microorganismos en función del tiempo.

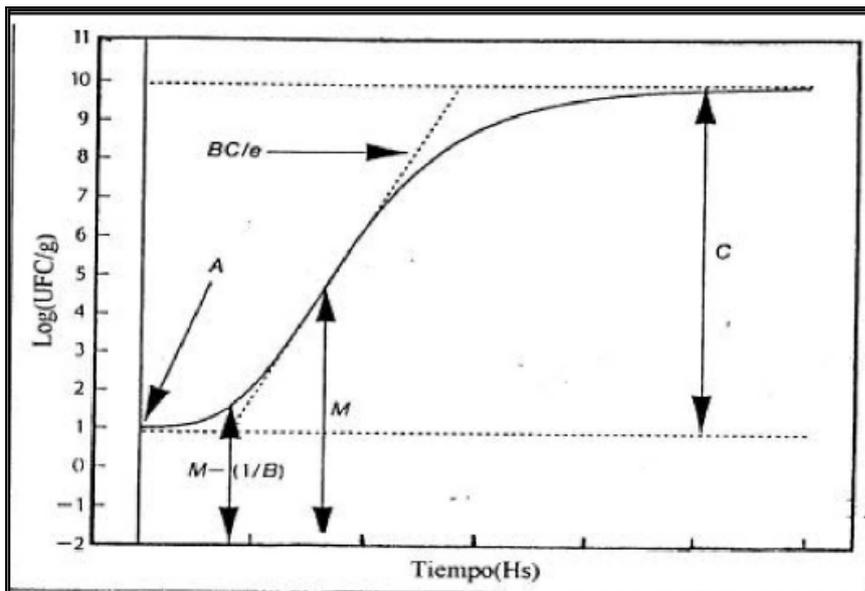


Figura 1: Parámetros del Modelo de Gompertz

La Figura 1 muestra los parámetros del modelo de Gompertz que surgen a partir de la siguiente ecuación.

Ecuación de Gompertz:

$$\text{Log } N = A + C \times \exp\{-\exp[-B(t-M)]\} \quad (1)$$

Donde: Log N es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos [$\log(\text{UFC/g})$] al tiempo t, dado en horas; A es el logaritmo de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente (es equivalente al logaritmo de los niveles iniciales de bacterias) [$\log(\text{UFC/g})$]; C es el logaritmo de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (es el número de ciclos log de crecimiento) [$\log \text{UFC/g}$]; M es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento [hs]; B es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo M [hs^{-1}].

De estas cuantificaciones se derivan los parámetros: velocidad específica de crecimiento ($\mu = B \times C/e$, con $e = 2,71$, [$\log(\text{UFC/g})/\text{hs}$]); duración de la fase de latencia ($\text{LPD} = M - 1/B$, [hs]) y la máxima densidad de población ($\text{MPD} = A + C$, [$\log \text{UFC/g}$]).

Cayre y col. (2007), compararon tres modelos primarios: Logístico, Gompertz y de Baranyi, para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y de *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas y estimaron los parámetros cinéticos de crecimiento como tiempo de latencia (LPD), velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) y máxima densidad de población (MPD max). Se comparó la bondad de ajuste de los modelos, la incertidumbre y precisión de las estimaciones, observándose que el modelo de Gompertz produjo uno de los mejores ajustes en la mayoría de los casos, en tanto las estimaciones de LPD dadas a través de este modelo mostraron el mejor comportamiento y fueron las más exactas.

2.4.2 MODELO DE REGRESIÓN LINEAL

Esta ecuación fue modelada por Buchanan (1991) a partir de dos ecuaciones discontinuas, una cuando la población microbiana es igual al inóculo y la otra cuando este valor declina, pasado un determinado tiempo.

La ecuación, en ese caso se expresa como:

$$\text{Log } N_t = \text{Log } N_0 + a \times t \quad (2)$$

Donde: $\text{Log } N_t$ es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos finales [Log (UFC/g)] al cabo del tiempo t , dado en [hs]; $\text{Log } N_0$ es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos iniciales [Log (UFC/g)] y a corresponde a la pendiente de la regresión [$(\text{UFC/g})^{-1}\text{hs}^{-1}$] que es negativa cuando hay efecto bactericida (Whiting y Masana, 1994).

Puede considerarse que los microorganismos están en fase de latencia si la pendiente a adquiere un valor menor a $0,01 (\text{UFC/g})^{-1}\text{hs}^{-1}$, o si la diferencia entre los recuentos finales y los iniciales son menores a $0,50$ ciclos logarítmicos. Calculándose, la fase de latencia como el tiempo requerido a partir del cual el desarrollo microbiano aumenta $0,50 \text{ Log}$ del nivel inicial ($\text{LPD} = 0,50/a$).

2.5 EVALUACION SENSORIAL

La calidad sensorial de un alimento es el conjunto de sensaciones experimentadas por una persona cuando lo ingiere, se relacionan con características del producto como su color, sabor, aroma y textura, atributos que influyen en la decisión del consumidor en el momento de elegir un producto (Carduza y col., 2021). El concepto de calidad de un alimento puede ser definido como el grado de excelencia que posee y se encuentra vinculado estrechamente con su aceptabilidad.

Para Bogner (2003), medir la calidad de un producto no es fácil debido a que los consumidores realizan juicios de valor cada vez que adquieren o consumen un alimento, empleando para ello, uno o algunos de sus sentidos. A fin de cuantificar valoraciones se utiliza el análisis sensorial para determinar si los consumidores detectan diferencias en los alimentos respecto de su sabor, olor, jugosidad, ternura, textura, entre otros ya que las modificaciones en la alimentación animal pueden alterar las propiedades organolépticas de sus productos y por lo tanto su aceptación (Hernández, 2005).

3-OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

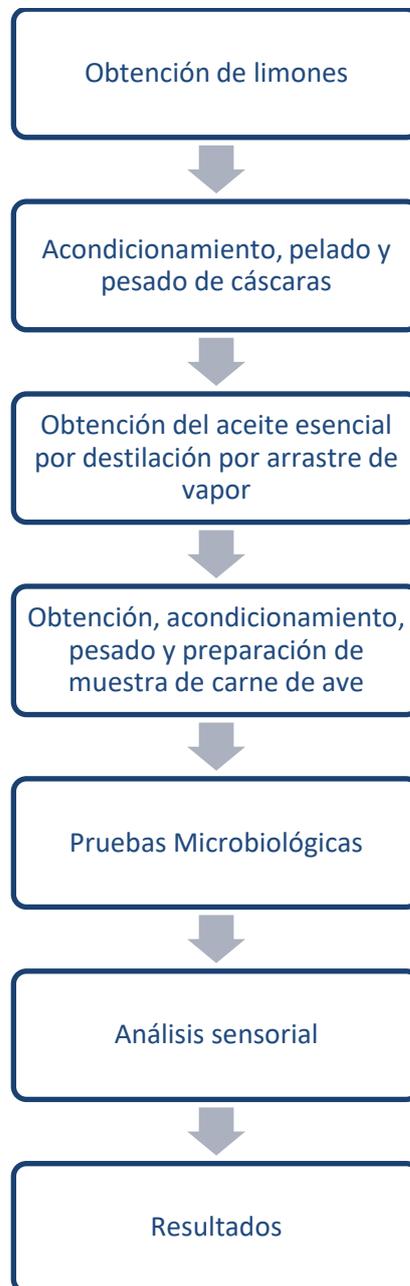
Los objetivos generales de este estudio fueron evaluar y demostrar el efecto inhibitor del aceite esencial de limón sobre microorganismos mesófilos presentes en la superficie de carne aviar, potencialmente implicados en Enfermedades Transmitidas por Alimentos –ETA-.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer y producir aceite esencial de limón (EOL) en una planta piloto.
- Identificar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) del EOL producido sobre microorganismos mesófilos en estudios "*in vitro*".
- Aplicar la CIM del EOL producido sobre la carne aviar para determinar su posible acción inhibitoria sobre el desarrollo de microorganismos que puedan estar implicados en ETA.
- Evaluar la vida útil por estabilidad microbiana de la carne aviar cruda, tratada con EOL y refrigerada a 4 y 8 °C.
- Evaluar la aceptabilidad sensorial de la carne aviar tratada con EOL previo a su cocción.

4- MATERIALES Y MÉTODOS

ESQUEMA DE ACTIVIDADES



4.1 OBTENCIÓN DEL EOL.

4.1.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

La Tabla 3 presenta los diferentes métodos que pueden utilizarse para la extracción de aceites esenciales.

Tabla 3. Métodos de extracción de Aceites Esenciales

Tipo de Método	Procedimiento	Productos obtenidos
1.Métodos directos	1.1 Extrusión	Aceites esenciales cítricos
	1.2 Exudación	Gomas, resinas, bálsamos
2.Destilación	2.1 Directa	Aceites Esenciales y aguas aromáticas
	2.2 Arrastre con vapor de agua	
	2.3 Destilación-maceración (liberación enzimática de agliconas en agua caliente)	
3.Extracción con solventes	3.1 Solventes volátiles	Infusiones y resinoides alcohólicos
		Concretos y absolutos
	3. 2 Solventes fijos (grasas y aceites)	Absolutos de pomadas
		Absolutos de enflorados
3.3 Extracción con fluidos en estado supercrítico		

4.1.2 EXTRACCIÓN DE EOL EN PLANTA PILOTO

Para el presente estudio se utilizó aceite esencial de limón obtenido por autoproducción en el laboratorio de la Cátedra de Biofísica de la FCV UNLP. Luego dicho aceite fue caracterizado por técnicas de densidad con el método del picnómetro, pH mediante un peachímetro (Waterproof pHTestr 30) y tiras reactivas, temperatura de ebullición, % de rendimiento.

4.1.2.1 ADQUISICIÓN DE MATERIA PRIMA PARA OBTENCIÓN DE EOL

El material de trabajo fue el hesperidio o fruto del Limón (*Citrus limon* (L.) de la Familia: Rutácea). Los limones se adquirieron en el comercio local. Se eligió aquellos de similar tamaño, variedad y grado de maduración sin distinguir

procedencia o época de cosecha. Se utilizaron limones, de tamaño mediano, corteza gruesa, dura y superficie lisa, como se observan en la Figura 2.a.



Figura 2: Limones utilizados para la extracción de EOL en planta piloto. a) Elección de tamaño mediano; b) peso promedio 180 g.

Para su selección se tuvo en cuenta el estado de los limones según el color y se trabajó con limones de peso promedio de 180 g, medidos a partir de una balanza de precisión (Ohaus) (Fig. 2.b)

4.1.2.2 ACONDICIONAMIENTO

Una vez en el laboratorio, se procedió al lavado de los frutos con agua clorada procediendo a un frotado manual suave con el objeto de retirar posibles impurezas adheridas a la superficie de las cáscaras. Posteriormente, se secaron las cáscaras con toallas de papel absorbente de uso domiciliario.

Para el acondicionamiento de las cáscaras, previo a la obtención de aceite esencial, se utilizaron dos procedimientos diferentes:

- 1) Mediante el pelado con hoja de bisturí estéril (número de hoja 11), denudando y seccionando el utrículo (vesícula o cavidad donde se encuentra el aceite esencial, localizado en el flavelo) (Fig. 3.a).
- 2) Mediante el rallado fino con rallador *ad hoc* (Fig. 3.b) suponiendo que, la ruptura por rallado de los sacos de la cáscara contenedores de aceite, lograrían recuperar mayor porcentaje de producto.

En cada procesamiento se obtuvieron y pesaron con balanza de precisión 500 g de material.

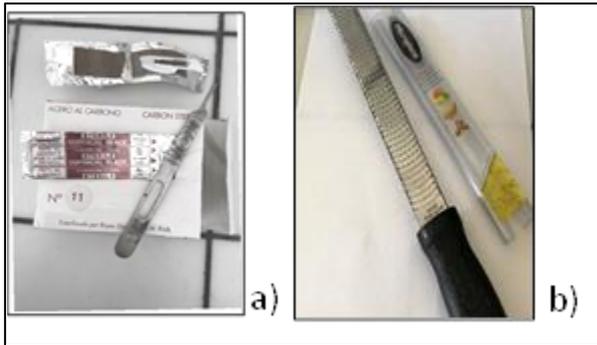


Figura 3: Acondicionamiento de las cáscaras mediante a) bisturí estéril; b) rallador ad hoc.

La Figura 4 muestra los diferentes pasos que se realizaron para acondicionar y obtener las cáscaras, materia prima para la extracción de EOL.



Figura 4: Diferentes pasos de acondicionamiento de los limones hasta la obtención de las cáscaras. a) Lavado; b) secado; c) pelado; d) pelado total; e) y f) muestran las glándulas conteniendo el aceite previo; g) pesado; h) e i) muestran las cáscaras obtenidas por rallado.

4.1.2.3 EXTRACCION DE EOL

Para la extracción de EOL se utilizó el Método de destilación por arrastre con vapor. Dicha destilación es la técnica utilizada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en una mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables. Es una operación frecuentemente utilizada para la purificación y aislamiento de líquidos orgánicos como los aceites esenciales de tejidos vegetales.

4.1.2.3.1 FUNDAMENTO

El vapor generado por acción de la temperatura en un hervidor se inyecta a un destilador por donde pasa a través del material botánico. En este procedimiento, en el que intervienen dos líquidos heterogéneos, cada uno ejerce su propia presión de vapor, la mezcla hierve cuando las presiones de vapor combinadas alcanzan la presión del sistema. Los aceites esenciales con puntos de ebullición de hasta 300 °C, se evaporan a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua. El vapor arrastra D-Limoneno, a pesar de que este tenga un punto de ebullición más alto que el agua (352 °F = 177,70 °C). El vapor y el aceite esencial son condensados y separados (Cerutti y Neumayer, 2004).

Los aceites esenciales producidos de esta forma son, frecuentemente, diferentes al aceite original que se encuentra naturalmente en el material botánico ya que el calor modifica los compuestos químicamente por hidrólisis u oxidación. Algunos productos químicos, que no son volátiles en el vapor, quedan en el destilador; y son responsables del sabor más que del olor. Otras sustancias muy volátiles se pierden en la destilación.

4.1.2.3.2 METODOLOGÍA

En nuestra planta piloto, primeramente, se utilizó un equipo de destilación consistente en: dos balones de 1000 ml cada uno, uno generador de vapor y el otro de extracción, un refrigerante y un erlenmeyer de recolección, todos de vidrio tipo Pyrex conectados de manera eficiente como para poder llevar a cabo este procedimiento. Por debajo de cada balón se colocó un mechero. En el balón generador de vapor se colocaron 600 ml de agua que se calentaron hasta alcanzar la ebullición. En el balón de extracción se colocaron los 500 g de

cáscara obtenidos previamente (Sección 4.1.2.2), allí fue donde se separaron los aceites esenciales que fueron arrastrados por el vapor de agua proveniente del balón generador, llegando posteriormente hacia el refrigerante. La fracción no volátil permaneció en el balón de extracción hasta el final del procedimiento. Al enfriarse el vapor, se recuperaron los componentes en forma líquida mediante un proceso de condensación (Fig. 5).



Figura 5: Equipo de destilación de EOL por arrastre de vapor

Posteriormente, se reemplazó esta metodología utilizando un solo balón de 500 ml donde se colocaron 500 g de cáscara y 600 ml de agua destilada, la cual alcanzó la ebullición a partir de una manta calefactora (Numak). Dicha manta presentó la ventaja de poder regular con mayor precisión la temperatura, brindando además una mayor seguridad al trabajar en el laboratorio, al ser un sistema de calefacción cerrado, evitando así riesgos provocados por las llamas abiertas y distribuyendo el calor de una manera más uniforme sobre el producto (Fig. 6).



Figura 6: Equipo de hidroextracción de EOL.

En este procedimiento, esta destilación, también llamada hidroextracción utiliza vapor saturado, estando la materia en contacto con un reflujo del condensado formado en el interior del destilador (Palomino y Cerpa, 1999).

Transcurrida una hora y media de destilación, se obtuvo en una ampolla de decantación el aceite esencial, el que se separó de la fase acuosa o hidrolato luego de 24 hs (Fig. 7.a). Se pasó a una bureta de 25 ml, para mayor separación dejándolo durante otras 24 hs (Fig. 7.b) y posteriormente se recolectó y caracterizó fisicoquímicamente constatando volumen, % de rendimiento, densidad y pH. Se envasó en frascos estériles, de vidrio color caramelo y se mantuvo refrigerado a 4 °C hasta su posterior aplicación. Se debe tener en cuenta que todos los aceites esenciales deben almacenarse en lugares secos, en recipientes completamente herméticos, en lugar fresco y al abrigo de la luz, preferentemente en frascos color caramelo para evitar el deterioro causado fundamentalmente por la oxidación, polimerización o hidrólisis.

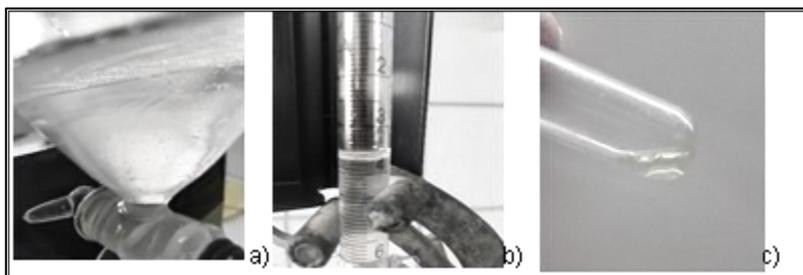


Figura 7: Obtención de EOL. a) Recolección en ampolla de decantación; b) Separación en bureta; c) Obtención final.

4.1.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) es una prueba de sensibilidad utilizada para hallar la mínima concentración de un antimicrobiano que es capaz de prevenir el desarrollo visible de un microorganismo (CLSI, 2015). En tanto, la concentración bactericida mínima (CBM) es la menor concentración de agente antimicrobiano que puede matar al 99,90 % de los microorganismos (CLSI, 1998).

El caldo Mueller Hinton (Laboratorios Britania) es el medio de cultivo de elección utilizado para las pruebas de susceptibilidad de organismos aerobios y anaerobios facultativos, aislados comúnmente y de rápido crecimiento porque permite el desarrollo satisfactorio de la mayoría de los agentes patógenos, posee una aceptable reproducibilidad de resultados y existe una gran cantidad de datos y experiencia sobre las pruebas de susceptibilidad (CLSI, 2015). El detalle de su composición se presenta en el Anexo 2.

4.1.3.1 CEPA UTILIZADA Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO

En el presente trabajo de investigación, se trabajó con una cepa de referencia de *E. coli*, provista por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. *E. coli* es un microorganismo que puede encontrarse comúnmente en las carnes. Para preparar el inóculo, se partió de un cultivo puro de la cepa de *E coli* ATCC 25922 en agar nutritivo incubado previamente a 37 °C durante 48 hs. Seguidamente se preparó una suspensión microbiana tomando con un ansa estéril entre 5 y 7 colonias del cultivo en 5 ml de solución fisiológica comparándola con el patrón de turbidez al 0,50 de la escala de McFarland ($1,50 \times 10^8$ UFC/ml). Para efectuar la comparación de turbidez se colocaron los dos tubos frente a una cartulina con fondo blanco y líneas negras de contraste, de acuerdo con lo indicado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2015).

4.1.3.2 PREPARACIÓN DEL EOL A UTILIZAR COMO ANTIMICROBIANO

Con el fin de determinar los valores de las CIM y CBM del EOL para la suspensión bacteriana, se preparó una dilución 1/10 del EOL en propilenglicol (Biopack Lab.), usado como solvente. Dicho solvente ha sido utilizado

previamente para colorantes alimenticios antioxidantes y preparados de aceites esenciales y aromas, el mismo no interviene como inhibidor de microorganismos (Ortuño, 2006; Talero, 2019)).

4.1.3.3 DETERMINACIONES

Para determinar la CIM y CBM en el ensayo, se realizó el método de micro dilución en caldo de Kirby - Bauer (NCCLS, 2000). El inóculo se realizó a partir de la cepa de referencia anteriormente citada. Se prepararon 10 tubos con 1 ml cada uno de caldo Mueller Hinton. Al primero de ellos se le agregó 1 ml de la dilución de aceite en propilenglicol (solución de EOL al 10%) y a partir de allí se hicieron diluciones seriadas al medio (1/2) adicionando 1 ml de cada dilución a cada tubo de caldo Mueller Hinton. Las concentraciones ensayadas fueron de 5,00 %, 2,50 %, 1,25 %, 0,62 %, 0,31 %, 0,15 %, 0,08 %, 0,04 %, 0,02 % y 0,01% V/V las que fueron inoculadas con 50 µl del inóculo bacteriano (*E. coli*, ATCC 25922). Se incluyeron, además, un control de esterilidad o control negativo (caldo con el agente antimicrobiano, sin microorganismo) y un control de crecimiento o control positivo (caldo con el microorganismo, sin agente antimicrobiano) (Fig. 8).

Todos los tubos fueron homogeneizados mediante un agitador vórtex y se incubaron a 35 °C en estufa durante 18 hs, obteniéndose luego la CIM.

Como los antimicrobianos no siempre eliminan la totalidad de una población bacteriana, es conveniente realizar la prueba de actividad bactericida mediante la determinación de la CBM. En ese sentido, a partir de los tubos inoculados donde no se observó desarrollo a simple vista se realizaron subcultivos, tomándose una ansada de cada tubo y sembrando por agotamiento en placas de Petri individuales que contenían Agar Tripteína Soya (ATS, Laboratorios Britania) incubándolas luego en estufa a 37 °C durante 24 hs.

La CIM se evaluó como la menor concentración de EOL que inhibió el desarrollo de los microorganismos mediante observación a simple vista, tomándose como referencia los controles positivo y negativo. La CBM se determinó mediante el recuento de las UFC en las placas subcultivadas a partir de los tubos donde no se observó turbidez.

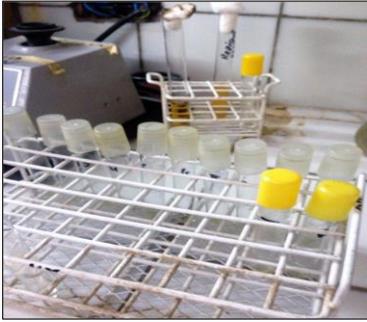


Figura 8. Realización del método de microdilución de Kirby-Bauer para determinar la CIM del EOL.

4.1.4 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS MUESTRAS DE CARNE DE AVE.

Para la determinación de la calidad microbiológica de la carne de ave se utilizaron pechugas de pollo de un peso promedio de 700 g, refrigeradas, adquiridas en comercios locales de tipo supermercado, envasadas individualmente en bandejas de poliestireno expandido (Fig. 9.a). Una vez en el laboratorio, se tomaron 30 muestras de 10 g, circulares, cortadas asépticamente con bisturí de hoja estéril N° 11 y colocadas en placas de Petri estériles de 19,62 cm² de superficie (Fig. 9.b).

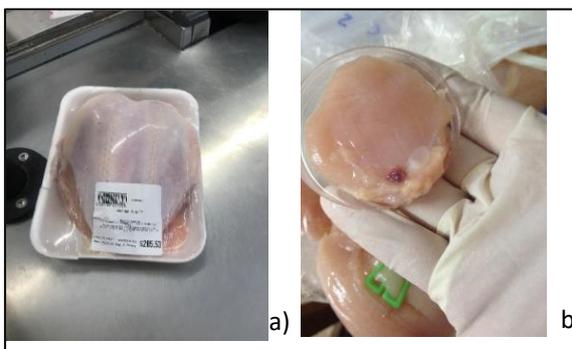


Figura 9: a) pechugas comerciales; b) muestras obtenidas en el laboratorio.

A diferentes tiempos de almacenamiento, se hisoparon las superficies de las carnes, mediante hisopos estériles realizándose las diluciones correspondientes en tubos con 9ml de agua peptonada estéril 0,1%. Dichas diluciones se sembraron en profundidad en placas estériles con el agregado de P.C.A para el recuento de Microorganismos Mesófilos Totales, Agar Cristal Violeta Rojo Neutro Bilis para *Enterobacteriaceae* y Agar Cetrimide para *Pseudomonas* spp (37 °C, 48 hs). Para cuantificar los resultados, se utilizó un cuenta colonias electrónico

adecuado, expresando los recuentos como log N (N: unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado (UFC/cm²)).

Las experiencias se realizaron por duplicado.

4.1.5 DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN DEL EOL SOBRE PECHUGAS DE CARNE DE AVE.

Para evaluar la acción del EOL sobre microorganismos mesófilos, potencialmente implicados en ETA, presentes en la superficie de carne aviar, se utilizaron pechugas de peso promedio 600 a 700 g, de procedencia comercial. Estas fueron tratadas asépticamente en el laboratorio y cortadas en 30 muestras circulares de 10 g, colocándolas en placas de Petri estériles de 19,62 cm² de superficie. La mitad de las muestras se rociaron con 1ml de dilución de EOL en propilenglicol (concentración según la CIM determinada) y se identificaron como tratadas, en tanto las otras fueron consideradas como control, sin tratar. Posteriormente, todas las muestras se envasaron en bolsas individuales de polietileno de 50 µm de espesor de baja penetración al oxígeno, permeabilidad al vapor de agua (WVP) = 12 g m⁻² atm⁻¹ día⁻¹ a 30 °C, humedad relativa (HR) = 78 % y tasa de transmisión de oxígeno (OTR) = 5000 cm³ m⁻² atm⁻¹ día⁻¹ a 23 °C y se almacenaron a temperaturas de refrigeración controlada en cámaras de 4 y 8 °C durante un tiempo máximo de 15 días.

A diferentes tiempos de almacenamiento, se realizaron recuentos microbianos de las muestras tratadas y sin tratar, tomándose las muestras de igual forma que en el punto anterior y sembrándose en los mismos medios, P.C.A para determinar Microorganismos Mesófilos Totales, Agar Cristal Violeta Rojo Neutro Bilis (CVRNB) para *Enterobacteriaceae* y Agar Cetrimide, para *Pseudomonas* spp. (37 °C, 48 hs). Los recuentos se cuantificaron mediante un cuenta colonias electrónico adecuado y se expresaron como log N.

Los resultados se modelaron matemáticamente, aplicando el modelo de Gompertz o el de regresión lineal según la cinética de crecimiento.

Las experiencias se realizaron por duplicado (Fig. 10).

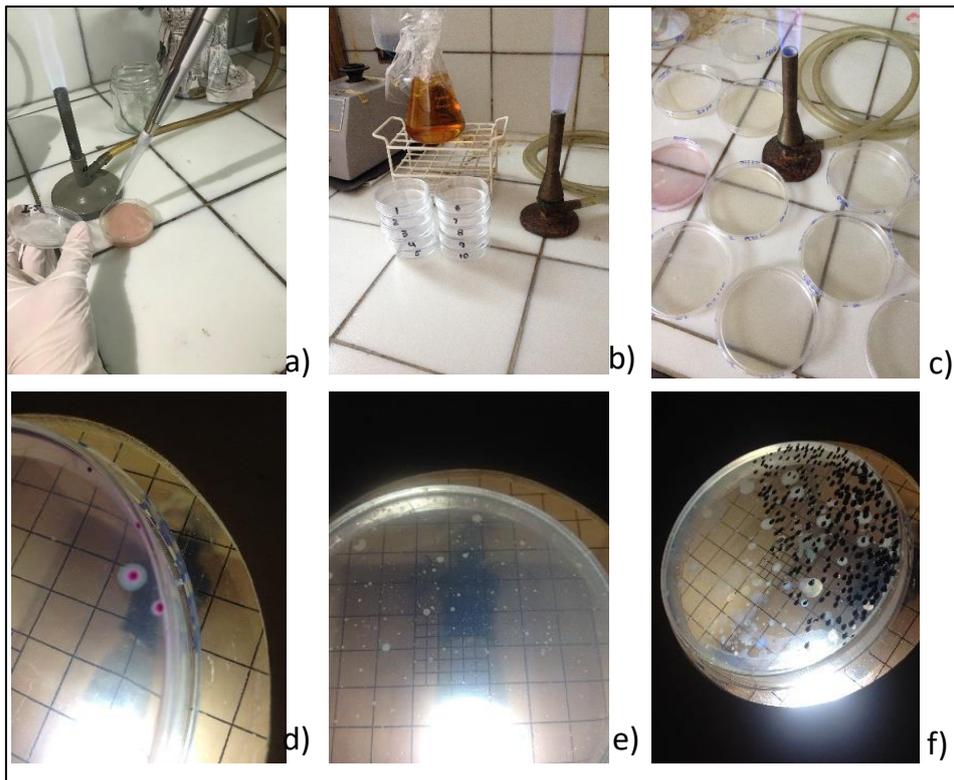


Figura 10: Determinaciones microbiológicas en pechugas de ave para evaluar la acción del EOL. a) Aplicación de dilución de EOL sobre muestra de pechuga; b) y c) siembras de medios de cultivo; d) recuento de Enterobacterias en Agar CVRNB; e) recuento de *Pseudomonas* spp. en Agar Cetrimide; f) recuento de Microorganismos Mesófilos Totales en P.C.A

4.1.6 DETERMINACIÓN DEL ANÁLISIS SENSORIAL

Con el fin de realizar el análisis sensorial, las muestras cárnicas crudas con y sin agregado de EOL fueron evaluadas mediante un panel no entrenado en términos de los atributos Apariencia, Aroma, Color y Aceptabilidad Global utilizando una escala hedónica estructurada de 9 puntos (1: no me gusta nada - 9: me gusta mucho).

4.1.6.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se cortaron pechugas de carne de pollo frescas, músculo pectoral, en 60 muestras de 10 g y se dividieron en tres lotes. Un primer lote de 20 muestras se consideró como control sin tratar; a un segundo lote de igual cantidad de muestras se las roció superficialmente con 1 ml del EOL en estudio como agente antimicrobiano, diluido con aceite neutro (dilución 1/10) y al tercer lote se las cubrió únicamente con dicho aceite neutro. Posteriormente, se colocaron e identificaron con números sobre platos plásticos descartables:

123 muestras tratadas con EOL+ aceite neutro;
456 muestras tratadas sólo con aceite neutro y
789 muestras sin tratamiento, consideradas como control (Fig. 11).

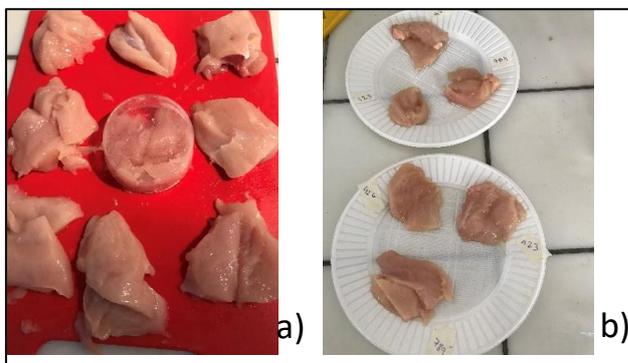


Figura 11. a) Corte de las muestras de pechugas crudas; b) Preparación e identificación de las muestras.

4.1.6.2 PANEL SENSORIAL

Para realizar la Evaluación sensorial de carne aviar, se utilizó la Prueba de evaluación de aceptabilidad por atributos, para así, establecer posibles diferencias entre las muestras sometidas a tratamiento y las muestras control.

El estudio se realizó mediante la provisión de estas a un panel no entrenado compuesto por 20 personas, que voluntariamente calificaron las muestras en términos de aceptabilidad global, apariencia, aroma y color utilizando una escala hedónica estructurada de 9 puntos (1: no me gusta nada - 9: me gusta mucho). En la Figura 12 se observa la planilla entregada al panel para confeccionar dicha evaluación.

La Figura 13 indica cómo se dispusieron las muestras y las planillas para la realización de dicha prueba.

EVALUACIÓN SENSORIAL DE CARNE AVIAR

Fecha: _____ Evaluador N° _____

Nombre: _____ Edad: _____ Ocupación: _____

1) ¿Con qué frecuencia consume usted carnes de pollo? Marcar lo que corresponda

Nunca	1 vez por mes	1 vez por semana	2/3 veces por semana	Otra
<input type="checkbox"/>				

2) Ud. recibirá 3 muestras diferentes de carne de ave cruda, ordenadas al azar, codificadas con números de tres dígitos. Deberá evaluarlas por los atributos de Aceptabilidad global, Apariencia, aroma, color. Marque con una cruz la casilla correspondiente. Evalúe todos los atributos de la primera muestra y luego pase a la siguiente:

Muestra N° ____

Aceptabilidad global

Me disgusta mucho Me es indiferente Me gusta mucho

Apariencia

Me disgusta mucho Me es indiferente Me gusta mucho

Aroma

Me disgusta mucho Me es indiferente Me gusta mucho

Color

Me disgusta mucho Me es indiferente Me gusta mucho

Figura 12: Planilla entregada para evaluar sensorialmente las muestras de pechugas en estudio.



Figura 13. Disposición para realización de la prueba de evaluación sensorial.

4.1.7 DETERMINACION DE LA VIDA ÚTIL MICROBIOLÓGICA

La vida útil es un parámetro importante que permite determinar la calidad de un producto. En el sentido estricto de vida útil microbiológica se corresponde a aspectos de seguridad microbiana.

En el presente trabajo, se consideró que la vida útil del producto está controlada por los microorganismos de deterioro. De éstos, las *Pseudomonas* spp. son las predominantes en las carnes aviares.

La vida útil microbiológica se define como el tiempo necesario para que los microorganismos de deterioro (*Pseudomonas* spp.) alcancen un desarrollo de 10^7 UFC/g en el producto cárnico, en ausencia de microorganismos patógenos (Coll Cárdenas, 2005).

Su determinación se realizó a partir de la ecuación de Gompertz, ya descrita (Sección 2.4.1).

4.1.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente a partir del análisis de varianza (ANOVA). En los casos en los cuales se hallaran diferencias significativas se aplicaría la prueba de comparación de acuerdo con la tabla de diferencias significativas de Fisher (LSD) con un nivel de significación de $P < 0,05$. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Excel. En el Anexo 1 se presentan las Tablas correspondientes.

5- RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 CARACTERÍSTICAS DEL EOL OBTENIDO

La Figura 14 muestra la mezcla de hidrolato-aceite esencial obtenida, la que se dejó reposar en una ampolla de decantación de 500 ml por un periodo de 24 hs. Y posteriormente se llevó por otras 24 hs a una bureta, para una mayor separación. Al transcurrir ese tiempo se observó una capa de aceite en la parte superior que posteriormente al abrir el robinete se recuperó por diferencia de densidad, como se comentó en la Sección 4.1.2.3



Figura 14: Ampolla de decantación donde se muestra el EOL obtenido.

El EOL obtenido fue caracterizado midiéndose el volumen, porcentaje de rendimiento, la densidad a temperatura ambiente, el pH y tiempo de destilación. En cada destilación se obtuvo un valor promedio de 0,60 ml de aceite.

5.1.1 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

El rendimiento de la extracción del EOL se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$R \% = \frac{M_1}{M_2} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

M_1 = Masa final de aceite esencial; M_2 = Masa inicial de tejido vegetal; $R\%$ =

Porcentaje de Rendimiento.

$$R \% = \frac{0,60 \text{ ml de aceite}}{500 \text{ g de cáscara}} \times 100 = 0,12 \text{ ml/g \%}$$

5.1.2 DENSIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE

Para determinar la densidad se utilizó un picnómetro (Fig. 15), que se limpió, enjuagó y secó cuidadosamente, realizándose la determinación de la siguiente manera:

- Se determinó la masa del picnómetro vacío mediante una balanza analítica (M_1).
- Se llenó el picnómetro con el EOL destilado obtenido, determinándose la masa del picnómetro lleno de EOL, mediante la misma balanza (M_2).
- Por diferencia entre ambas masas, se determinó la masa del EOL (M_3):

$$M_2 - M_1 = M_3 \quad (4)$$

Teniendo en cuenta que el volumen del picnómetro era de $3,00 \text{ cm}^3$, fue calculada la densidad por la siguiente ecuación:

$$\delta = \frac{\text{Masa}}{\text{Vol.}} \quad (5)$$

Siendo:

M = masa del EOL (M_3) y V = volumen del picnómetro. En este caso:

$$\delta = \frac{2,40 \text{ g}}{3,00 \text{ cm}^3} = 0,80 \text{ g/cm}^3$$

Estos valores coinciden con las determinaciones de Puente Huera (2006), donde el Aceite esencial de limón se caracterizó físico químicamente presentando una densidad de $0,85 \text{ g/ml}$.



Figura 15: Determinación de la densidad del EOL mediante un picnómetro

Se confirma, por tanto, que presenta una densidad menor que la del agua ($0,99-1 \text{ g/cm}^3$), gracias a lo cual logra ser separado, tras el proceso de decantación.

5.1.3 pH

Para determinar el pH se utilizaron tiras reactivas de papel indicador con las cuales colorimétricamente, el valor fue de 4,00, verificándose posteriormente mediante un termo-peachímetro, a partir del cual el resultado promedio fue de 4,30 (4,20-4,40 unidades de pH).

5.1.4 TEMPERATURA DE EBULLICION

La temperatura de ebullición del EOL fue de $101 \text{ }^\circ\text{C}$, siendo por tanto ligeramente superior al punto de ebullición del agua.

5.1.5 OTRAS CARACTERÍSTICAS DEL EOL OBTENIDO

Se obtuvo un líquido color translúcido, transparente; con aroma típico a limón; de aspecto brillante y ligera viscosidad. Dichas características coinciden con las que se presentan en la Biblioteca Nacional de Medicina (2021).

5.2 CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).

Como se expresó en el ítem 4.1.3 se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del EOL por medio del método de microdilución en caldo, con la cepa de referencia *E. coli*, ATCC 25922, en diluciones seriadas de caldo Mueller Hinton.

Los resultados de la CIM del EOL fueron de 5,00 % V/V (4,00 mg/ml). Posteriormente a partir de los tubos inoculados donde no se observó desarrollo a simple vista se determinó la CBM, resultando ésta de igual valor.

Existen diferencias en los valores de CIM obtenidas en las distintas investigaciones. Hsouna et al. (2017), por ejemplo, investigaron sobre la actividad del aceite esencial de flores de *Citrus limon*, con dos componentes dominantes: limoneno (39,74 %) y β -Pinenos (25,44 %), frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre ellas *E. coli*, observando valores de CIM para estos microorganismos de 0,65 a 2,50 mg/ml, valores menores a los resultados de este estudio. En sus experiencias, también se detalló que las bacterias Gram negativas presentaron una menor sensibilidad que las Gram positivas. Así también en el caso de Hammer y col. (1999) determinaron la actividad de 52 aceites y extractos vegetales contra varios microorganismos, pero utilizando el método de dilución en agar; en sus estudios, el limón cítrico, el orégano y el laurel tuvieron acción inhibitoria en concentraciones $\leq 2,00$ % V/V. En cambio estudios realizados por Picón Foronda y col. (2013) utilizando subproductos cítricos de limón, naranja y mandarina frente a *E coli* O157 y *S. Tiphymurium* determinaron valores de CBM dentro de un rango de 1,00 a 5,00 % P/V, resultando por tanto con valores semejantes a los de este trabajo de tesis.

5.3 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS MUESTRAS DE CARNE DE AVE

Con el objeto de conocer la calidad microbiológica de la carne de ave que se comercializa en mercados de la ciudad de La Plata, a partir de cortes de pechuga refrigerados a 4 °C, que en el laboratorio se trataron asépticamente, se realizaron recuentos microbianos de Microorganismos Mesófilos Totales (Agar P.C.A), *Enterobacteriaceae* (Agar CVRNB) y *Pseudomonas* spp (Agar Cetrimide) (37 °C, 48 hs), como se indicó en 4.1.4.

Los resultados obtenidos se presentan en forma de gráfico de barras en la Figura 16.

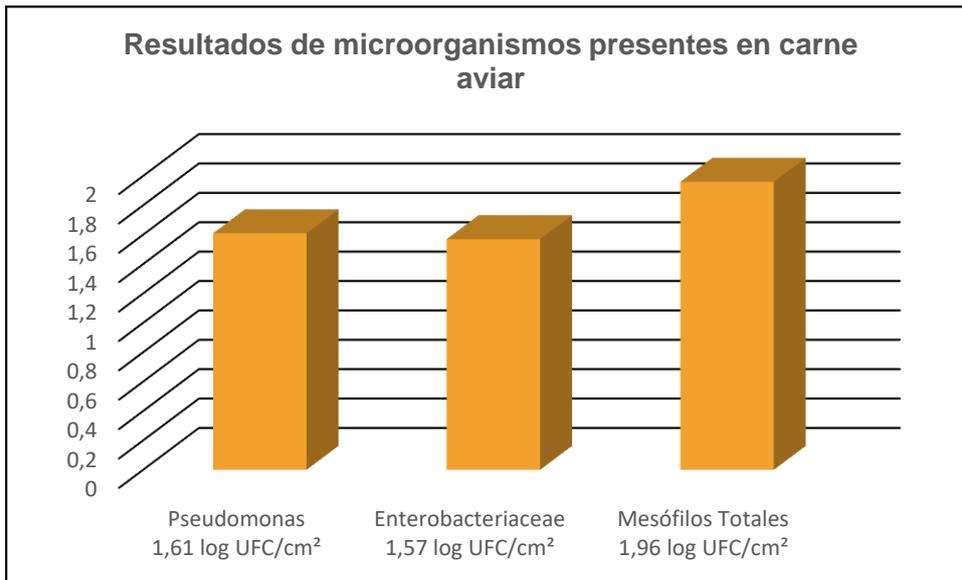


Figura 16: Recuentos microbianos de *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* y Microorganismos Mesófilos Totales de carne aviar

Pudo observarse que los Microorganismos Mesófilos Totales presentaron los mayores recuentos (1,96 log UFC/cm²), seguidos por el género de *Pseudomonas* spp. (1,61 log UFC/cm²), en tanto los menores valores de recuentos fueron los de la familia *Enterobacteriaceae* (1,57 log UFC/cm²).

Jay y col. (2005), demostraron que cuando las canales se refrigeran, el principal agente causal de deterioro lo constituyen especies del género *Pseudomonas*, en tanto cuando las determinaciones microbiológicas para esta especie microbiana exhiben recuentos bajos, se puede realzar la calidad de este alimento; cuando las poblaciones de este género alcanzan valores de 10⁸ UFC/cm² aparece el limo superficial (ICMSF, 1980), mientras que niveles de 5 x 10⁷ UFC/cm² hacen evidente el deterioro de los productos frescos derivados del pollo (Trevisani et al., 2002).

En tanto, en el caso de los Mesófilos Totales, se considera que poblaciones de 10⁷ a 10⁸ UFC/g serían indicadores de alteración del producto y por tanto carnes de mala calidad (Mead, 2005).

Considerando estas investigaciones y los estándares de parámetros microbiológicos para carnes de ave (Senasa, 2016) podemos consignar que nuestros valores indicaron carnes blancas de muy buena calidad.

5.4 ACCIÓN DEL EOL SOBRE PECHUGAS DE CARNE DE AVE.

Los EO son una fuente potencial de compuestos antimicrobianos; numerosos estudios, detallan su acción inhibitoria del desarrollo de microorganismos contaminantes de carnes de ave e incluso patógenos productores de ETA. La mayoría de los compuestos con probada actividad antimicrobiana encontrados son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes, ácidos e isoflavonoides, con acción sobre las membranas de los microorganismos. En ese sentido, el EOL se destaca por contener compuestos terpénicos y flavonoides que tendrían capacidad para romper los componentes lipídicos de la membrana de los microorganismos, ocasionando la muerte celular.

La aplicación de modelos matemáticos que permitan cuantificar y predecir el desarrollo microbiano en carnes resulta una herramienta útil ya que el control de estos es crítico (Álvarez y col., 2016).

Luego de establecer la CIM para el EOL (ítem 5.2), se evaluó el efecto antimicrobiano sobre el desarrollo de microorganismos presentes en carne de ave durante el almacenamiento refrigerado.

En la Figura 17.a, b, c, d, e y f, se presenta la cinética de crecimiento de Microorganismos Mesófilos Totales, Enterobacterias y *Pseudomonas* spp. en las muestras de pechuga con y sin agregado de EOL, almacenadas a 4 °C (Fig. 17.a, b y c, respectivamente) y a 8 °C (Fig. 17.d, e y f, respectivamente) durante el tiempo que duró la experiencia (15 días). Todos los tratamientos fueron analizados estadísticamente a partir del ANOVA correspondiente, observándose que en ninguno de los casos se presentó diferencia significativa ($P < 0,05$) (Ver Anexo 1).

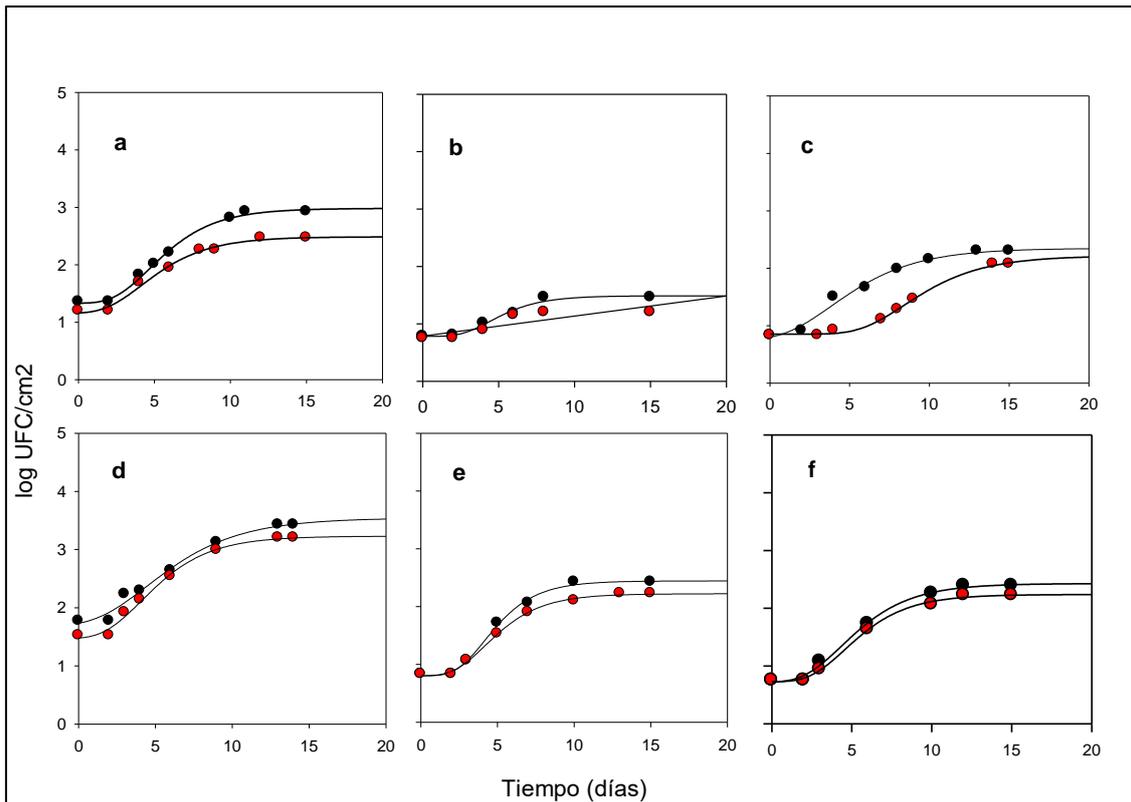


Figura 17: Desarrollo microbiano de Microorganismos Mesófilos Totales (a y d), Enterobacterias (b y e) y *Pseudomonas* spp. (c y f) en muestras de carne de ave Control (•) y tratadas con EOL (•) almacenadas a 4 °C (a, b y c) y a 8 °C (d, e y f). Las líneas curvas muestran el modelo de Gompertz; las líneas rectas el modelo de regresión lineal.

Analizando la Figura 17 se puede observar que en todos los casos las muestras sin tratar, Control presentaron mayores recuentos que las tratadas con EOL. Todas las cinéticas microbianas fueron modeladas por el modelo de Gompertz salvo en el caso de las Enterobacterias de las muestras tratadas y almacenadas a 4 °C (Fig. 17.b), donde los microorganismos permanecieron en fase de latencia durante el tiempo que duró la experiencia, debiendo ser modelados a partir del modelo de regresión lineal. Esta familia bacteriana fue también la que presentó los menores recuentos finales (1,46-1,20 log (UFC/cm²)).

En el caso de los Microorganismos Mesófilos Totales de las muestras almacenadas a 4 °C (Fig. 17.a), se observó que la diferencia entre los recuentos finales de las muestras sin tratar, control y las tratadas, fue de 0,45 log (UFC/cm²) (2,92 y 2,46 log (UFC/cm²), respectivamente).

La Figura 17.b, muestra la cinética de crecimiento de las Enterobacterias observándose al igual que en el caso anterior, que las muestras tratadas con

EOL (0,10 %V/V) presentaron recuentos bacterianos finales menores que las sin tratar, siendo en este caso 1,22 veces más pequeños.

En referencia a *Pseudomonas* spp. (Fig. 17.c) la diferencia entre las muestras control y las tratadas con EOL fue de 0,23 log (UFC/cm²), con valores finales de 2,30 log (UFC/cm²) en las control y 2,07 log (UFC/cm²) en las tratadas.

En el caso de las muestras almacenadas a 8 °C, se observaron los mayores valores de recuentos microbianos, especialmente para los Mesófilos Totales de las muestras sin tratar, con recuentos finales de 3,42 log (UFC/cm²). También en estos casos (Fig. 17.d, e, f), se presentaron las menores diferencias entre los recuentos finales de las muestras sin tratar y tratadas con valores de 0,22, 0,20 y 0,16 log (UFC/cm²) respectivamente, pudiendo considerarse que la temperatura fue un valor determinante para inhibir el crecimiento juntamente con el tratamiento con EOL.

También en ese sentido, y principalmente para el caso de las Enterobacterias, se observaron diferencias significativas entre las muestras tratadas, al analizar dicho parámetro (Anexo 1).

Los resultados obtenidos en el presente estudio evaluando la capacidad antimicrobiana del EOL coinciden con los reportados por Picón Foronda (2013) y Espina y col. (2011), quienes adicionaron este aceite sobre cultivos microbianos específicos, observando también su acción inhibitoria.

En la siguiente Tabla se presentan los diferentes parámetros que resultaron de aplicar los modelos matemáticos para el desarrollo microbiano de Microorganismos Mesófilos Totales, Enterobacterias y *Pseudomonas* spp. en muestras de carnes de ave control y tratadas con EOL, almacenadas a 4 y 8 °C

Tabla 4: Modelado matemático del desarrollo microbiano de Microorganismos Mesófilos Totales, Enterobacterias y *Pseudomonas* spp. en muestras de carnes de ave Control y Tratadas con EOL, almacenadas a 4 y 8 °C.

Parámetros de Gompertz					Parámetros Derivados		
	a	c	b	m	μ	LPD	MPD
Temperatura de almacenamiento 4°C							
Microorganismos Mesófilos Totales							
Muestras Control	1,33± 0,05	1,65± 0,08	2,38± 0,36	4,70± 0,21	1,44	4,27	2,98
Muestras Tratadas	1,15± 0,07	1,33± 0,11	2,46± 0,47	4,17± 0,41	1,20	3,77	2,48
Enterobacteriaceae							
Muestras Control	0,78± 0,05	0,70± 0,09	1,87± 0,71	4,41± 0,57	0,48	3,88	1,48
Muestras Tratadas	-----	-----	-----	-----	0,03	16,66	R ² : 0,72
<i>Pseudomonas</i> sp							
Muestras Control	0,75± 0,15	1,59± 0,20	3,02± 0,76	3,84± 0,66	1,65	3,51	2,34
Muestras Tratadas	0,85± 0,02	1,36± 0,10	2,79± 0,58	8,41± 0,28	1,29	8,07	2,21
Temperatura de almacenamiento 8 °C							
Microorganismos Mesófilos Totales							
Muestras Control	1,69± 0,17	1,85± 0,28	3,36± 0,99	4,45± 0,66	2,29	4,15	3,54
Muestras Tratadas	1,46± 0,08	1,76± 0,12	2,47± 0,42	4,08± 0,32	1,60	3,68	3,23
Enterobacteriaceae							
Muestras Control	0,80± 0,05	1,64± 0,08	1,85± 0,23	4,14± 0,21	1,12	3,60	2,44
Muestras Tratadas	0,80± 0,03	1,41± 0,05	2,06± 0,19	4,19± 0,17	1,07	3,71	2,22
<i>Pseudomonas</i> sp							
Muestras Control	0,71± 0,07	1,71± 0,14	2,41± 0,38	4,36± 0,33	1,53	3,95	2,41
Muestras Tratadas	0,72± 0,04	1,50± 0,06	2,20± 0,26	4,56± 0,23	1,22	4,11	2,22

a: [log (UFC cm⁻²)]; c: [log (UFC cm⁻²)]; b: [log (UFC cm⁻² días⁻¹)]; m: [días]; μ : [log (UFC cm⁻²) días⁻¹] LPD: [días]; MPD: [log (UFC cm⁻²)].

Analizando los resultados de esta Tabla, puede observarse que los menores valores para el parámetro derivado de la Ecuación de Gompertz, velocidad específica de crecimiento (μ), se observó para las Enterobacterias, principalmente en el caso de las muestras almacenadas a 4 °C, donde dicha velocidad en las muestras tratadas fue 16 veces menor a la que presentaron estas bacterias en las muestras sin tratar (0,03-0,48 log (UFC cm⁻²) días⁻¹, respectivamente). También con respecto a este parámetro, pero en las muestras almacenadas a 8 °C, se observaron los menores valores (1,12-1,07 log (UFC cm⁻²) días⁻¹) que resultaron ser sólo una vez menor, entre ellas.

Con respecto a los Microorganismos Mesófilos Totales, se observaron las mayores diferencias para μ en las pechugas almacenadas a 8 °C, con un valor de 0,69 unidades al considerar las muestras sin tratar y tratadas (2,29 y 1,60 log (UFC cm⁻²) días⁻¹, respectivamente).

El mismo parámetro para *Pseudomonas* spp. disminuyó en 0,36 unidades log (UFC cm⁻²) días⁻¹ en las muestras tratadas refrigeradas a 4 °C respecto del control, y en 0,31 en las almacenadas a 8 °C.

En cuanto a la fase de latencia, LPD, se observó que para el caso de los Microorganismos Mesófilos Totales tanto en las muestras tratadas como en las sin tratar a ambas temperaturas, este grupo bacteriano permaneció aproximadamente durante 4 días en dicha fase lag (3,77-4,27 días, respectivamente a 4 °C y 3,68-4,15 días a 8 °C), no observándose por tanto acción inhibitoria de los tratamientos para este parámetro.

En tanto, para el caso de las Enterobacterias de las muestras tratadas con EOL (0,10 %V/V) y refrigeradas a 4 °C, estos microorganismos presentaron los mayores valores permaneciendo en fase de latencia durante aproximadamente 17 días, con una diferencia de 12,78 unidades con respecto a las muestras sin tratar (16,66-3,88 días, respectivamente). Mientras que, en las muestras almacenadas a 8 °C, la diferencia para este parámetro sólo fue de 0,11 unidades, permaneciendo estos microorganismos aproximadamente 4 días en fase de latencia.

Pseudomonas spp. de las muestras tratadas a 4 °C, presentó el segundo valor de los registros más alto para LPD (8,07 días) siendo más de dos veces superior al de las muestras sin tratar para la misma temperatura. No observándose prácticamente diferencia en las muestras almacenadas a la mayor temperatura

de estudio (8 °C), donde estas bacterias permanecieron aproximadamente 4 días en fase lag (3,95 y 4,11 días).

En tanto, analizando los resultados del parámetro derivado máxima densidad poblacional, MPD, se observó que los mayores valores fueron para el caso de las muestras sin tratar y almacenadas a la mayor temperatura; principalmente, el grupo de Microorganismos Mesófilos Totales que alcanzaron un valor de 3,54 log (UFC cm⁻²); siendo este valor 1,09 veces superior al de las muestras tratadas almacenadas a igual temperatura. Una mayor diferencia (0,50 unidades) se observó para este mismo grupo bacteriano, pero al considerar la temperatura de 4 °C comparando las muestras sin tratar con respecto a las tratadas (2,98 -2,48 log (UFC cm⁻²), respectivamente).

El menor valor para este parámetro se presentó para el caso de las Enterobacterias en las muestras control almacenadas a 4 °C, siendo de 1,48 log (UFC cm⁻²), no pudiéndose determinar para el caso de las muestras tratadas a igual temperatura, las que debieron, como dijimos anteriormente, ser modeladas a partir del modelo de regresión lineal. En este caso se observó un buen ajuste de los datos al modelo, con un coeficiente R² de 0,72.

En relación con la MPD para los recuentos de *Pseudomonas* spp a ambas temperaturas se observaron diferencias que fueron más de una vez superiores en las muestras sin tratar con respecto a las tratadas (2,34-2,21 log (UFC cm⁻²) a 4 °C y 2,41-2,22 log (UFC cm⁻²) a 8 °C, respectivamente).

En general, no se observaron diferencias entre los datos experimentales y los predichos, pudiéndose considerar que hubo un buen ajuste de resultados a los modelos empleados.

Diversos investigadores han estudiado la acción inhibitoria de los EO sobre carnes de ave, tales como Fratianni y col. (2010), quienes utilizando aceite esencial de bálsamo y tomillo obtuvieron importantes reducciones de la microflora natural de las carnes almacenadas a 4 °C, pudiendo confirmar por tanto nuestros resultados. Lo mismo en el caso de las investigaciones realizadas por Radhakrishna y col., 2014, quienes estudiaron la acción de diversos EO, tales como el de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnmomum cassia*), mostaza (*Brassica nigra*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) sobre carnes de ave, observando una importante reducción de los recuentos finales de los microorganismos totales, Enterobacterias y *Pseudomonas* spp. en las muestras

tratadas tanto con la mezcla de los aceites, como por separado con respecto a las muestras sin tratar, control, almacenadas a 4 °C. Estos autores también notaron que estos EO eran eficaces para reducir la oxidación lipídica, mantener o mejorar los atributos sensoriales y extender la vida útil de la carne de pollo cruda durante el almacenamiento refrigerado.

5.5 ANÁLISIS SENSORIAL

Luego de establecer la influencia del EOL como antimicrobiano en las muestras de pechuga de pollo almacenadas durante 15 días a dos temperaturas, 4 °C y 8 °C, se realizó la evaluación sensorial de estas carnes frescas. Con este fin se utilizó una prueba de evaluación de aceptabilidad por atributos, para establecer la existencia o no de diferencias de aceptación, por parte del panel, entre las muestras tratadas (unas con solución de EOL en aceite neutro y otras sólo con dicho aceite, AN) y sin tratar (muestras control, C). Los resultados fueron analizados y los valores promedio se presentan en la Fig. 18.

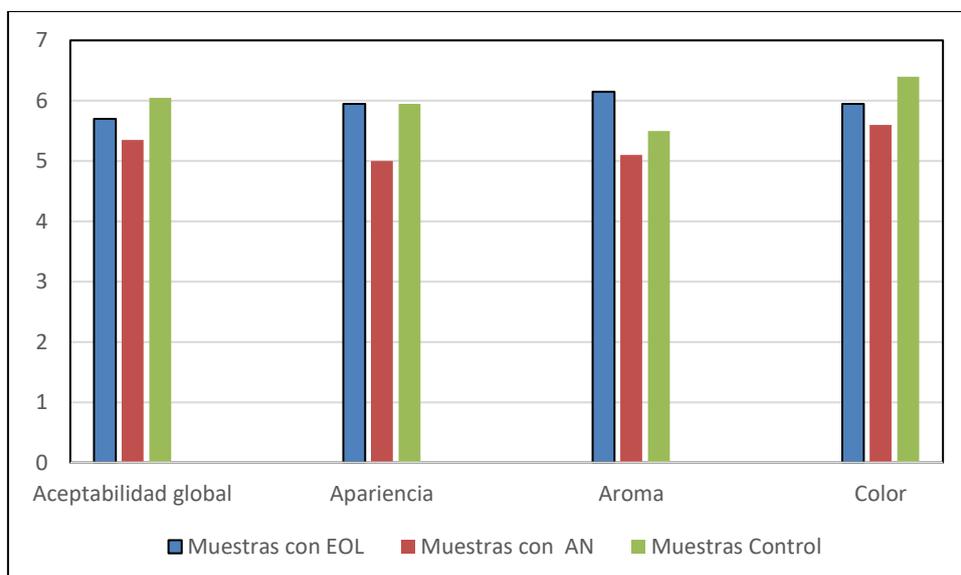


Figura 18: Resultados promedio de la evaluación sensorial de muestras de carne de ave tratadas con solución de EOL y aceite neutro (barras ■); con aceite neutro, únicamente, AN (barras ■) y sin tratar, C (barras ■).

Analizando la Figura 18 puede observarse que las muestras tratadas con solución de EOL, lograron altos puntajes de aceptabilidad global (valor promedio de 5,70), si bien las muestras control fueron las preferidas por el panel (6,05).

En relación con la apariencia, las muestras con solución de EOL, presentaron los mayores valores (5,95) al igual que las muestras sin tratamiento.

En cuanto al aroma, la muestra EOL fue la mayormente calificada, presentando un promedio de 6,15 en la escala hedónica, con una diferencia de 0,65 unidades por sobre la segunda, muestra C.

En tanto con respecto al color, dicha muestra EOL presentó el segundo resultado de elección (5,95) con una diferencia de 0,45 unidades con respecto a la más votada (muestra C).

No se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la calificación correspondiente a carnes tratadas y sin tratar.

En todos los casos, la muestra AN, con sólo el agregado de aceite neutro, fue la que obtuvo los menores valores para todos los atributos con resultados que promediaron los 5 puntos.

Según la escala hedónica de 9 puntos, el valor de 6 indica una categoría que significa “me gusta levemente” y el valor de 7 “me gusta moderadamente” (Drake, 2007), pero en nuestro caso ninguna de las muestras alcanzó los máximos valores de esta escala. Vale la pena hacer notar que las muestras tratadas con el aceite de estudio fueron para dos categorías las preferidas por el panel y en las otras dos, las segundas elegidas, por lo cual el grado de aceptación puede ser considerado como admisible.

Radhakrishna y col. (2015), evaluaron sensorialmente muestras de carne de pollo tratadas con aceites esenciales de orégano, canela, clavo y mostaza. Si bien sus investigaciones las realizaron con carnes cocidas, observaron una muy buena aceptabilidad por parte del panel para las carnes tratadas con los diferentes EO. Tanto en sus experiencias como en las de este estudio, hubo pocas diferencias en los valores de atributo entre las carnes tratadas y sin tratar.

5.6 EVALUACION DE LA VIDA UTIL MICROBIOLOGICA

La vida útil microbiológica de un alimento es el periodo de tiempo durante el cual mantiene una calidad adecuada siempre que se garanticen las condiciones de conservación. La vida útil depende tanto de las características propias de los alimentos como de las técnicas de conservación de estos.

Los estudios de vida útil aportan datos sobre cuánto tiempo un producto puede conservar inalteradas sus propiedades y es capaz de mantener su calidad desde el momento en el que el consumidor abre el envase (Socolovsky, 2021).

Una de las formas de determinarla es a partir de la Microbiología predictiva; en este trabajo se realizó a través de la Ecuación de Gompertz, como se detalló en el ítem 4.1.7, considerando el fin de la vida útil cuando los recuentos de *Pseudomonas* spp., microorganismo alterador de las carnes, alcanzaron un valor de 10^7 log (UFC/cm²).

Aplicando la Ecuación (1), se determinaron los valores de vida útil de las muestras de pechugas control y tratadas con EOL almacenadas a 4 y 8 °C. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Vida útil de muestras de carne de ave control y tratadas almacenadas a 4 y 8°C

Temperatura de almacenamiento[°C]	Muestra de pechuga	Vida útil [días]
4	Control	10,84
4	Tratada	14,56
8	Control	10,65
8	Tratada	10,84

Pudo observarse que, a la menor temperatura de almacenamiento, 4 °C, las muestras tratadas con EOL presentaron la mayor extensión de vida útil, con respecto a las sin tratar. En este caso, la diferencia de duración entre ambas muestras tuvo un valor aproximado cercano a los 4 días, demostrando una importante acción conjunta de la temperatura de almacenamiento y del tratamiento con EOL.

En tanto a 8 °C, prácticamente no existe diferencia entre los valores de las muestras tratadas y sin tratar (0,19 días), observándose principalmente la importante acción deteriorante que puede presentar la temperatura de almacenamiento. En ese sentido, Pérez Arnedo (2015) sostiene que si la temperatura de conservación de la carne de ave supera los 5 °C empiezan a desarrollarse géneros bacterianos involucrados en el deterioro de ésta por lo que, para prolongar la vida útil de las carnes se deberían adicionar a este parámetro, otros factores inhibidores como atmósfera modificada, utilización de crioprotectores, etc.

Investigaciones realizadas por González Fandos y col., 2009, al sumergir presas de pollo en ácido cítrico (presente en forma natural en el limón) y aplicar atmósfera modificada para su almacenamiento refrigerado, lograron extender la vida útil hasta un máximo de 8 días. Mientras que Fratianni et al., 2010, demostraron que, al aplicar una mezcla de aceites esenciales de tomillo y bálsamo de limón sobre carne de ave almacenada a 4 °C, estos agentes limitaron la peroxidación lipídica y el deterioro de las proteínas sarcoplásmicas, ayudando a conservar la carne incluso después de 2 semanas de almacenamiento, disminuyendo también la microflora natural presente en las pechugas; resultando así, con valores más semejantes a los del presente estudio.

6- CONCLUSIONES

En el presente trabajo, a partir de cáscaras de limones (*Citrus limon*) comprados en el comercio local, se obtuvo el EOL necesario para realizar los ensayos en el laboratorio, por medio del método de hidrodestilación. Este se caracterizó posteriormente, en forma fisicoquímica, resultando ser un líquido incoloro, translúcido, de aroma típico a limón, aspecto brillante, densidad 0,80 g/cm³, pH 4,30, temperatura de ebullición 101 °C, rendimiento 0,12 ml/g %.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) del EOL sobre una cepa de referencia de *E. coli*, ATCC 25922 resultando ser de 5,00 % V/V.

Se demostró la calidad microbiana de muestras de carne aviar comercializadas en la ciudad de La Plata, a partir de recuentos microbianos de Microorganismos Mesófilos Totales, Enterobacterias y *Pseudomonas* spp., resultando ser carnes de muy buena calidad.

Se aplicó sobre la superficie de muestras de carne aviar la CIM determinada del EOL obtenido y caracterizado en el laboratorio.

Se demostró el efecto inhibitor del EOL sobre el desarrollo de Microorganismos Mesófilos Totales, Enterobacterias y *Pseudomonas* spp., potencialmente implicados en Enfermedades Transmitidas por alimentos –ETA, presentes en la superficie de las muestras de carne aviar, envasadas con películas de polietileno y almacenadas a diferentes temperaturas de refrigeración (4 y 8 °C). Se comparó con muestras sin tratar, consideradas como control. En todos los casos las muestras tratadas mostraron menores valores de recuentos finales que las muestras control. Los recuentos microbianos se modelaron matemáticamente. Las Enterobacterias de las muestras almacenadas a 4 °C resultaron ser los microorganismos más sensibles a la acción del tratamiento conjunto (EOL, temperatura de almacenamiento) debiendo ser modelados a partir del modelo de regresión lineal, permaneciendo en fase logarítmica durante el tiempo que duró la experiencia (15 días). Esta familia microbiana presentó el mayor valor de LPD (16,66 días) y de μ (0,03 log (UFC/cm²) días⁻¹).

Se realizó y evaluó la aceptabilidad sensorial de las muestras cárnicas crudas con y sin agregado de EOL mediante un panel de voluntarios no experimentado, calificándolas mediante los atributos de Apariencia, Aroma, Color y Aceptabilidad Global utilizando una escala hedónica estructurada de 9 puntos (1: no me gusta nada - 9: me gusta mucho), presentando en todos los atributos, las muestras tratadas con el aceite de estudio, buenos valores de aceptabilidad (con promedios cercanos a 6 puntos), semejantes a los de las muestras sin tratar.

Se evaluó la vida útil por estabilidad microbiana de la carne aviar cruda, tratada con EOL y refrigerada a 4 y 8 °C, comparándola con muestras sin tratar, observándose los mayores valores de extensión de vida útil (14,56 días) en las muestras tratadas y almacenadas a la menor temperatura (4 °C).

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto descontaminante del EOL coinciden con los reportes de varios autores que lo adicionaron sobre cultivos microbianos observando y remarcando su acción inhibitoria, resultando por tanto en una herramienta útil para el tratamiento de las carnes de ave con el fin de evitar el desarrollo de posibles ETA.

7- BIBLIOGRAFIA

- Aarestrup, F. M., & Hasman, H. (2004). Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Veterinary microbiology*, 100(1-2), 83-89.
- Alfonzo, A., Martorana, A., Guarrasi, V., Barbera, M., Gaglio, R., Santulli, A., ... & Francesca, N. (2017). Effect of the lemon essential oils on the safety and sensory quality of salted sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792). *Food Control*, 73, 1265-1274.
- Alonso, M., Lucchesi, P., Rodriguez, E., Padola, N. (2012). Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. *Food Control*, 23. 351 – 355.
- Álvarez, M. C., Pena, I., Villat, M. C., de la Sota, P., Laporte, G., Olivera, D., & Coll Cárdenas, F. (2016). Joint Application of Antimicrobial Agents on Microbial Flora Chilled Meat Cattle. Use of Mathematical Models. *Procedia Food Science*, 7, 63-66.
- Anellis, A., Lubas, J., & Raymond, M. M. (1954). Heat resistance in liquid egg of some strains of the genus *Salmonella*. *Food Research*, 19, 377–395.
- Arnaut-Rollier, I., De Zutter, L., & Van Hoof, J. (1999). Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. *International journal of food microbiology*, 48(2), 87-96.
- Ávalos García, A. & Pérez Urria Carril, E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3): 119-145, ISSN: 1989-3620 Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid.
- Ávalos García, A. & Pérez Urria Carril, E. (2011). Test para el aprendizaje. In: Campus Virtual crece: retos del EEES y oportunidades para la UCM (pp. 75-77). Universidad Complutense de Madrid.
- Ayres, J. C. (1960). The relationship of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. *Journal of Applied Microbiology*, 23(3), 471-486.

- Balamatsia, C. C., Paleologos, E. K., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2006). Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines formation in fresh chicken meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4°C: possible role of biogenic amines as spoilage indicators. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89(1), 9-17.
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45(2), 722- 734.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Barker, D. J. (2003). Coronary heart disease: a disorder of growth. *Hormone research*, 59(Suppl. 1), 35-41.
- Barnes, E. M., & Thornley, M. J. (1966). The spoilage flora of eviscerated chickens stored at different temperatures. *International Journal of Food Science & Technology*, 1(2), 113-119.
- Bautista, J. H., López, J. L. A., & Rincón, F. G. R. (2013). Efecto del manejo pre-mortem en la calidad de la carne. *Nacameh*, 7(2), 41-64.
- Bell, R. G.; Phillips, D. M. and Jones, R. J. (1997) Predictive microbiology: Quality assurance tool or computer game. Proc.43 ed. Internat. Congo. *Meat Sci and Technol.* 14- 18.
- Bennett, S. D., Manikonda, K., Mungai, E., Dewey-Mattia, D., & Gould, L. H. (2014). Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2011: Annual report.
- Biblioteca Nacional de Medicina (2021) <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Limonene>
- Bogнар, K. (2003). Modelling the Taste of Food. Tasting by computer. [http:// www.inf.unideb.hu/~bogнар/Pages/modell.htm](http://www.inf.unideb.hu/~bogнар/Pages/modell.htm).
- Bosquez-Molina, E., Ronquillo-De Jesús, E., Bautista-Bolaños, S., Verde-Calvo, J., & Morales-López, J. (2010). Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloesporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biol. Tec.*, 132-137

- Buchanan, R. L. (1991). Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. *J. Food Safety*. 11, 123-134
- Buchanan, R. L. y Klawitter, L. A. (1992). The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol*, 9, 3,185- 196
- Buchanan, R. L. (1993). Predictive food microbiology. *Trends in Food Science & Technology*, 4(1), 6-11.
- Campbell, W. W, Barton, M. L, Cyr-Campbell, D., Davey, S. L., Beard, J. L., Parise, G., Evans, W. J. (1999) Effects of an omnivorous diet compared with a lacto-ovo-vegetarian diet on resistance-training-induced changes in body composition and skeletal muscle in older men. *Am J Clin Nutr*. 1999 Dec; 70(6):1032-9. doi: 10.1093/ajcn/70.6.1032. PMID: 10584048
- Campbell, W. W, Deutz, N. E. P, Volpi, E., Apovian, C. M. (2023) Nutritional Interventions: Dietary Protein Needs and Influences on Skeletal Muscle of Older Adults. *J Gerontol Biol Sci Med Sci*. 2023 Jun 16; 78(Supplement_1):67-72. doi: 10.1093/gerona/glad038. PMID: 37325954; PMCID: PMC10272976.
- Capita, R., Prieto, M., & Alonso-Calleja, C. (2004). Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1303-1308.
- Carbajal Azcona, A. (2005). Hábitos de consumo de carne de pollo y huevos. Calidad nutricional y relación con la salud. *XLII Symposium Científico de Avicultura*. Cáceres, 2005. España. <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-carbajalAECAXLII2005T-1.pdf>
- Carbajal, A. (2013) Manual de Nutrición y Dietética. Universidad Complutense de Madrid. <https://www.ucm.es/nutricioncarbajal/manual-de-nutricion>
- Carduza, F., Grigioni, G., Irurueta, M. (2021). Evaluación organoléptica de calidad de carne. A pedido del consumidor. *Sitio argentino de producción animal*. 145-150. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/65-evaluacion_organoleptica.pdf

- Carrillo, L., Audisio, M. C., Bejarano, N., Gómez, S., Ancasi, G., & Benítez, M. (2007). Manual de Microbiología de los Alimentos. *Jujuy*, 10, 102-116. Capítulo 11.
- Carson, C. F., Mee, B. J, Riley, T. V. (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jun; 46(6):1914-20. doi: 10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002. PMID: 12019108; PMCID: PMC127210.
- Castaneda, C., Charnley, J. M., Evans, W. J., Crim, M. C. (1995a) Elderly women accommodate to a low-protein diet with losses of body cell mass, muscle function, and immune response. *Am J Clin Nutr.* 1995 Jul; 62(1):30-9. doi: 10.1093/ajcn/62.1.30. PMID: 7598064.
- Castaneda, C., Dolnikowski, G. G., Dallal, G. E., Evans, W. J., Crim, M. C. (1995b). Protein turnover and energy metabolism of elderly women fed a low-protein diet. *Am J Clin Nutr.* 1995 Jul; 62(1):40-8. doi: 10.1093/ajcn/62.1.40. PMID: 7598065 Clinical Trial.
- Castello, J. A., Cedó, R., Cepero, R., García, E., Pontes, M., & Vaquerizo, J. M. (2002). Producción de carne de pollo. Real Escuela de Avicultura. Barcelona
- Cayré, M. E., Vignolo, G. M., & Garro, O. A. (2007). Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas. *Información tecnológica*, 18(3), 23-29.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2011, Annual Report. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, <https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2011-508c.pdf>
- Centro de Empresas Procesadoras Avícolas, CEPA (2023). <https://aviculturaargentina.com.ar/>

- Cerutti, M., Neumayer, F. (2004) Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. *Invenio*, vol. 7, núm. 12, junio, 2004, pp. 149-155 Universidad del Centro Educativo Latinoamericano Rosario, Argentina
- Chang Fornaris, L. (1998) La modelación microbiológica predictiva en la estimación de la durabilidad de los alimentos. Inst. de Invest. para la Industria Alimenticia. 6° Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CICTA 6, Cuba.
- Chellappandian, M., Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Karthi, S., Thanigaivel, A., Ponsankar, A.... Hunter, W. (2018). Botanical essential oils uses a mosquitocides and repellents against dengue. *Environment International* (113), 214-230. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.038>
- Claus, J. R., Colby, J. W., & Flick, G. J. (1994). Processed meats/poultry/seafood. In *Muscle Foods: Meat Poultry and Seafood Technology* (pp. 106-162). Boston, MA: Springer US.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (1998) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Document M22-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 25th Informational Supplement. CLSI Document M100-S25, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Código Alimentario Argentino (CAA) (Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 12-E/2017). Capítulo VI Alimentos cárneos y afines. Artículos: 247 al 519. <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>. Actualizado al 05/2023
- Coll Cárdenas, F., Giannuzzi, L., Noia, M., & Zaritzky, N. (2001). El modelado matemático: una herramienta útil para la industria alimenticia. *Ciencia Veterinaria*. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam. 3(1), 22-28.
- Coll Cárdenas, F (2005) Modelado matemático del desarrollo microbiano en carnes bovinas. Tesis doctoral. <https://doi.org/10.35537/10915/1570>.

- de Oliveira, K. Á. R., de Sousa, J. P., da Costa Medeiros, J. A., de Figueiredo, R. C. B. Q., Magnani, M., de Siqueira Júnior, J. P., & de Souza, E. L. (2015). Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1, 8-cineole. *Food Control*, 47, 334-339.
- Del Ángel-Coronel, O. A., Martínez-Castillo, A., Colorado-Acosta, L. E., & González-Flores, V. (2018) Actividad biológica de los aceites esenciales de Lima (*Citrus limon*) y Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*). *Revista de Innovación Científica y Tecnológica (REVICYT)*.1, 2, 54-73
- del Pilar Castañeda, M. (2011). Factores involucrados en la calidad de la carne de pollo. *Nacameh*, 5(1), 84-95.
- Delgado, B., Fernández, P. S., Palop, A., & Periago, P. M. (2004). Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. *Food Microbiology*, 21(3), 327-334.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(12), 4863-4870.
- Diarrassouba, F., Diarra, M. S., Bach, S., Delaquis, P., Pritchard, J., Topp, E., Skura, B. J. (2007) Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. *J Food Prot.* 2007 Jun; 70(6):1316-27. doi: 10.4315/0362-028x-70.6.1316. PMID: 17612058.
- Djenane, D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of algerian citrus essential oil and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods* (4), 208-228. doi:doi:10.3390/foods4020208
- Domínguez-Courtney, M. F., & Jiménez-Munguía, M. T. (2012). Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 110-121.
- Drake, M. A. (2007). Invited review: Sensory analysis of dairy foods. *Journal of dairy science*, 90(11), 4925-4937.

- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22(6), 896–902. doi:10.1016/j.foodcont.2010.11.021
- Esty, J. R., & Meyer, K. F. (1922). The Heat Resistance of the Spores of *B. botulinus* and Allied Anaerobes. XI. *The Journal of Infectious Diseases*, 31(6), 650–664. <http://www.jstor.org/stable/30082503>
- Fakruddin, M. D., Mazumder, R. M., & Mannan, K. S. B. (2011). Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon J. Sci*, 40(2), 121-131.
- FAO (2011) Preventing *E. coli* in food. https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/FAO_E.Coli_FCC_2_011.06.231.pdf
- Farber, J. M (1986) Predictive modelling of food deterioration and safety. In: *Food borne microorganisms and their toxins. Developing methodologies (IFT Basic Symposium Series)*. Ed M. D. Pearsons and N. J. Stern. Marcel Dekker Inc. NY
- Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., & Iranshahy, M. (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, 33(1), 13-40.
- Fekrazad, R., Mir, A., Barghi, V., & Shams-Ghahfarokhi, M. (2015). Erradication of *C. albicans* and *T. rubrum* with photoactivated indocyanine grees, *Citrus aurantifolia* essential oil and fluconazole. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12(2):289-97. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.009. Epub 2015 Jan 5.
- Fernández-Valdés, D., Bautista-Baños, S., Fernández-Valdés, D., Ocampo-Ramírez, A., García-Pereira, A., & Falcón Rodríguez, A. (2015). Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24(3), 52-57.
- Forgetta, V., Rempel, H., Malouin, F., Vaillancourt, R., Topp, E., Dewar, K., Diarra, M.S. (2012) Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia*

- fergusonii* from broiler chicken. *Poult Sci.* 2012 Feb; 91(2):512-25. doi: 10.3382/ps.2011-01738. PMID: 22252367.
- Forsythe, S. J. (2013) *Microbiologia da segurança dos alimentos*. 2nd edição. School of Science and Technology, Nottingham Trent University Edit. Artmed. ISBN 978-85-363-2706-8
 - Fouad, H., & da Camara, C. (2017). Chemical composition and bioactivity of peel oils from *Citrus aurantiifolia* and *Citrus reticulata* and enantiomers of their major constituent against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* (73), 30-36. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2017.06.001>
 - Fratianni, F., De Martino, L., Melone, A., De Feo, V., Coppola, R., & Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of food science*, 75(8), M528-M535.
 - Fricke, W. F., Mc Dermott, P. F., Mammel, M. K., Zhao, S., Johnson, T. J., Rasko, D. A... & Ravel, J. (2009). Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18), 5963-5971.
 - Gallinger, C. I., Federico, F. J., Pighin, D. G., Cazaux, N., Trossero, M., Marsó, A., & Sinesi, C. (2016). Determinación de la composición nutricional de la carne de pollo en argentina. *Diaeta*, 34(156), 10-18. Recuperado el 08 de marzo de 2023, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-73372016000300003&lng=es&tlng=es.
 - Giavarini, I. (1986). Refrigeración de las aves sacrificadas: problemas microbiológicos y cualitativos (I). *Selecciones avícolas*, 28(12), 0388-394.
 - Gibson, A. M.; Bratchell, N. and Roberts, T. A. (1988) Predicting microbial growth: growth response of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int J Appl. Microbiol.* 6, 155-178
 - Gil, M., Merchán, K., Quevedo, G., Sánchez, A., Nicita, G., Rojas, T., ... & Finol, M. (2015). Formación de biopelículas en aislados de

Staphylococcus aureus según la susceptibilidad antimicrobiana y la procedencia clínica. *Vitae: Academia Biomédica Digital*, (62), 3.

- González-Fandos, E., Herrera, B., & Maya, N. (2009). Efficacy of citric acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. *International journal of food science & technology*, 44(2), 262-268.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), 79-97.
- Hajmeer, M. N., & Cliver, D. O. (2002). Microbiology of food preservation and sanitation. *Foodborne diseases*, (Ed. 2), 331-352
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590-3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>
- Hernández, J. M. (2005). Sensory perception of quality of products across Europe: a case study on poultry quality. En: “*Sensory Evaluation-More than just food*”. ESN Conference, AINIA, Madrid.
- Hsouna, A., Halima, N., Smaoui, S. & Hamdi, N. (2017). *Citrus lemon* essential oil: chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids Health Dis* 16, 146. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0487-5>
- International Commission on Microbial Specifications for Foods, ICMSF (1980) *Microbial Ecology of Foods*, Vol.2, Academic Press, Inc. New York.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF (1998). A simplified guide to understanding and using food safety objectives and performance objectives. <https://www.icmsf.org/wp-content/uploads/2018/02/GuiaSimplificadosp.pdf>

- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) (2010). El mercado de carne de aves en los países del CAS. Red de Coordinación de Políticas Agropecuarias del Consejo Agropecuario del Sur, Montevideo (Uruguay) Consejo Agropecuario del Sur, Montevideo (Uruguay) <https://repositorio.iica.int/handle/11324/19484>
- Irurueta, M., Cadoppi, A., Langman, L., Grigioni, G., & Carduza, F. (2008). Effect of aging on the characteristics of meat from water buffalo grown in the Delta del Paraná region of Argentina. *Meat science*, 79(3), 529–533. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.12.010>
- Jay, J. M. (2001). Indicator organisms in foods. In: *Foodborne Disease Handbook*, 2nd ed. Ed. Y. H. Hui, M. D. Pierson, and J. R. Gorham, Vol. 1, 645–653. Marcel Dekker Inc., NY.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005) Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, España.
- Keklik, N. M., Demirci, A., & Puri, V. M. (2010). Decontamination of unpackaged and vacuum-packaged boneless chicken breast with pulsed ultraviolet light. *Poultry science*, 89(3), 570-581.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwärm, H. & Vogenschow, H. (1986). Action of terpenoids on energy metabolism. In: *Progress in Essential Oil Research: Proceedings of the International Symposium on Essential Oils, Holzminden/Neuhaus*. Ed. E. Brunke. Federal Republic of Germany, Sept. 18–21, 1985 (pp. 429-446). <https://doi.org/10.1515/9783110855449-039>
- Laboratorios Britania, Argentina- <https://www.britanialab.com/productos>
- Lawrence, T. L. J. y Flower, V. R. (2002) Prenatal and postnatal growth. En: *Growth of farm animals*, 2nd editions, CAB International; 2002. p 347.
- Lee, H. S., Kwon, M., Heo, S., Kim, M. G., & Kim, G. B. (2017). Characterization of the biodiversity of the spoilage microbiota in chicken meat using next generation sequencing and culture dependent approach. *Korean journal for food science of animal resources*, 37(4), 535.
- León, M., Orduz, A., & Velandia, M. (2018). Composición fisicoquímica de la carne de oveja, pollo, res y cerdo. *@limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 15(2), 62-75.

- Liang, H., Deng, X., Ji, Q., Sun, F., Shen, T., & He, C. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* global regulator VqsR directly inhibits QscR to control quorum-sensing and virulence gene expression. *Journal of bacteriology*, 194(12), 3098-3108.
- López Casigña, R. E. (2018). Utilización de aceites esenciales de la planta tipo (*Minthostachys mollis*), para la conservación de carne de hamburguesa. Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Martínez, A., Ospina, F., Valencia, G., & Jiménez, N. (2003). Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica 2003. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Departamento de Farmacia. Medellín. Colombia.
- McMeekin, T. A., Olley, J., Ross, T. and Ratkowsky, D.A. (1993). Predictive microbiology: theory and application. Taunton, UK: *Research Studies Press Ltd*.
- McMeekin, T. A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D. S., ... & Soontranon, S. (1997). Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerging infectious diseases*, 3(4), 541.
- Mead, G. C. (2005) Food Safety Control in the Poultry Industry 1st Edition - August 8, 2005. eBook ISBN: 978184569023
- Mead, G. C. (2009). Análisis microbiológico de carne roja, aves y huevos. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP) (2020) Anuario Avícola 2020 - Año XXV N° 83-
https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/archivos//000000_Datos%20Hist%C3%B3ricos/000083_Nro%2083%20Anuario%20Avicola%202020.pdf
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP) (2021). Anuario Avícola 2021 - Año XXVI N° 84-
<https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/index.php>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP) (2022). Anuario Avícola 2022 - Año XXVII N° 85-

- https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/_archivos//000001_Anuario%20Avicola%202022.pdf
- Ministerio de Hacienda de la Nación (2018). Informes de cadena de valor. Limón.
https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspmicro_cadenas_de_valor_limon.pdf
 - Ministerio de Salud (2022). Manual de Manipulación de alimentos https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_manual_de_manipuladores_2022.pdf
 - Morales-Muñoz, P. A. (2019). Assessment of *Pseudomonas* biodiversity of spoiled refrigerated raw chicken and their sensitivity to *Lactobacillus*, potential bio-preservatives in poultry meat. Tesis doctoral. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
 - National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, approved standard Fifth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 - Norma ISO 22000, Norma ISO serie 14000 (2005) https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/revista/ediciones/32/articulos/sistema_integral.htm
 - Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat science*, 78(1-2), 77-89.
 - Oldfield, E., & Lin, F. Y. (2012). Terpene biosynthesis: modularity rules. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(5), 1124-1137.
 - Organización Mundial de la Salud, OMS (2015). Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria.
<https://www.who.int/es/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
 - Organización Mundial de la Salud, OMS (2020). Inocuidad de los alimentos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

- Organización Mundial de la Salud, OMS (2021). Resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Ortuño, M. F. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Aiyana Ediciones, 151 - 156.
- Orús, A. (2023) Consumo mundial de proteína animal por tipo en 2022. <https://es.statista.com/estadisticas/1314427/consumo-mundial-de-proteina-animal-por-tipo/#statisticContainer>
- Orús, A. (2023b) La industria de la carne en el mundo. <https://es.statista.com/temas/9691/la-industria-de-la-carne-en-el-mundo/#topicOverview>
- Palomino, A. y Cerpa, M. (1999) Hidroextracción de los aceites esenciales. Memorias de la IV Reunión de Fenómenos de Transporte. Callao, Perú.
- Perdones, A., Escriche, I., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chemistry (197)*, 979-986. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.054>
- Peretto, G., Du, W., Avena-Bustillos, R., Sarrael, S., Hua, S., & Sambo, P. (2014). Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. *Postharvest Biology and Technology (89)*, 11-18.
- Pérez Arnedo, I. (2015). *Calidad y seguridad microbiológica de la carne de pollo: con especial referencia a la incidencia de Salmonella, Campylobacter y Listeria monocytogenes en las distintas etapas de la producción y procesado* (Doctoral dissertation, Universidad de La Rioja).
- Picón Foronda, E. (2013). Capacidad antimicrobiana de subproductos cítricos de limón, naranja y mandarina frente a *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella typhimurium*. Máster en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Puente Huera, C. J. (2006). Determinación de las características físicas y químicas del limón sutil (*Citrus aurantifolia Swingle*). Tesis de grado para obtener el título de

ingeniero agroindustrial. Universidad Técnica del Norte. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Ecuador.

- Radha krishnan, K., Babuskin, S., Babu, P.A.S., Fayidh, M.A., Sabina, K., Archana, G., Sivarajan, M. and Sukumar, M. (2014), Bio protection and preservation of raw beef meat using pungent aromatic plant substances. *J. Sci. Food Agric.*, 94: 2456-2463. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6580>
- Radhakrishnan, S. B. (2015). Evaluation and predictive modeling the effects of spice extracts on raw chicken meat stored at different temperatures. *Journal of Food Engineering* , 29-37
- Rangel, A. H., Martínez, N. L. F., Ortega, F. V., Sánchez, C. I. M., & Pérez, C. I. P. (2015). Aceites esenciales como antioxidantes y antimicrobianos naturales. En: *Alimentos funcionales y compuestos bioactivos*. Márquez Ríos, E., del Toro Sánchez, C. L., Ruiz Cruz, S., Ramírez de León, J., Uresti Marín, R. Ed. Plaza y Valdes S. L., España.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M., Jaimand, K., Alinezhad, S., Saberi, R., & Yoshinari, T. (2009). Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control* (20), 1018-1024. doi:10.1016/j.foodcont.2008.12.007
- Rodríguez, R., Frizzo, L. S., Bueno, D. J., Zbrun, M. V., & Signorini Porchietto, M. L. (2019). Riesgos microbiológicos asociados al consumo de carne aviar. *La industria cárnica latinoamericana*, 59, 212, p.44-60. Ed Publitec, Argentina.
- Rokka, M., Eerola, S., Smolander, M., Alakomi, H. L., & Ahvenainen, R. (2004). Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions: B. Biogenic amines as quality-indicating metabolites. *Food Control*, 15(8), 601-607.
- Ross, T. y McMeekin, T. A. (2000). Predictive microbiology and food safety. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Ed. Robinson, R. K., Batt, C. A. y Patel, P. D, Academic Press.
- Russell, A. D. (1995). Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36(3-4), 247-265.

- Sarango León, C. M. (2020). El aceite de orégano como bioconservador en la carne de pollo. Trabajo de titulación. Facultad de Cs Pecuarias. Escuela politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Scott, W. J. (1936). The growth of microorganisms on ox muscle. I. The influence of water content of substrate on rate of growth at -1°C. *J. Counc. Sci. Ind. Res. (Aust)*. 9: 177-182
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos, Dirección Nacional de Alimentos (2008). Protocolo de calidad para pollos enteros y cortes. Código: SAA021. Versión: 06. https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/valorAr/sello/protocolos/en_consulta/Pollo_Entero_y_Cortes.pdf
- Servicio Agrícola Exterior del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, USDA (2021). Ganadería y aves de corral: mercados y comercios mundiales. https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/73666448x/9593vs24n/4m90fs46x/livestock_poultry.pdf
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) (2016) Resolución-336-2016-SENASA - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <https://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-336-2016-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59(2),201222. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239360/>
- Silva, J. (2015). Detección de bacterias patógenas productoras de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en carne aviar. Tesis de Licenciatura en Tecnología de alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias –UNCPBA. <https://ridaa.unicen.edu.ar:8443/server/api/core/bitstreams/ed2a5fa4-f7dc-464f-81ca-fba2b42b402b/content>
- Simas, D. L., de Amorim, S. H., Goulart, F. R., Alviano, C. S., Alviano, D. S., & da Silva, A. J. R. (2017). Citrus species essential oils and their

components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. *Industrial Crops and Products*, 98, 108-115.

- Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Nychas, G. J. E., & Fasseas, K. (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science* 13(1): 65-75.
- Skinner, G. E. and Larkin, J. W. (1994). Mathematical modeling of microbial growth: a review. *J. Food Safety* 14: 175-217.
- Socolovsky, S. (2021) Criterios generales para la determinación de fechas de vencimiento en alimentos. En: Duración de los alimentos: ¿Qué sabemos? Serie de informes especiales ILSI Argentina. Grupo de trabajo: Desperdicio de alimentos. Vol. XI, Abril 2021, p.10-12.
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., van Griensven, L. J. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*. 2010 Oct 27; 15(11):7532-46. doi: 10.3390/molecules15117532.
- Smolander, M., Alakomi, H.-L., Ritvanen, T. (2004). Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions. A. Time-temperature indicators as quality-indicating tolos. *Food Control* 15(3):217-229 doi: 10.1016/S0956-7135(03)00061-6.
- Soto Restrepo, V., Taborda, G. & Garzon Mendez, W. (2017). Salvinorina A: terpeno alucinógeno presente en *Salvia divinorum* Epling & Játiva. *Colombia Forense*. Vol. 4, Nro. 1, abril 2017. doi: 10.16925/cf.v4i1.2022
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 27(105), 579-597.
- Stratakos, A. C., & Koidis, A. (2016). Methods for extracting essential oils. In: *Essential oils in food preservation, flavor, and safety* (pp. 31-38). Academic Press.
- Talero, M. C. (2019). Utilización de aceites esenciales en combinación con ácido láctico para extender la vida útil de carnes bovinas. Tesis de

Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

- Tounguanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2013). Physico-chemical properties, morphology, and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. *J. Food Eng.* (117), 350-360.
- Trevisani, M., Albonetti, S., Taffetani, L., Santis, E. D., Giuffrida, A., & Flamigni, L. (2002). Spoilage bacterial load in fresh poultry meat. *Industrie Alimentari* 41(413):422-428.
- Ultee, A., Kets, E., Alberda, M., Hoekstra, F. A., Smid, E. (2000) Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol.* 2000 Oct; 174(4):233-8. doi: 10.1007/s002030000199.
- Wendakoon, C. N., & Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of food protection*, 58(3), 280-283.
- Whiting, R. C. (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35(6), 467-494.
- Whiting, R. C., & Masana, M. O. (1994). *Listeria monocytogenes* survival model validated in simulated uncooked-fermented meat products for effects of nitrite and pH. *Journal of food science*, 59(4), 760-762.
- Yarce, C. J. (2013). Microbiología predictiva: una ciencia en auge. *Inge@UAN-Tendencias en la Ingeniería*, 3(6). <https://revistas.uan.edu.co/index.php/ingean/article/view/351>
- Zengin, H., & Baysal, A. (2014). Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure- activity relationships evaluated by SEM Microscopy. *Molecules* (19), 17773- 17798. doi:10.3390/molecules191117773
- Zhang, Z. Y., Jia, G. Q., Zuo, J. J., Zhang, Y., Lei, J., Ren, L., & Feng, D. Y. (2012). Effects of constant and cyclic heat stress on muscle metabolism and meat quality of broiler breast fillet and thigh meat. *Poultry science*, 91(11), 2931-2937.
- Zu, Y., Yu, H., Liang, L., Fu, Y., Efferth, T., Liu, X., & Wu, N. (2010). Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3,

A-549 and MCF-7 Cancer Cells. *Molecules*, 15(5), 3200–3210.
doi:10.3390/molecules15053200

- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van't Riet, K. (1990) Modelling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ Microbiol.* 56,1875.

ANEXOS

ANEXO 1

Análisis estadístico de los resultados:

Análisis de varianza

Análisis de recuentos de Microorganismos Mesófilos Totales a 4 ° C

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	8	17,3905	2,1738125	0,43279714		
Columna 2	8	15,4675	1,9334375	0,2755356		

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,231120562	1	0,231120562	0,65257625	0,432705307	4,600109908
Dentro de los grupos	4,958329188	14	0,354166371			
Total	5,18944975	15				

Mesof. 4°C: no hay diferencia significativa entre las muestras control y las tratadas

Análisis de recuentos de Enterobacterias a 4 ° C

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	6	6,69	1,115	0,09295		
Columna 2	6	5,94	0,99	0,0478		

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,046875	1	0,046875	0,6660746	0,43343395	4,9646027
Dentro de los grupos	0,70375	10	0,070375			
Total	0,750625	11				

Ent. 4° C: no hay diferencia significativa

Análisis de recuentos de *Pseudomonas* spp. a 4 ° C

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	8	13,63	1,70375	0,346198214		
Columna 2	8	10,56	1,32	0,262114286		

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,58905625	1	0,58905625	1,936689613	0,185745658	4,600109937
Dentro de los grupos	4,2581875	14	0,30415625			
Total	4,84724375	15				

Pseud 4°C: no hay diferencia significativa

Análisis de recuentos de Microorganismos Mesófilos Totales a 8 ° C

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	8	20,64	2,58	0,46142857		
Columna 2	8	19,01	2,37625	0,5007125		

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,16605625	1	0,16605625	0,34518067	0,56621009	4,600109937
Dentro de los grupos	6,7349875	14	0,481070536			
Total	6,90104375	15				

Mesof. 8°C: no hay diferencia significativa entre las muestras control y las tratadas

Análisis de recuentos de Enterobacterias a 8 ° C

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	8	13,75	1,71875	0,51506964		
Columna 2	8	12,7	1,5875	0,36845		

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
---------------------------	-------------------	--------------------	---------------------------	---	--------------	----------------------

<i>Entre grupos</i>	0,06890625	1	0,06890625	0,15598125	0,69883547	4,600109937
<i>Dentro de los grupos</i>	6,1846375	14	0,441759821			
<i>Total</i>	6,25354375	15				

Ent. 8° C: no hay diferencia significativa

Análisis de recuentos de *Pseudomonas* spp. a 8 ° C

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	7	11,33	1,618571429	0,56634762		
Columna 2	7	10,56	1,508571429	0,46944762		

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<i>Entre grupos</i>	0,04235	1	0,04235	0,08177292	0,77978554	4,747225347
<i>Dentro de los grupos</i>	6,214771429	12	0,517897619			
<i>Total</i>	6,257121429	13				

Pseud 8°C: no hay diferencia significativa

Análisis de recuentos de Microorganismos Mesófilos Totales en muestras control

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	8	17,3905	2,1738125	0,43279714		
Columna 2	8	20,656	2,582	0,46251657		

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<i>Entre grupos</i>	0,66646814	1	0,66646814	1,48879244	0,2425592	4,60010994
<i>Dentro de los grupos</i>	6,26719597	14	0,44765685			
<i>Total</i>	6,93366411	15				

No se observan diferencias significativas

Análisis de recuentos de Microorganismos Mesófilos Totales en muestras tratadas

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	8	15,4675	1,9334375	0,2755356		
Columna 2	8	19,021	2,377625	0,49956798		

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<i>Entre grupos</i>	0,78921014	1	0,78921014	2,03639915	0,17549454	4,60010994
<i>Dentro de los grupos</i>	5,42572509	14	0,38755179			
<i>Total</i>	6,21493523	15				

No se observan diferencias significativas

Análisis de recuentos de Enterobacterias en muestras control

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	8	9,61	1,20125	0,09189821		
Columna 2	8	13,775	1,721875	0,51712812		

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<i>Entre grupos</i>	1,08420156	1	1,08420156	3,56044228	0,08008344	4,60010994
<i>Dentro de los grupos</i>	4,26318438	14	0,30451317			
<i>Total</i>	5,34738594	15				

No se observan diferencias significativas

Análisis de recuentos de Enterobacterias en muestras tratadas

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	8	8,34	1,0425	0,04359286		
Columna 2	8	12,71	1,58875	0,3702625		

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>

Entre grupos	1,19355625	1	1,19355625	5,76798744	0,03077073	4,60010994
Dentro de los grupos	2,8969875	14	0,20692768			
Total	4,09054375	15				

Se observan diferencias significativas

Análisis de recuentos de *Pseudomonas* spp. en muestras control

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	8	13,63	1,70375	0,34619821		
Columna 2	8	13,7335	1,7166875	0,56061564		

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,00066952	1	0,00066952	0,00147663	0,96988983	4,60010994
Dentro de los grupos	6,34769697	14	0,45340693			
Total	6,34836648	15				

No se observan diferencias significativas

Análisis de recuentos de *Pseudomonas* spp. en muestras tratadas

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	8	10,563	1,320375	0,26192684		
Columna 2	8	12,8145	1,6018125	0,46722271		

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,31682827	1	0,31682827	0,86903507	0,36702142	4,60010994
Dentro de los grupos	5,10404684	14	0,36457477			
Total	5,42087511	15				

No se observan diferencias significativas

ANEXO 2

MEDIOS DE CULTIVO

Mueller Hinton

USO: Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

FÓRMULA (en gramos por litro):

INFUSIÓN DE CARNE	300,00 g
PEPTONA ÁCIDA DE CASEÍNA	17,50 g
ALMIDÓN	1,50 g
AGAR	15,00 g
pH FINAL:	7,30 ± 0,10

Recuento en Placa Agar (P.C.A)

USO: Medio de cultivo recomendado para el recuento de bacterias aeróbicas en aguas, aguas residuales, productos lácteos y otros alimentos. También es recomendado como medio general para determinar poblaciones microbianas.

FÓRMULA (en gramos por litro):

EXTRACTO DE LEVADURA	2,50 g
TRIPTEÍNA	5,00 g
GLUCOSA	1,00 g
AGAR	15,00 g
pH FINAL:	7,00 ± 0,20

Agar Cetrimide

USO: Medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras especies del género. Su fórmula cumple con los requerimientos de la Armonización de Farmacopeas Europea, Japonesa y de los Estados Unidos de Norteamérica (EP, JP y USP respectivamente).

FÓRMULA (en gramos por litro):

PEPTONA DE GELATINA	20,00 g
CLORURO DE MAGNESIO	1,40 g
SULFATO DE POTASIO	10,00 g
AGAR	13,60 g
CETRIMIDA	0,30 g
GLICERINA	10 ml
AGUA PURIFICADA	1000 ml
pH FINAL:	7,20 ± 0,20

Violeta Rojo y Bilis Agar

USO: Este es un medio selectivo para la investigación presuntiva y recuento de coliformes en alimentos, productos lácteos y otros materiales de importancia sanitaria.

FÓRMULA (en gramos por litro):

EXTRACTO DE LEVADURA	3,00 g
PEPTONA	7,00 g
SALES BILIARES	1,50 g
LACTOSA	10,00 g
CLORURO DE SODIO	5,00 g
ROJO NEUTRO	0,03 g
CRISTAL VIOLETA	0,002 g
AGAR	15,00 g
pH FINAL:	7,40 ± 0,20

Tripteína Soya Agar

USO: Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos.

FÓRMULA (en gramos por litro):

TRIPTEÍNA	15,00 g
PEPTONA DE SOYA	5,00 g
CLORURO DE SODIO	5,00 g
AGAR	15,00 g
AGUA PURIFICADA	1000 ml
pH FINAL:	7,30 ± 0,20