

Conservación microbiológica de embutido carnico artesanal con aceites esenciales *Eugenia caryophyllata* y *Thymus vulgaris*

Microbiological conservation of carnic product with essential oils *Eugenia caryophyllata* and *Thymus vulgaris*

Salsicha conservação microbiológica com petróleos essenciais craft carnic *Eugenia caryophyllata* e *Thymus vulgaris*

ADRIANA TOFIÑO-RIVERA ¹, MAILEN ORTEGA-CUADROS ²,
BELKIS KATINA HERRERA-HINOJOSA ³, PEDRO FRAGOSO-CASTILLA ⁴,
BERTILDA PEDRAZA-CLAROS ⁵

Recibido para evaluación: 30 de Enero de 2017.

Aprobado para publicación: 11 de Mayo de 2017.

- 1 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), C. I. Motilonia, Investigador PhD asociado Grupo de investigación, Cienciaudes, Facultad de salud Universidad de Santander (UDES). Ph.D. Ciencias Agrarias. Valledupar, Colombia.
- 2 Universidad Popular del Cesar, Facultad de la Salud, Grupo de investigación Parasitología, Agroecología Milenio. Microbióloga, Estudiante de Maestría en Microbiología y Bioanálisis, Universidad de Antioquia. Medellin, Colombia.
- 3 Universidad Popular del Cesar, Facultad de la Salud, Grupo de investigación Parasitología, Agroecología Milenio. Microbióloga,
- 4 Universidad Popular del Cesar, Facultad de la Salud, Grupo de Investigación Parasitología Agroecología Milenio, Universidad Popular del Cesar. Ph.D. Medicina Tropical. Valledupar, Colombia.
- 5 Universidad de Santander (UDES), Facultad de salud, Grupo de investigación, Cienciaudes. M.Sc, Ciencias y Tecnología de Alimentos. Valledupar, Colombia.

Correspondencia: atofino@corpoica.org.co.

RESUMEN

Las demandas del sector cárnico y sus derivados en Colombia, justifican la importancia de encontrar aditivos que mantengan las propiedades nutritivas del alimento con menor o nula inclusión de químicos adversos a la salud. Se evaluó la calidad microbiológica y características sensoriales de chorizos artesanales conservados con aceites esenciales de *T. vulgaris* y *E. caryophyllata* en el Departamento del Cesar. La metodología incluyó extracción, caracterización físico-química y organoléptica de los aceites, análisis de la actividad antimicrobiana sobre *Salmonella* spp, *S. aureus* y *E. coli*, calidad microbiológica hasta 24 días y prueba sensorial al chorizo. Los aceites presentaron características físicas y organolépticas similares a los aceites esenciales comerciales. *T. vulgaris* (Timol 47%- p-cimeno 26%) y *E. caryophyllata* (Eugenol 84%) presentaron inhibición in vitro de 28,3 y 27,3 mm respectivamente sobre patógenos evaluados. El chorizo artesanal conservado con aceite esencial cumplió los límites microbiológicos establecidos en la Norma Técnica Colombiana NTC 1325 en todos los tratamientos. Se registró mejor percepción sensorial de color y olor en los chorizos crudos, y sin diferencias significativas en color, olor y sabor de chorizos cocidos ($p>0,05$). Los resultados sugirieron que los aceites esenciales de *T. vulgaris* y *E. caryophyllata* pueden ser una alternativa como conservantes en embutido cárnico artesanal.

ABSTRACT

The demands of the meat sector and its derivatives in Colombia justify the importance of finding additives that maintain the nutritional properties of the food with less or no inclusion of chemicals adverse to health. The microbiological quality and sensorial characteristics of artisanal sausages preserved with essential oils of *T. vulgaris* and *E. caryophyllata* in the Department of Cesar was determined. The methodology included extraction, physical-chemical, organoleptic characterization of oils, analysis of antimicrobial activity on *Salmonella* spp, *S. aureus* and *E. coli*, microbiological quality up to 24 days and sensorial test on chorizo. The oils presented physical and organoleptic characteristics similar to commercial essential oils. *T. vulgaris* (Thymol 47% - p-cymene 26%) and *E. caryophyllata* (Eugenol 84%) present in vitro inhibition of 28,3 mm and 27,3 mm respectively on pathogens evaluated. The artisanal chorizo preserved with essential oil complies with the microbiological limits established in Colombian Technical Standard NTC 1325 in all treatments. A better sensorial perception of color and odor was recorded in raw sausages, and no significant difference in color, smell and flavor of cooked sausages ($p>0,05$). The results suggest that the essential oils of *T. vulgaris* and *E. caryophyllata* may be an alternative as preservatives in artisanal meat sausage

RESUMO

As exigências do sector da carne e seus derivados na Colômbia, justificam a importância de encontrar aditivos que mantêm as propriedades nutricionais dos alimentos com menos ou nenhuma inclusão de produtos químicos nocivos à saúde. Foi determinada a qualidade microbiológica e características

PALABRAS CLAVE:

Productos de la carne, Aditivos alimentarios, Plantas aromáticas, Calidad del producto.

KEY WORDS:

Meat products, Food additives, Aromatic crops, Product quality.

PALAVRAS CHAVE:

Produtos de carne, Aditivos alimentares, Culturas aromáticas, Produto de qualidade.

sensoriais de lingüiça artesanal preservada com óleos essenciais de *T. vulgaris* e *E. caryophyllata* no Departamento de Cesar. A metodologia incluiu a extração, físico-químicas, óleos organolépticas, análise da atividade antimicrobiana contra *Salmonella* spp, *S. aureus* e *E. coli*, até 24 dias de qualidade microbiológica e teste sensorial, óleos de chouriço apresentaram características físicas e organolépticas semelhante a óleo essencial comercial. *T. vulgaris* (Timol 47% - 26% de p-cimeno) e *E. caryophyllata* (Eugenol 84%) exibem inibição in vitro de 28,3 mm e 27,3 mm respectivamente Pathogens avaliada. A salsicha artesanal preservada com óleo essencial está em conformidade com os limites microbiológicos estabelecidos pela Norma Técnica Colombiana NTC 1325 em todos os tratamentos, uma melhor percepção sensorial da cor e odor em salsichas cruas em que foi gravado, e não há diferenças significativas na cor, cheiro e sabor de salsichas cozidas ($p > 0,05$). Os resultados sugerem que os óleos essenciais de *T. vulgaris* e *E. caryophyllata* pode ser uma alternativa como conservantes em artesão carne de salsicha.

INTRODUCCIÓN

El sector cárnico es el más apetecido por los consumidores al igual que las diferentes líneas de sus derivados, especialmente el chorizo, por su costo y características organolépticas. En Colombia, el consumo de productos cárnicos en el grupo poblacional de 5 a 64 años alcanzó frecuencias de 7% diariamente y 50,7% de forma semanal, en el período 2005-2010, otros estudios reflejan que el consumo de embutidos en universitarios es alto, especialmente en varones de universidades públicas [1]. Algunos de los efectos adversos sobre la salud humana relacionados con este tipo de productos y sus aditivos químicos incluyen cáncer, diabetes, Parkinson, Alzheimer [2], hipertensión, accidentes cardiovasculares, enfermedades del corazón [3], lo cual ha exigido la búsqueda de alternativas naturales para la conservación de alimentos.

Actualmente, la industria prefiere la utilización de conservantes químicos en embutidos cárnicos como los nitritos [4] por su potencial inhibitorio frente al crecimiento de patógenos como *Clostridium botulinum* [5], Aunque su aplicación en alimentos ha sido controversial para la salud de los consumidores, no ha sido posible eliminar su uso, puesto que en muchos países se evidencia la permisibilidad de la legislación con respecto al uso y fácil accesibilidad. Inclu-

so se estipulan límites permisibles amparados en su función como barrera para disminuir o eliminar las enfermedades de transmisión alimentaria [3].

Sin embargo, la industria alimentaria a la vanguardia de la innovación y aseguramiento de la calidad e inocuidad de los productos, ha propuesto métodos y técnicas eco amigables. Los aceites esenciales (AE) derivados de las plantas son una opción viable y prometedora en el mercado de los conservantes eco amigables [6]. Estos productos naturales logran la misma acción microbicida y disminuyen el riesgo de enfermedades no infecciosas al consumidor. Los AE se utilizan por su actividad antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatoria, espasmolítico y conservantes de alimentos; están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) como sustancia generalmente reconocida como seguras o Generally Recognized as Safe (GRAS) [7,8].

Adicionalmente, investigaciones previas han determinado que AE de tomillo (*Thymus vulgaris*) así como el de clavo (*E. caryophyllanta*) presentan actividad antioxidante, por su acción de inhibición de la peroxidación de ácido linoleico, conservante y antibacteriana en derivados cárnicos como se demostró en salami en el estudio realizado por Ardila, Vargas y Mejía [9]. El AE de clavo posee propiedad antioxidante, conservante sin efecto notorio sobre las características sensoriales del salami [9], y en salchicha tipo bologna, en la que además se registra conservación de las propiedades organolépticas y químicas según Viuda *et al.* (2009) citado por Ganjali *et al.* [7]. Se ha relacionado que estos aceites también poseen actividad antimicrobiana sobre cepas de *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella oxytoca* [10].

Estas especies aromáticas son introducidas en Colombia y aunque el clavo no se cultiva en el país, el tomillo es ampliamente cultivado en Cundinamarca, Antioquia, Valle del Cauca y Cauca [11]. Por tanto, la bioprospección de la segunda especie, dinamizaría las economías regionales asociadas a la cadena productiva de plantas aromáticas y condimentarias [12]. La diversificación del uso de los AE permitiría aumentar las posibilidades de ingreso económico del productor y un mayor aprovechamiento de la capacidad instalada regional con beneficio a la calidad de productos accesibles a los estratos más vulnerables de la población.

A nivel regional, resulta relevante la evaluación del uso de AE en la formulación y estandarización del chorizo crudo artesanal como alternativa de reducción en el uso de conservantes químicos y aporte sensorial, dado que el chorizo tradicional es un producto alimenticio de alta demanda en la región Caribe de Colombia; expandido tanto en supermercados como sitios de ventas callejeras de comida. En estos últimos, se registró a nivel regional que los chorizos presentaron contaminación por *E. coli* y *S. aureus* [5,13].

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la adición de los AE de tomillo y clavo sobre la calidad microbiológica y sensorial del chorizo artesanal producido en Valledupar.

MÉTODO

La investigación se desarrolló en el Centro Biotecnológico del Caribe (CBC) del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), en Valledupar, Cesar, Colombia, municipio con una altitud de 169 msnm y temperatura promedio de 28 °C, humedad relativa de 70%, ubicación 10°27'37"N 73°15'35"O.

Extracción y caracterización físico-química y organoléptica de AE

A partir de 500 g de material vegetal seco de clavo y tomillo adquirido en la plaza de mercado de Valledupar, se realizó la extracción de los AE mediante el método convencional de hidrodestilación con vapor de agua [14].

A los AE obtenidos se les aplicó una evaluación sensorial del color a través del patrón de colores para AE; el olor y sabor se evaluó mediante prueba sensorial descriptiva en comparación con aceites comerciales de tomillo y clavo a través de un grupo de 10 panelistas no entrenados con experiencia previa en la identificación sensorial de AE [15,16]. La densidad (25°C) se determinó mediante diferencia de peso, en balanza analítica (marca Kern SOHN GMDH). El índice de refracción se midió a 22°C mediante refractómetro electrónico (ATAGO N – 1EBX MAR_1T LIQUID), y se realizó la lectura [17].

La caracterización de los AE se realizó en el laboratorio del Grupo de Investigación Química de los Productos Naturales de la Universidad de Córdoba, mediante cromatografía de gases (GC-MS), diluyen-

do en diclorometano e inyectados al cromatógrafo corriente iónica total re-construida, normalización simple, identificación presuntiva en columnas APO-LAR DB-5MS (60 m) y POLAR DB-WAX (60 m), los compuestos contenidos en los AE se identificaron con base a sus espectros de masas utilizando la biblioteca NIST y el programa MASSLABS [18].

Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de los AE sobre patógenos contaminantes de chorizo

Se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva AEM 01, *Escherichia coli* AEM 07 y *Salmonella spp.*, AEM 011 del cepario de la Universidad Popular del Cesar, para medir la actividad bactericida de los AE mediante el método de difusión en agar Kirby-Bauer, descrito por Ardila *et al.* [9] y Borugã *et al.* [19] con algunas modificaciones. Primero se activaron las cepas en agar nutritivo durante 18-24 h; *S. aureus* coagulasa positiva y *Salmonella spp* a una temperatura de 37°C ± 2°C y *E. coli* a 44°C ± 0,5°C. Seguidamente, se obtuvo una concentración microbiana en escala 0,5 McFarland (5x10⁵ UFC/mL), que se distribuyeron con asa de digralsky (100 µL) sobre la superficie de agar Mueller Hinton (MH). Se ubicaron sobre la superficie del agar MH discos de papel filtro de 5 mm de diámetro, WHATMAN F-C impregnados con 5, 10 y 20 µL de cada AE a evaluar. Los tratamientos asignados fueron: (T1) AE tomillo, (T2) AE de clavo, y (T3), Cloranfenicol al 30 µL/disco (control positivo de referencia en ensayos *in vitro*). Las placas se incubaron a 37°C/24 h, la actividad antimicrobiana se expresó en términos de la medida del diámetro en la zona de inhibición (mm) producido al final de la incubación como lo establecido por Pisciotti *et al.* [20], donde un diámetro de inhibición menor a 8 mm indica que no presenta sensibilidad, de 9-14 mm es sensible, de 15-19 mm es muy sensible y mayor a 20 mm extremadamente sensible [21].

Elaboración de chorizos con los AE de tomillo y clavo

De acuerdo con el protocolo establecido en el Decreto 2162 de 1983 del Ministerio de Salud de Colombia, y Buenas prácticas de manufactura según la resolución 2674 del 2013, se elaboraron los chorizos con carne de res (40%) y cerdo (20%), tocino (15%), harina de trigo (5%), sal (1,5%), azúcar (0,3%), cebolla (1,3%), ajo (0,2%), pimentón (0,2%), condimentos (1%), colo-

Cuadro 1. Tratamiento adicionado como conservante a chorizos.

Código	Descripción	Composición
T1	AE de tomillo	0,5 mL/Kg
T2	AE de clavo	0,5 mL/Kg
T3	Mezcla de conservantes químicos	Nitrato de potasio (0,3 %), fosfato de potasio (0,3 %) benzoato (0,05 %)

rantes para chorizo (1,5%), hielo escarcha (14%); la adición del conservante se realizó según cuadro 1:

De cada tratamiento se obtuvo una pasta fina y uniforme que se embutió en fundas naturales de cerdo, se porcionó en segmentos con diámetro de 6 cm y una longitud de 3,5 cm con un peso de 40 g. Posteriormente, se empacaron a vacío en una máquina marca MSADZ300 y se almacenaron a 4°C. Se elaboraron 250 chorizos.

Evaluación de la calidad microbiológica del chorizo conservado con los AE

Se determinó la calidad microbiológica, según normatividad del Instituto Nacional de Vigilancia de Alimento y Medicamento INVIMA y metodología planteada por Ardila *et al.* [9]. Los criterios evaluados al chorizo crudo con los diferentes tratamientos de conservación se midieron a los 1, 8, 16 y 24 días posterior a su elaboración, de acuerdo a los criterios establecidos por la Norma Técnica Colombiana NTC 1325 [22] para industrias alimentarias, productos cárnicos procesados no enlatados.

Para el análisis se homogenizó la muestra de 10 y 25 g de chorizo macerado y diluyó en 90 mL de agua peptonada 0,1 % y 225 mL de agua de peptona bufferada (NTC 4574) [23] y diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-3} . A partir de estas diluciones se realizaron las siembras en los medios de cultivos específicos para cada criterio microbiológico establecidos para este producto, así: Agar plate count (SPC) para bacterias mesófilas, agar Sulfito Polimixina Sufadiazina (SPS) para esporas de *Clostridium* sulfito reductor – ESR (NTC 4834) [24] Agar Baird Parker (SBP) y caldo cerebro corazón (BHI) para *Staphylococcus aureus* (NTC 4779 [25], Caldo brilla para coliformes totales y fecales y confirmación en medios selectivos y diferenciales, Eosina azul de metileno (EMB) y pruebas bioquímicas (NTC 4516) [26], caldo Rappaport Vasiliadis (RVS), tetracionato, agar xilosa lisina desoxi-

colato (XLD) agar hecktoen entérico (HE) agar triple azúcar hierro (TSI), agar lisin hierro (LIA), agar indol motilidad (SIM), caldo (RM/VP) citrato, urea para la detección del indicador fecal universal *Echerichia coli* y *Salmonella spp* según NTC 1325 [22].

Características sensoriales

Las características sensoriales de olor y color del chorizo crudo, así como el sabor luego de su cocción, se evaluaron mediante pruebas organolépticas según metodología planteada por Ardila *et al.* [9] mediante prueba de satisfacción de escala hedónica de 1 a 5, donde 1 era “Me disgusta mucho”, 2 “Me disgusta”, 3 “Ni me gusta ni me disgusta”, 4 “Me gusta” y 5 “Me gusta mucho”. Se determinó la aceptabilidad del producto a través de análisis sensorial por un grupo de siete jueces entrenados [27] idóneos en la elaboración de matrices alimentarias de derivados cárnicos correspondiente a instructores de la planta de producción cárnica del CBC- SENA, regional Cesar, los cuales recibieron capacitación previa en características sensoriales y percepción de color, sabor y olor según norma ISO 8586 del 2012 [28].

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, en el procesamiento y análisis de los resultados obtenidos para la actividad antibacteriana de los tratamientos, calidad microbiológica y características sensoriales del chorizo, se aplicó un análisis de varianza mediante ANOVA con corrección post-hoc mediante la prueba Tukey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos, con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Caracterización de los AE

Mediante hidrodestilación con vapor de agua se obtuvo una concentración de 4,61 mL de AE de tomillo y 8,6 mL de clavo, equivalente a un rendimiento de 0,99 y 1,63% respectivamente, superiores a los registrados en estudios realizados por Borugã *et al.* [19] de tomillo (0,23 %) y clavo (0,40 a 1,25%) [19]; asociado a la capacidad de obtención de mayor rendimiento de aceite por dicho método. Sin embargo, según estudio realizado por Cardona y Mejía [15], los AE de clavo y tomillo obtenidos por arrastre de vapor, le confieren

mayor estabilidad oxidativa al salami en comparación al control, por lo cual sería importante verificar el efecto de los dos métodos de extracción del AE frente a la calidad del chorizo artesanal. Cabe destacar que el rendimiento de aceites de tomillo no solo depende del método de extracción, sino también de las condiciones medio ambientales y el manejo agronómico del cultivo, por lo que se han obtenido por hidrodestilación rendimientos entre 0,75 y 1,16 % en base seca [29].

Por otro lado, las características organolépticas y físicas de los AE obtenidos, muestran semejanzas con los AE comerciales correspondientes, según los panelistas (Cuadro 2). En AE de clavo se encontró una densidad relativa de 1,056 e índice de refracción de 1,51 similar a registros de otros estudios con 1,041; y dentro del promedio referido por la literatura con densidad de 1,040 -1,068; índice refractivo 1,527-1,537 [30]. Mientras que en tomillo con 0,932 y 1,49 concuerda con valores referidos de densidad específica de 0,78-0,80 y un índice de refracción de 1,49-1,50 [31].

En este sentido, es de gran importancia resaltar que el índice de refracción y densidad son aspectos de interés para evaluar la posibilidad de adulteraciones y cambios ligados al envejecimiento, pues cada AE presenta un patrón rotatorio característico asociado a sus moléculas con actividad óptica y una densidad específica [32]. Los AE presentaron características físicas y organolépticas similares a las exhibidas por los AE comerciales, de acuerdo con la opinión de los panelistas. Estos resultados son congruentes con lo descrito para las características idóneas de los aceites en la Japanese Pharmacopoeia [30], donde se refiere que el aceite de clavo es transparente, amarillo o marrón claro, aroma característico y sabor pungente, ligeramente miscible en agua. Así mismo, las

características del aceite de tomillo de color marrón y aroma a timol como lo reportó Oulebsir *et al.* [33].

De igual forma Oulebsir *et al.* reportan características del AE de tomillo de color marrón y aroma de timol [33].

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que es esperada una variación cuantitativa entre registros de las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de los AE, puesto que en el material vegetal se combinan sustancias heterogéneas y la composición cambia de acuerdo a la época de recolección del material, del lugar geográfico, modo de cultivo, métodos de almacenamiento, manejo, edad y actividad biológica, lo que influye directamente sobre sus características [34]. La valoración física y sensorial preliminar del AE antes de su uso en la elaboración de chorizos artesanales es fundamental para verificar que sus atributos organolépticos intactos, no alteraron las características finales del chorizo artesanal, revisadas en segunda prueba sensorial con panelistas.

Adicionalmente, en el análisis químico se identificó el 98,06% de los componentes específicos del AE de tomillo, frente al 94,5% identificado en clavo (Cuadro 3).

En estudios realizados por Pirbalouti *et al.* [29], sobre tomillo mediante el método GC-MS refieren la identificación de al menos 24 componentes que representan el 84,5 al 98% de la composición total del aceite, asociados principalmente a monoterpenos oxigenados (78,7-49,8%) e hidrocarburos monoterpénicos (13,1-35,3%). En el presente estudio se identificó la presencia mayoritaria de timol (46%) y p-cimeno (26%), los cuales son niveles similares a los registros que reportan 44,4% y 16,1% respectivamente; mientras que otros terpenos como el γ -Terpineno y el carvacrol con niveles de 4,1 y 2,1, están disminuidos en relación a reportes de Borugã *et al.* y Pirbalouti *et al.*, sobre mayor concentración de carvacrol (4,4-16,1%) y α -terpineno (10,5-11,9%) en el AE [19,29]. Aun así, se mantuvo la predominancia de terpenoides totales, los cuales explican la actividad biocontroladora observada en los estudios in vitro, en consecuencia con lo referido por Coy y Acosta donde la actividad bactericida se asoció con la alta prevalencia de terpenos [31], de igual forma en estudios de Eguchi *et al.*, en cuanto a la actividad fungicida [35].

En el caso de clavo, el componente primario identificado fue eugenol (84%) con propiedades antioxidantes e insecticidas, lo cual es congruente con registros

Cuadro 2. Características físicas y organolépticas de los AE tomillo y clavo.

Característica	Tomillo	Clavo
Aspecto general	Líquido fluido transparente	Líquido fluido transparente
Color	Amarillo fuerte, rojizo	Amarillo claro, pardo
Olor	Muy aromático, característico a tomillo	Muy aromático característico a clavo de olor
Sabor	Muy picante	Muy picante
Densidad relativa	0,932	1,056
Índice de refracción	1,49	1,51

Cuadro 3. Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en el aceite esencial de clavo de olor y tomillo.

Tomillo		Clavo	
Componente	(%)	Componente	(%)
α-pineno	3,06	2-Heptanona	0,93
Mirceno	3,21	Etil- hexanoato	0,72
P-cimeno	26,00	Eugenol	84,02
γ-Terpineno	4,10	Eugenol acetato	7,06
Linalool	3,03	Ethyl octanoate	Tr
Canfeno	0,78	α-Cubebeno	Tr
Boroneol	3,08	Linalool	Tr
α-tujeno	1,25	2-Undecanona	0,1
Terpineol	2,24	β-Caryophyllene	1,31
Timol	46,07	Etil benzoato	Tr
Carvacrol	2,10	α -Humuleno	Tr
β-borbuleno	0,39	α -Terpinil acetato	Tr
Trans-cariofileno	0,50	α -Muuroleno	Tr
NI	Tr	Benzyl alcohol	0,23
α-humuleno	2,10	Benzyl acetato	Tr
Cadineno	2,10	Carvona	Tr
Germacreno-D	0,72	γ cadineno	0,1
Torreyol	1,05	Calameneno	0,13
γ cadineno	0,31	Calacoreno	0,14
Oxido de cariofileno	0,24	Oxido de cariofileno	Tr
Carotol	0,31	2-Heptanol	Tr
Sabineno	0,09	2-Nonanone	Tr
1-8 cineol	1,0	Humuleno	0,22
(E)- γ Bisaboleno	0,19	N.I	Tr
Δ-3-Careno	0,07	N.I	Tr
N.I	Tr		

N.I: No identificado; tr: trazas

hasta del 89% de Eugenol [36], el cual es el que más se relaciona con la actividad biocida del aceite, pero se han identificado por GC MS otros componentes como β-cariofileno y alcohol bencílico con proporción ampliamente variable [4]. En el presente estudio, se identificaron 23 componentes con preponderancia de los compuestos referidos y altos niveles de eugenol-acetato, 2-heptanona y etil-hexanoato que demuestran la variabilidad natural del aceite.

De forma general, el AE de tomillo obtenido en este estudio tiene mejor

composición en sus elementos de mayor actividad biocida dada la presencia de más de dos componentes referidos en otras investigaciones para el control de microorganismos tanto *in vitro* como aditivo en productos agroindustriales alimenticios [9,35] mientras que en clavo la actividad es principalmente del Eugenol.

Determinación de la actividad antimicrobiana

Los resultados del efecto de los AE de tomillo y clavo sobre *Salmonella spp.*, *S. aureus* coagulasa positiva y *E. coli* se muestran en

el cuadro 4. Se presenta la comparación de promedios de los halos de sensibilidad (mm) entre las bacterias a concentraciones 5, 10 y 20 μL de ambos AE y del control Cloranfenicol. A partir del promedio de la medición de los halos de inhibición del crecimiento (mm), se evidencia la existencia de diferencia significativa entre estos grupos, siendo la concentración de 20 μL de AE de tomillo con 28,3 mm la de mayor efecto sobre *S. aureus* en relación al Cloranfenicol, mientras clavo a 10 μL presentó mayor efecto sobre *E. coli* con 27,3 mm ($p < 0,05$).

Las concentraciones que presentaron mayor sensibilidad frente a los tres microorganismos evaluados para el tratamiento con tomillo fueron 10 y 20 μL con diámetros entre 21,3 mm y 28,3 mm valores inferiores a los obtenidos por Borugã *et al.* [19] a una concentración de 20 μL con halos de inhibición de 34,4 mm de *S. typhirurium*, 34,9 mm de *E. coli* y 31,4 mm de *S. aureus*, este resultado estuvo asociado posiblemente a que el aceite de tomillo utilizado contenía hasta un 86,9% de compuestos primarios de timol, p-cimeno y α-terpineol frente a un 76,17% de dichos quimiotipos en el presente estudio; los cuales son los principales responsables de la actividad antimicrobiana del aceite [36].

Por su parte, el tratamiento con clavo evidenció alta sensibilidad de los tres microorganismos evaluados a las concentraciones 10 y 20 μL con diámetros de 19,6 mm en *Salmonella spp.*; 22,6 mm sobre *S. aureus* y 27,3 mm frente a la *E. coli*; resultados superiores a los presentados por Gamboa y Vásquez [4] contra *E. coli* 0157H7, *Salmonella spp.*, donde la inhibición máxima registrada fue de 18,3 mm.

Estudios de Ugalde *et al.* con dicho AE en combinación con canela, reportan inhibición de 23,7mm sobre *S. aureus* y de 16,7 en *E. coli* a concentración de 15 µL [36]. En el caso del clavo, su actividad antimicrobiana está asociada al eugenol, acetato de eugenilo, cariofileno, según reportes de Eguchi *et al* [35].

A la fecha se han realizado múltiples estudios para entender los mecanismos que explican el efecto controlador de los AE sobre microorganismos como *S. aureus*, *B. subtilis*, *Y. enterocolitica*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *P. mirabilis*, *E. coli* y *K. oxytoca* [10]. De modo general, los AE desintegran en bacterias la membrana externa o incrementan su fluidez. También se ha descrito engrosamiento y disrupción de la pared celular junto con una mayor rugosidad y ausencia de citoplasma. En este sentido, la actividad microbiana de los AE depende de la composición y proporciones de los diferentes componentes con actividad biocida respecto a la cantidad de los constituyentes primarios. Ambos AE y sus componentes, registran actividad antifúngica eficiente según Aguilar y López [38]. En el presente estudio se evidencia mayor actividad antibacteriana *in vitro* con diferencia significativa del AE de clavo sobre los tres microorganismos evaluados en las concentraciones equivalentes de tomillo a excepción de 20 µL sobre *S. aureus*.

Evaluación de las características microbiológicas del chorizo conservado con AE de tomillo y clavo.

De acuerdo a la prueba de Tukey, en el análisis microbiológico no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P= 0,0100$). Durante el periodo de conserva-

ción de los chorizos se identificó una carga microbiana ascendente en el tiempo de aerobios mesófilos en los tres tratamientos, siendo los chorizos elaborados con conservantes químicos los que alcanzaron los límites máximos permitidos por la NTC 1325 (Cuadro 5).

Se identificaron menos de 100 UFC de coliformes totales en los chorizos elaborados con el AE de clavo y los conservantes químicos en los días 16 y 24, mientras que en los chorizos elaborados con AE de tomillo no se detectó crecimiento. Aun así todos cumplen con los límites máximos permitidos por la NTC 1325, la diferencia está en

el mayor número de componentes con actividad biocida del AE tomillo en T1, que mantuvo su efectividad durante el proceso de elaboración del chorizo ubicándose por encima de T2, el cual tuvo mejor comportamiento *in vitro*. [30,34]. Además, el producto cumplió con los requisitos de ausencia de patógenos como *Salmonella spp.*, *S. aureus* coagulasa positiva y coliformes fecales para todos los tratamientos, manteniéndose la actividad antimicrobiana expresada en la prueba preliminar *in vitro* por ambos aceites, con mejor comportamiento de tomillo. No se evidenció crecimiento de *Clostridium sulfito reductor* sobre los chorizos

Cuadro 4. Evaluación antimicrobiana in vitro de los AE de tomillo y clavo

Tratamiento	µL	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. aureus</i> c(+)	<i>E. coli</i>
		Inhibición mm		
T1 tomillo	5	8,9±3,2a	9,3±2,2ba	13,3±3,0a
	10	12,6±2,0b	17,6±1,0b	21,3±1,0b
	20	12,5±2,0b	28,3±2,5 c	18±1,6 a
T2 clavo	5	14,3±1,0 b	12,3±0,7ba	17±0,6 a
	10	19,6±2,1 c	22,6±2,1b	27,3±1,5 c
	20	15,6±1,0b	16,3±1,3 b	22,6±1,1 b
T3 Cloranfenicol	30	15,5±1,0b	18,2±1,4b	19,8±1,0b

*Letras distintas en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa.

Cuadro 5. Análisis microbiológico de los chorizos elaborados con los tres tratamientos

Parámetro	Límite*	Día	T1**	T2	T3
Mesofilos aerobios UFC/g	<1E ⁵	1	40	50	4E ⁴
		8	7E ³	5E ³	4E ⁴
		16	8E ³	1,2E ⁴	4E ⁴
		24	1E ⁴	1,3E ⁴	5E ⁴
Coliforme Total	100-500	1	<3	<3	<3
		8	<3	<3	<3
		16	<3	<100	<100
		24	<3	<100	<100
<i>E. coli</i>	<10	1 a 24	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i> en 10g	<100	1 a 24	Ausente	Ausente	Ausente
ESR en 10g	<10	1 a 24	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Salmonella spp</i> en 25g	Ausente	1 a 24	Ausente	Ausente	Ausente

*Límites máximos permitidos según NTC 1325. **T1 tomillo, T2 clavo, T3 conservantes químicos

elaborados en ninguno de los tratamientos. El recuento de meso-aerobios aunque fue el de mayor desarrollo, también cumplió con los requisitos para productos cárnicos cocidos hasta 24 días de almacenamiento con 10.000-100.000 UFC/g; en conjunto, estos parámetros de referencia en calidad alimentaria, están establecidos en la NTC 1325 para los productos cárnicos embutidos.

Durante el periodo de almacenamiento, se observó que los tratamientos con AE inhibieron en mayor proporción el crecimiento de microorganismos comensales y patógenos permaneciendo en el límite permitido en la Norma Técnica Colombiana (NTC) 1325; especialmente frente a microorganismos de alta peligrosidad para la salud del consumidor como *Salmonella spp* y *Clostridium sulfito reductor*, que se relacionan con intoxicaciones alimentarias de los consumidores por el consumo de productos cárnicos embutidos. Este resultado es similar al obtenido por Suarez *et al.* [39] en salchicha bratwurst, que reportaron ausencia de patógenos en el producto elaborado con diferentes especias incluida tomillo al inicio y luego de 12 días.

Por otro lado, esta investigación evidenció que los tratamientos elaborados a base de AE presentaron menor carga microbiana de aerobios mesófilos (Cuadro 4) en relación a los chorizos elaborados con el tratamiento 3 (conservantes químicos), pero sin salir de los límites máximos permitidos; dado que este grupo de microorganismos se consideran indicadores de manipulación excesiva posterior a su elaboración o conservación a

Cuadro 6. Evaluación sensorial en chorizo crudo y cocido.

Tratamiento	Chorizo Crudo		Chorizo Cocido		
	Color	Olor	Color	Olor	Sabor
T1 tomillo	4,2±0,2a	4,3±0,1a	4,0±0,4a	4,4±0,1a	4,1±0,2 ^a
T2 clavo	4,0±0,1a	4,2±0,0a	4,1±0,2a	4,2±0,2a	3,8±0,1 ^a
T3 Conservantes Químicos	3,1±0,1b	2,8±0,3b	3,9±0,1a	4,2±0,2a	4,0±0,1a

*Letras distintas en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa.

temperaturas inadecuadas, lo que es común en chorizos producidos artesanalmente [5]. Estos resultados son similares a los obtenidos con AE de clavo en salami [9].

Evaluación Sensorial

De acuerdo a la evaluación sensorial del chorizo crudo, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). Es decir, los tratamientos con AE presentaron mejores características de color y olor en chorizos crudos, mientras que en chorizos cocidos, los tratamientos no presentaron diferencias significativas (Cuadro 6).

Las características organolépticas fueron calificadas positivamente por los jueces, datos similares a los presentados en estudios de Ardila *et al.* y Cardona y Mejía sobre la evaluación sensorial de AE de clavo en salami, donde el producto no mostró diferencias con respecto al testigo [15,9] y el AE de tomillo en salchicha tipo bologna [7], al igual que en nuggets de pollo, donde tampoco se afectaron las propiedades de olor y sabor siendo similar al control [7]. Estos resultados indican que los AE de tomillo y clavo poseen propiedades promisorias para la conservación de propiedades organolépticas aceptadas por los consumidores [9].

CONCLUSIONES

Los AE de tomillo y clavo poseen propiedades antimicrobianas y capacidad para mantener las características organolépticas en embutidos elaborados de forma artesanal, siendo tomillo el de mayor efectividad *in vitro* y como aditivo en los chorizos. Los AE evaluados con características físicas y organolépticas previas a la elaboración de los chorizos no alteraron las características sensoriales finales del producto y lograron mantener las condiciones microbiológicas indicadas en la normatividad colombiana.

En este sentido, los AE evaluados pueden considerarse como una alternativa viable como conservantes naturales según normatividad vigente para calidad microbiológica de derivados cárnicos, en sustitución de preservantes químicos como nitrato de potasio, fosfato de potasio y benzoato; por lo que se recomienda avanzar en estudios de valor agregado en la aromatización y contenido nutricional saludable para consumidores. También sería relevante avanzar con estudios de conservación, capacidad antioxidante y calidad sensorial con especies aromáticas cultivadas en la región y así vincular todos los eslabones de la agrocadena.

De acuerdo con lo anterior, se sugiere darle continuidad a estudios bromatológicos de los chorizos y estudios que incluyan la identificación fitoquímica y actividad antioxidante de los AE de tomillo y clavo como determinantes funcionales, así como la estabilidad de los aceites como aditivos durante el proceso de producción agroindustrial, los costos de la aplicación de este tipo de tecnología y validar su uso frente a otros tipos de patógenos como *Listeria monocytogenes*. También, la inclusión de compuestos funcionales o nutracéuticos, así como el efecto en la calidad del producto, de la disminución en la concentración de otros componentes que pueden ser de alto riesgo para la salud de los consumidores como grasas saturadas, cloruro de sodio y sales fosfatadas, además de estudiar la inclusión de fibra, vitaminas y minerales [6].

Además, la inclusión de estas especias en el mercado y la industria generaría oportunidades, favoreciendo la economía nacional. Se requiere optimizar procesos de extracción a nivel local, incluyendo dentro de los elementos de dinamización de la economía regional, las asociaciones de productores transformadores de AE como ASOPROKAN, asociación de productores indígenas Kankuamos ubicados en Valledupar. Esta asociación produce AE de alta calidad para satisfacer las necesidades de la medicina tradicional de su comunidad [40]

AGRADECIMIENTOS

A Carlos Osorio del SENA y Jorge Botero de la UDEA por su acompañamiento, COLCENCIAS convocatoria movilidad AL 2014 y CORPOICA por la financiación.

REFERENCIAS

[1] RODRÍGUEZ-ESPINOSA, H., RESTREPO-BETANCUR, L.F. y URANGO, L.A. Preferencias y frecuencia de consumo de derivados cárnicos por parte de estudiantes universitarios de Medellín, Colombia. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 19(4), 2015, p. 204-211.

[2] O'FLYNN, C. *et al.* The application of high-pressure treatment in the reduction of salt levels in reduced-phosphate breakfast sausages. *Meat Science*, 96(1), 2014, p. 633-639.

[3] VARGAS-VELÁSQUEZ, C., LÓPEZ-REINOSO, A.R. y FLORES-ARTUNDUAGA, L.M.B. Evalua-

ción de la concentración de nitratos/ nitritos y cloruro de sodio en embutidos expendidos en la ciudad de Tarija. *Revista Ventana Científica*, 1(7), 2014, p. 1-8.

[4] GAMBOA, J.M. y VÁSQUEZ, M. Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*. *Revista Rebiolest*, 1(3), 2015, p 42-51.

[5] TIRADO, D., ACEVEDO, D. and MONTERO, P. Calidad microbiológica, fisicoquímica, determinación de nitritos y textura de chorizos comercializados en cartagena (Colombia). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 2015, p. 189-195.

[6] OLMEDILLA-ALONSO, B. y JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Alimentos cárnicos funcionales: desarrollo y evaluación de sus propiedades saludables. *Nutrición Hospitalaria*, 29(6), 2014, p. 1197-1209.

[7] GANJALI, N. *et al.* Antioxidant Effect of Thyme Essential Oil on Oxidative Stability of Chicken Nuggets. *International Journal of Food Engineering*, 1(2), 2015, p. 115-120.

[8] RIVERA, C.J. *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems: A review. *Food Control*, 54, 2015, p. 111-119.

[9] ARDILA, Q.M., VARGAS, A.A. y MEJÍA, G.L. Evaluación de aceites esenciales del *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* como posibles antioxidantes y conservantes en el salami. *Vector*, 4, 2009, p. 95-106.

[10] AKDEMIR, E.G. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 202(2), 2015, p. 35-41.

[11] CARDONA, J.O. y BARRIENTOS, F.J. Producción, uso y comercialización de especias aromáticas en la región Sumapaz, Cundinamarca. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(1), 2011, p. 114-129.

[12] MIER, G.H. Acuerdo nacional de competitividad 2015-2025: Cadena plantas aromáticas, medicinales, condimentarias y afines en Colombia [online]. 2015. Disponible: <http://documentslide.com/documents/acuerdo-nacional-de-competitividad-cadena-plantas-aromaticas-y-medicinales.html>. [citado 20 de enero de 2017].

[13] DURANGO, J., ARRIETA, G. y MATTAR, S. Presencia de *Salmonella* spp., en un área del Cari-

- be colombiano: un riesgo para la salud pública. *Biomédica*, 24, 2004, p. 89-96.
- [14] TORRENEGRA, E.M. *et al.* Comparación de la Hidro-distilación Asistida por Radiación de Microondas (MWH) con Hidro-distilación Convencional (HD) en la Extracción de Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Información tecnológica*, 26(1), 2015, p. 117-122.
- [15] CARDONA, H.L.E. and MEJIA, G.L.F. Evaluation Of Antioxidant Effect Of Essential Oils And Extracts Of *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris*. *Biosalud*, 8, 2009, p. 58-70.
- [16] PESAVENTO, G. *et al.* Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54, 2015, p. 188-199.
- [17] BONILLA, D.M. *et al.* Efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis* cultivada in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 45(2), 2016, p. 275-287.
- [18] NAVARRETE, C., GIL, L., DURANGO, D. y GARCÍA, C. Extracción y caracterización del aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroindustriales. *DYNA*, 77(162), 2010, p. 85-92.
- [19] BORUGÁ, O. *et al.* *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*, 7(3), 2014, p. 56-60.
- [20] PISCIOTTI, O.D.A., CABEZA, H.E.A. y CABEZA, H.R.A. Evaluación in vitro mediante pruebas de difusión en agar, del efecto inhibitorio de los ácidos propiónico y butírico sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*. *Revista Bistua*, 12(1), 2014, p. 82-92.
- [21] CABEZA, R., CABEZA, E. y PISCIOTTI, D. Actividad inhibitoria de extractos de *Plutarchia coronaria* sobre *Salmonella* serotipo Enteritidis ATCC 17036. *Revista Bistua*, 13(1), 2015, p. 46-61.
- [22] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). Norma Técnica Colombiana NTC 1325: Industrias alimentarias. Productos cárnicos procesados no enlatados Quinta Actualización. Bogotá (Colombia): 2008, 32 p.
- [23] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). Norma Técnica Colombiana NTC 4574: microbiología de alimentos y de alimentos para animales. método horizontal para la detección de *Salmonella spp*, Primera Actualización. Bogotá (Colombia): 2007, 27 p.
- [24] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). Norma Técnica Colombiana NTC 4834: Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de *Clostridium* sulfito reductores e identificación de *Clostridium perfringens*. Técnica de recuento de colonias, Primera Actualización. Bogotá (Colombia): 2000, 27 p.
- [25] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). Norma Técnica Colombiana NTC 4779: Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies), Primera Actualización. Bogotá (Colombia): 2007, 21 p.
- [26] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). Norma Técnica Colombiana NTC 4516: Microbiología de alimentos y productos de alimentación animal. Método horizontal para la detección y enumeración de coliformes técnica del número más probable, Primera Actualización. Bogotá (Colombia): 2009, 12 p.
- [27] YOUSSEEF, M., LUBBERS, S., VALENTIN, D. and HUSSON, F. From sensory evaluation to food product development: how to fit a new vegetal fermented product to the consumer taste. *Spise*, 2016, p. 36-46.
- [28] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Norma ISO 8586: Sensory analysis. General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors, First Edition. Geneva (Switzerland): 2012.
- [29] PIRBALOUTI, A., HASHEMI, M. and GHAFAROKHI, F. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 48, 2013, p. 43-48.
- [30] JAPANESE PHARMACOPOEIA JP XVI. Clove Oil, Oleum Caryophylli [online]. 2012. Disponible: <https://www.pmda.go.jp/files/000152816.pdf> [citado 26 de diciembre de 2016].
- [31] COY, B.C. y ACOSTA, G. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 2013, p. 237-246.

- [32] BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Ciencia y tecnología para el Desarrollo. Subograma IV. Biomasa como fuente de productos químicos y energía. Proyecto IV.6. La flora iberomericana y su aprovechamiento para la producción de aromas y fragancias de interés industrial. 1 ed. Buenos Aires (Argentina): 2002, p. 23.
- [33] OULEBSIR-MOHANDKACI, H., AIT KAKI, S. and DOUMANDJI-MITICHE, B. Essential Oils of two Algerian aromatic plants *Thymus vulgaris* and *Eucalyptus globulus* as Bio-insecticides against aphid *Myzus persicae* (Homoptera Aphididae). *Wulfenia*, 22(2), 2015, p. 185-197
- [34] AMINZARE, M. *et al.* The use of herbal extracts and essential oils as a Potential Antimicrobial in Meat and Meat Products: A Review. *Journal of Human, Environmental and Health Promotion*, 1(2), 2016, p. 63-74.
- [35] EGUCHI, Y. *et al.* Identification of terpenoids volatilized from *Thymus vulgaris* L. by heat treatment and their *in vitro* antimicrobial activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94, 2016, p. 83-89.
- [36] UGALDE, M. *et al.* Bacterial and Antioxidant Activity of Commercial Essential Oils of Rosemary, Clove, Oregano and Sage. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 25, 2016, p. 54-61.
- [37] AL-ASMARI, K.A. *et al.* Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), 2017, p. 147-150.
- [38] AGUILAR-GONZALEZ, A. y LÓPEZ-MALO, A. Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agente antimicrobiano en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 7(2), 2013, p. 35-41.
- [39] SUÁREZ, M.H., RESTREPO, M.D.A y CARRASQUILLA, G.L.A. Influencia de Especies Naturales en la Vida Útil y Aceptación Sensorial de Salchicha Bratwurst. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 64(1), 2011, p. 6007-6013.
- [40] TOFIÑO-RIVERA, A. *et al.* Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 2016, p. 749-754.